



**HAL**  
open science

# Développement et évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de formulations innovantes d'argiles afin de proposer un nouveau dispositif de décontamination cutanée

Alix Danoy

## ► To cite this version:

Alix Danoy. Développement et évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de formulations innovantes d'argiles afin de proposer un nouveau dispositif de décontamination cutanée. Ingénierie biomédicale. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1258 . tel-03884125

**HAL Id: tel-03884125**

**<https://theses.hal.science/tel-03884125v1>**

Submitted on 5 Dec 2022

**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 : 2020LYSE1258

## **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 Science-Santé**

**Spécialité de doctorat** : Ingénierie biologique et médicale  
**Discipline** : Biologie, Médecine et Santé

Soutenue publiquement le 04/12/2020, par :  
**Alix Danoy**

---

# **Développement et évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de formulations innovantes d'argiles afin de proposer un nouveau dispositif de décontamination cutanée**

---

Devant le jury composé de :

Pr. Frédéric DORANDEU, Directeur adjoint de l'institut de recherche  
Biomédicale des Armées, Brétigny-sur-Orge  
Dr. Gladys MIREY, Directrice de Recherche INRAE, Toulouse  
Dr. Anne-Marie PENSE-LHERITIER, Ecole de Biologie Industrielle,  
Cergy  
Pr. Roselyne BOULIEU, Université Claude Bernard, Lyon  
Dr. Julien ROULEAU, DGA – Maitrise NRBC, Vert-le-Petit  
Dr. Bernard VERRIER, Directeur de recherche IBCP, Lyon

Rapporteur  
Rapporteuse

Rapporteuse  
Examinatrice  
Examineur  
Directeur de thèse



# Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

## COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

## COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI



Ce doctorat a été mis en place et soutenu par la Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique (MRIS) de la Direction Générale de l'Armement (DGA) grâce à une allocation de thèse de trois années. Les travaux ont été réalisés sous la supervision de Dr. Bernard Verrier, dans l'équipe « Vecteurs colloïdaux et transport tissulaire » faisant partie de l'UMR 5305 – LBTI (Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique) à l'IBCP :

Institut de Biologie et Chimie des Protéines

7 passage du Vercors

69007 LYON



## **Remerciements**

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans le soutien et la confiance de la DGA.

Je tiens à remercier le Dr. Gladys Mirey, le Dr. Anne-Marie Pensé-Lhéritier et le Pr. Frédéric Dorandeu qui m'ont fait l'honneur de rapporter ces travaux de thèse. Je remercie également le Pr. Roselyne Boulieu et le Dr. Julien Rouleau d'avoir accepté d'examiner cette thèse et de faire partie du jury de soutenance.

Je souhaite également remercier mon directeur de thèse, le Dr. Bernard Verrier pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce doctorat. Dès mon arrivée, vous m'avez accordé votre confiance et votre soutien pour que ces trois années se déroulent dans les meilleures conditions. Merci pour les moyens qui m'ont été donnés et pour la liberté laissée dans la conduite du projet. Cela n'a pas toujours été simple mais grâce à vos conseils vous m'avez permis d'évoluer tant sur le plan professionnel que personnel, et je vous en suis reconnaissante.

Je remercie profondément l'ensemble l'équipe Verrier pour la bonne ambiance générale qui donne toujours envie de venir au laboratoire le matin ! Vous avez chacun votre contribution dans l'accomplissement de ces trois années de thèse. Capucine, Céline C, Céline LG, Fanny et Myriam, je n'aurais pas pu imaginer meilleures personnes avec qui passer mes journées et une partie de mes soirées. Camille et Sophie je suis déjà nostalgique de nos longues discussions dans le bureau pour s'échanger les meilleures adresses de restaurants. Damien, je crois que sans ta précieuse aide l'HPLC aurait eu ma peau dès la première année ! David, on a commencé cette aventure en même temps, on l'a vécu de façon très différente mais je suis fière qu'on ait réussi à le faire ensemble. Pierre et Altan je n'en reviens pas de le dire, mais votre humour risque de me manquer. Je tiens à remercier toutes les autres personnes de l'équipe avec qui j'ai pris plaisir à discuter : Stavroula, Mehwish, Anne-Lise, Charlotte, Danielle, Perrine, Quentin, Claire, Jean-Yves, Sergio, Naïma et Corinne. Merci également à Margaux et Kardelen que j'ai eu le plaisir d'accompagner en tant que stagiaires et qui m'ont permis d'apprendre les subtilités de l'encadrement.

Ces années lyonnaises n'auraient pas été les mêmes sans vous : Bruna, Mariana, Myriam, Fanny, Colette et Johann merci pour tous ces bons moments qu'on a vécu ensemble, j'espère qu'il y en aura encore beaucoup. Arthur, merci pour ton soutien constant et pour les heures de relecture.

Je remercie enfin ma mère, mon père, mon frère et Marie : le parcours a été semé d'embûches et sans votre soutien sans faille je ne pourrais pas en être là aujourd'hui. Merci de croire en moi même quand je n'y arrive plus.



## **Résumé**

La contamination de populations civiles et militaires via l'utilisation d'armes chimiques est un risque actuel et important. De plus, l'exposition à des chimiques toxiques industriels relargués dans l'atmosphère lors d'accidents peut aussi être source de contamination systémique. De par leurs propriétés physicochimiques, certains agents vont entraîner une contamination par la voie cutanée. La décontamination doit intervenir le plus tôt possible pour retirer l'agent contaminant et ainsi diminuer son passage à travers la peau. Différents produits peuvent assurer ce rôle, dont la terre de foulon, argile possédant une forte capacité adsorbante lorsqu'elle est utilisée sous forme de poudre. L'objectif de ce travail a consisté à développer une formulation innovante à base de terre de foulon, afin d'améliorer son pouvoir décontaminant et d'élargir son champ d'utilisation.

Par la mise en place d'une méthodologie de diffusion *ex vivo* avec le dispositif Vitropharma®, l'étude de la pénétration de simulants de composés organophosphorés et de l'ypérite a été possible. L'évaluation de l'efficacité de décontamination de suspensions aqueuses de terre de foulon a ainsi permis de valider la peau de cochon comme modèle prédictif de la peau humaine pour les études de pénétration percutanée. La comparaison du pouvoir décontaminant de différentes argiles sous forme de poudres et de suspensions, ainsi que l'utilisation de différents simulants ont mis en évidence une relation entre décontamination, surface spécifique et capacité de gonflement de l'argile. Par ailleurs, l'importance du stratum corneum comme compartiment réservoir du contaminant a été mise reconfirmée. Cette nouvelle méthode de décontamination a également été évaluée sur un modèle de peau lésée, et une modification de la formulation a été initiée pour obtenir un hydrogel.

Mots clés : terre de foulon, décontamination cutanée, suspension, paraoxon, salicylate de méthyle, diffusion *ex vivo*

## **Abstract**

The contamination of civilian and military populations through the use of chemical weapons is a current and important risk. In addition, exposure to toxic industrial chemical released into the atmosphere during accidents can also be a source of systemic contamination. Due to their physicochemical properties, some agents will cause contamination through the skin. Decontamination must be carried out as soon as possible to remove the contaminating agent and thus reduce its penetration through the skin. Various products can play this role, including Fuller's earth, a clay with a high adsorbent capacity when used in powder form. The objective of this work was to develop an innovative formulation based on Fuller's earth, in order to improve its decontaminating power and broaden its field of use.

By setting up an *ex vivo* diffusion methodology with the Vitropharma® device, the study of the penetration of organophosphorus and mustard gas simulants was possible. Thus the evaluation of the decontamination efficiency of aqueous suspensions of Fuller's earth made it possible to validate pig skin as a predictive model of human skin for percutaneous penetration studies. The comparison of the decontamination power of different clays in powder and suspension forms, as well as the use of different simulants, revealed a relationship between decontamination, specific area and swelling capacity of the clay. Furthermore, the importance of the stratum corneum as a reservoir compartment for the contaminant was reconfirmed. This new decontamination method was also evaluated on an injured skin model, and a modification of the formulation was initiated to obtain an innovative hydrogel.

Keywords : Fuller's earth, skin decontamination, suspension, paraoxon, methyl salicylate, *ex vivo* diffusion

## **Table des matières**

<b>Introduction générale</b> -----	<b>23</b>
<b>Etude bibliographique</b> -----	<b>27</b>
1. Les chimiques de guerre et leurs analogues -----	29
1.1. Usage historique et différents agents-----	29
1.1.1. Historique des chimiques de guerre -----	29
1.1.2. Classification des agents chimiques -----	31
1.1.2.1. Les agents d'empêchement-----	31
1.1.2.2. Les agents létaux-----	31
1.2. Les composés organophosphorés -----	33
1.2.1. Les pesticides -----	34
1.2.2. Les agents chimiques de guerre classiques -----	35
1.2.3. Les Novitchoks-----	36
1.2.4. Les simulants-----	37
1.3. Intoxication aux composés organophosphorés -----	38
1.3.1. Physiologie-----	38
1.3.2. Toxidrome-----	42
1.3.3. Antidotes et traitements-----	45
2. La décontamination cutanée -----	53
2.1. La peau -----	53
2.1.1. Histologie -----	53
2.1.1.1. L'épiderme -----	54
2.1.1.2. La jonction dermo épidermique -----	57
2.1.1.3. Le derme-----	58
2.1.1.4. L'hypoderme -----	59
2.1.1.5. Les annexes cutanées -----	59
2.1.2. Rôles physiologiques -----	60
2.1.2.1. Barrière physique-----	60
2.1.2.2. Barrière mécanique -----	61
2.1.2.3. Barrière contre la perte en eau-----	62
2.1.2.4. Barrière immunologique et antibactérienne -----	63
2.1.2.5. Barrière thermique-----	64
2.1.2.6. Barrière contre les rayonnements UVs-----	64
2.1.2.7. Fonction sensorielle-----	64
2.1.3. Mécanismes et voies d'absorption-----	65
2.1.3.1. Voies d'absorption-----	65

2.1.3.2. Cinétique d'absorption-----	66
2.2. Principes de la décontamination-----	68
2.2.1. Mise en place de la décontamination de masse-----	69
2.2.2. La décontamination individuelle -----	72
2.2.2.1. La décontamination sèche-----	72
2.2.2.2. La décontamination humide-----	74
2.2.3. Modèles d'étude disponibles au laboratoire -----	76
2.2.3.1. Modèles <i>ex vivo</i> -----	76
2.2.3.2. Modèles <i>in vivo</i> -----	79
3. Les argiles et la décontamination innovante -----	85
3.1. Les argiles-----	85
3.1.1. Structure -----	85
3.1.2. Classification -----	88
3.1.2.1. Argiles 1 :1 -----	89
3.1.2.2. Argiles 2 :1 -----	90
3.1.2.3. Argiles 2 :1 :1 -----	91
3.1.2.4. Argiles intercalées-----	91
3.1.2.5. Argiles fibreuses -----	91
3.1.3. Propriétés-----	93
3.1.3.1. Phénomènes de sorption -----	93
3.1.3.2. Capacité d'échange des cations -----	94
3.1.3.3. Gonflement des argiles-----	95
3.1.3.4. Interactions-----	96
3.1.3.5. Modification des argiles -----	96
3.1.4. Utilisation-----	96
3.1.4.1. Détoxification -----	97
3.1.4.2. Agent de texture -----	98
3.1.4.3. Dermatologie et cosmétique -----	98
3.2 Méthodes innovantes de décontamination cutanée-----	99
3.2.1. Décontaminants à base de terre de foulon -----	100
3.2.2. Décontaminants à base d'oxydes métalliques -----	101
3.2.2.1. Oxyde de zirconium -----	101
3.2.2.2. Oxyde de cérium-----	101
3.2.2.3. Oxyde de titane -----	101
3.2.2.4. Oxyde de zinc -----	102
3.2.2.5. Oxyde de zinc titane -----	102
3.2.3. Décontamination des peaux lésées -----	102

3.2.4. Autres systèmes de décontamination	103
3.2.4.1. Méthode enzymatique	103
3.2.4.2. Utilisation des cyclodextrines	103
3.2.4.3. Modification de la galénique	104
<b>Présentation du projet de recherche</b>	<b>105</b>
<b>Résultats</b>	<b>111</b>
1. Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine et humaine	113
1.1. Introduction	113
1.2. Article	113
1.3. Discussion	130
2. Comparaison de deux phyllosilicates pour la décontamination du Paraoxon sur des explants de peau porcine	135
2.1. Introduction	135
2.2. Matériels et méthodes	136
2.3. Résultats	140
2.4. Discussion	147
2.5. Conclusion	148
3. Décontamination du salicylate de méthyle avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine	151
3.1. Introduction	151
3.2. Matériels et méthodes	152
3.3. Résultats	154
3.4. Discussion	158
3.5. Conclusion	159
4. Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine lésée	161
4.1. Introduction	161
4.2. Matériels et méthodes	162
4.3. Résultats	165
4.4. Discussion	174
4.5. Conclusion	176
<b>Discussion générale et perspectives</b>	<b>177</b>
1. Discussion générale	179
1.1. Méthodologie pour l'étude de la diffusion <i>ex vivo</i>	179
1.2. Intérêt de la peau de cochon	180
1.3. Les argiles pour la décontamination cutanée	182

1.4. Optimisation de la formulation-----	184
2. Perspectives-----	186
<b>Conclusions générales -----</b>	<b>189</b>
<b>Annexes -----</b>	<b>193</b>
Caractérisation minérale de la terre de foulon au Synchrotron SOLEIL -----	194
Ligne directrice 428 de l'OCDE – Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques -----	212
Développement et caractérisation d'un modèle de souris avec un psoriasis pour l'évaluation de traitements -----	222
<b>Références bibliographiques -----</b>	<b>247</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Structures moléculaires des agents suffocants. -----	31
Figure 2 : Structures moléculaires des agents hémotoxiques. -----	32
Figure 3 : Structures moléculaires des agents vésicants. -----	32
Figure 4 : Structure commune aux composés organophosphorés. -----	33
Figure 5 : Structure de composés organophosphorés utilisés comme pesticides. -----	35
Figure 6 : Structures moléculaires des agents neurotoxiques de la série G. -----	36
Figure 7 : Structures moléculaires des agents neurotoxiques de la série V. -----	36
Figure 8 : Structure supposée des Novichoks. -----	37
Figure 9 : Physiologie de la libération et de l'action de l'acétylcholine au niveau des synapses nerveuses après action sur les récepteurs nicotiques et muscariniques. -----	40
Figure 10 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase. -----	41
Figure 11 : Inhibition de l'acétylcholinestérase par un composé organophosphoré. -----	41
Figure 12 : Signes cliniques de l'empoisonnement aux composés organophosphorés. -----	43
Figure 13 : Acétylcholinestérase inhibée par le sarin et réactivée par la pralidoxime. -----	47
Figure 14 : Reconstitution et administration de la seringue Ineurope®. -----	48
Figure 15 : Stratégies de prétraitement pour l'empoisonnement aux composés organophosphorés. -----	50
Figure 16 : Structures chimiques des principaux réactivateurs d'acétylcholinestérase avec un noyaux pyridinium aldoxime. -----	51
Figure 17 : Morphologie de la peau: présentation des différentes couches cutanées et des annexes cutanées. -----	53
Figure 18 : Différentes couches composant l'épiderme. -----	56
Figure 19 : Présentation des différents types cellulaires composant l'épiderme. -----	57
Figure 20 : Différents types d'organisation des lipides dans le stratum corneum. -----	61
Figure 21 : Lignes de Langer définies par les fibres de collagène dans le derme. -----	62
Figure 22 : Différentes voies d'absorption cutanée à travers le stratum corneum. -----	66
Figure 23 : Cinétique d'absorption cutanée lors d'une application topique. -----	67
Figure 24 : Zonage réalisé lors d'un évènement CRBN conformément à la circulaire 700-SGDN-PSE-PSS Moyens de secours pour attaque terroriste chimique. -----	69
Figure 25 : Papier détecteur PDF1. -----	70
Figure 26 : Exemple d'un équipement de protection individuelle avec une pompe à air utilisé par l'Armée Américaine. -----	70
Figure 27 : Décontamination de masse à l'aide du système de propulsion d'eau à grande échelle. -----	71
Figure 28 : Gant poudreux contenant de la terre de foulon pour la décontamination sèche.-	73
Figure 29 : Décontamination humide d'une surface contaminée avec de l'eau additionnée de surfactant. -----	75
Figure 30 : Kit de reactive skin decontamination lotion (RSDL) pour la décontamination cutanée humide. -----	76
Figure 31 : Cellule de diffusion ex vivo statique. -----	78
Figure 32 : Utilisation du modèle du poisson zèbre in vivo pour les tests sur les composés chimiques de guerre. -----	81
Figure 33 : Tétraèdre de $\text{SiO}_4^{4-}$ composant l'unité de base des feuillets tétraédriques des phyllosilicates. -----	86
Figure 34 : Feuille tétraédrique composé d'unités $\text{SiO}_4^{4-}$ orientées dans la même direction. -----	86
Figure 35 : Octaèdre de $\text{AlO}_6^{9-}$ composant l'unité de base des feuillets octaédriques des phyllosilicates. -----	87
Figure 36 : Feuille dioctaédrique composé d'unités $\text{AlO}_6^{9-}$ formant une surface plane. -----	87
Figure 37 : Diagramme présentant l'argile à différents niveaux. -----	88

Figure 38 : Structure des couches de la kaolinite de la famille des argiles 1:1.-----	89
Figure 39 : Structure des couches des argiles 2 :1 lorsque le feuillet central est dioctaédrique. -----	90
Figure 40 : Structure des couches des argiles 2 :1 :1 avec un feuillet inter-couche gibbsite.	91
Figure 41 : Structure en ruban des argiles fibreuses et taille des canaux A = palygorskite ; B = sépiolite. -----	92
Figure 42: Comparaison des phénomènes d'adsorption et d'absorption de particules en suspension à la surface d'un solide.-----	94
Figure 43 : Réalisation des expériences de diffusion cutanée <i>ex vivo</i> . -----	132
Figure 44 : Coloration à l'hématoxyline-éosine et observation au microscope optique de coupes de peau A = peau abdominale humaine, B = peau d'oreille porcine. -----	133
Figure 45: Toxicité <i>in vitro</i> des surnageants de suspension d'argile X réalisées dans du PBS 1X et passées sur des filtres à 0,22 µm : évaluation du des kératinocytes humains primaires (HPK) et des fibroblastes normaux dermiques humains (NHDF) (n=4). -----	141
Figure 46: Observations au microscope de la morphologie de <i>Danio rerio</i> à 4 jours. -----	141
Figure 47: Taux de survie des <i>Danio rerio</i> avec l'apparition ou non d'anomalies morphologiques et distance moyenne parcourue suite à un stimulus lumineux après 4 jours d'immersion.-----	142
Figure 48 : Pénétration <i>ex vivo</i> du POX à travers une peau de cochon pendant 24h, sans décontamination et avec une décontamination à l'eau ou avec des argiles en poudre après 30 minutes d'exposition.-----	143
Figure 49 : Pénétration <i>ex vivo</i> du POX à travers une peau de cochon pendant 24h avec une décontamination sèche sous forme de poudre ou humide avec de l'eau et des suspensions d'argile X (5%, 9,1% et 15%) 30 minutes après l'exposition. -----	145
Figure 50 : Représentation schématique de la palygorskite et d'une argile gonflante sous forme de poudre et en suspension.-----	148
Figure 51 : Comparaison des profils cinétiques de la pénétration <i>ex vivo</i> du paraoxon (n=6) et du salicylate de méthyle (n=5) à travers une peau de cochon pendant 24h.-----	155
Figure 52 : Pénétration <i>ex vivo</i> du salicylate de méthyle à travers une peau de cochon pendant 24h, sans décontamination et avec une décontamination à l'eau ou avec de la terre de foulon en poudre après 30 minutes d'exposition. -----	156
Figure 53 : Pénétration <i>ex vivo</i> du salicylate de méthyle à travers une peau de cochon pendant 24h avec une décontamination à l'eau ou avec de la terre de foulon sous forme de poudre ou de suspensions (5%, 9.1% et 15%) après 30 minutes d'exposition.-----	157
Figure 54 : Observations au microscope d'explants de peau de cochons colorés à l'hématoxyline-éosine (barre d'échelle = 200 µm pour chaque image). A = Contrôle sans lésion ; B = Observation des lésions cutanées par l'application d'un plot chauffé à 60°C, 70°C ou 80°C pendant 20 secondes ou 60 secondes.-----	167
Figure 55 : Pénétration <i>ex vivo</i> du POX sans décontamination pendant 24h à travers une peau de cochon saine et une peau lésée par brûlure. A = Cinétique de pénétration du POX à travers la peau saine (n=6) et la peau lésée (n=4) pendant 24h.-----	168
Figure 56 : Pénétration <i>ex vivo</i> du POX à travers une peau de cochon (lésée par une brûlure du second degré) pendant 24h avec une décontamination avec de la terre de foulon sous forme de poudre, de l'eau ou des suspensions de terre de foulon (5%, 9,1% et 15%) 30 minutes après l'exposition.-----	170
Figure 57 : Aspect des différentes formulations d'hydrogels à température ambiante (20°C) et après incubation 30 minutes à 37°C. -----	172
Figure 58 : Evaluation de la toxicité <i>in vitro</i> des polymères pour la formulation des hydrogels sur des fibroblastes normaux dermiques (NHDF) (n=6). -----	173
Figure 59 : Gourde souple pouvant servir de réservoir pour la délivrance d'une méthode de décontamination cutanée innovante sous la forme d'un hydrogel.-----	187

## Liste des tableaux

Tableau 1: Classification des agents chimiques selon leur mode d'action et leurs effets physiologiques. -----	33
Tableau 2: Toxicité cutanée d'agents neurotoxiques de la série G, série V et de la famille des Novichoks. -----	37
Tableau 3: Comparaison des propriétés physiques et chimiques du VX avec 2 de ses simulants : le parathion et le paraoxon. -----	38
Tableau 4: Evolution des signes cliniques en fonction de la degré d'empoisonnement aux composés organophosphorés. -----	44
Tableau 5: Prise en charge des crises épileptiques avant l'installation d'un état de mal épileptique d'après la fiche Piratox n°4 de l'Afssaps. -----	46
Tableau 6: Posologies pour le traitement par sulfate d'atropine dans le cadre d'une intoxication aux composés organophosphorés d'après la fiche Piratox n°4 de l'Afssaps. ----	46
Tableau 7: Posologies pour le traitement par le méthylsulfate de pralidoxime Contrathion® dans le cadre d'une intoxication aux composés organophosphorés d'après la fiche Piratox n°4 de l'Afssaps. -----	48
Tableau 8: Comparaison des avantages et inconvénients des différents modèles ex vivo pour l'étude de la décontamination cutanée. -----	79
Tableau 9: Comparaison des avantages et inconvénients des différents modèles in vivo pour l'étude de la décontamination cutanée. -----	83
Tableau 10: Comparaison des minéraux argileux et des argiles. -----	85
Tableau 11: Résumé des principales familles de silicates et de leurs caractéristiques. -----	92
Tableau 12: Participation de la surface interne et de la surface externe des particules d'argile à la surface spécifique. -----	93
Tableau 13: Comparaison de la capacité d'échange des cations de différentes argiles. ----	95
Tableau 14: Principales utilisations des alumino-silicates en cosmétique et dermocosmétique. -----	99
Tableau 15: Evaluation de différentes méthodes de décontamination du 4-cyanophénol sur de la peau de cochon. -----	100
Tableau 16: Efficacité de décontamination du DDGel et de la RSDL lors d'une contamination ex vivo de peau humaine avec du 2-CEES. -----	101
Tableau 17: Pourcentage de la dose de paraoxon déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé à la surface cutanée, dans le stratum corneum et dans le compartiment récepteur en fonction de la méthode de décontamination.-----	144
Tableau 18: Pourcentage de la dose de paraoxon déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé dans le compartiment récepteur en fonction de la nature de l'argile et de la concentration de la suspension utilisée pour la décontamination	145
Tableau 19: Evaluation de la terre de foulon et de l'argile X comme argiles pour la décontamination, d'après l'efficacité de décontamination in vitro, le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel et le pourcentage de POX retrouvé dans le SC après 24h d'exposition -----	146
Tableau 20: Présentation des principales différences entre la terre de foulon et l'argile X dans le cadre de la décontamination cutanée aux composés organophosphorés. -----	149
Tableau 21: Propriétés physicochimiques de l'ypérite et de deux de ses simulants : le 2-chloroethyl ethyl sulfide (2-CEES) et le salicylate de méthyle. -----	152

Tableau 22: Pourcentage de la dose de salicylate de méthyle déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé à la surface cutanée, dans le stratum corneum et dans le compartiment récepteur, en fonction du type de décontamination. ----	156
Tableau 23: Pourcentage de la dose de salicylate de méthyle déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé dans le compartiment récepteur et au total, en fonction du type de décontamination. -----	158
Tableau 24: Evaluation de la terre de foulon pour la décontamination du salicylate de méthyle, d'après l'efficacité de décontamination <i>in vitro</i> et le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel après 24h d'exposition. -----	158
Tableau 25: Evaluation de l'eau et de la terre de foulon sous différentes formes pour la décontamination de la peau lésée, d'après l'efficacité de décontamination <i>in vitro</i> et le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel après 24h d'exposition. -----	171

## **Liste des abréviations**

2-CEES : 2-chloroethyl ethyl sulfide  
AC : Cyanure d'hydrogène  
ACh : Acétylcholine  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AChE : Acétylcholinestérase  
Afssaps : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé  
ALAT : Alanine aminotransférase  
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé  
APACHE II: Acute physiology and chronic health evaluation  
ASAT : Aspartate aminotransférase  
BChE : Butyrylcholinestérase  
BHE : Barrière hémato encéphalique  
CEC : Capacité d'échange des cations  
CG : Phosgène  
CK : Chlorure de cyanogène  
COP : Composés organophosphorés  
CVX : Agent VX chinois  
DCP : Chlorophosphate de diéthyle  
DDGel : Dermal decontamination gel  
DIMP : Méthylphosphonate de diisopropyle  
DL<sub>50</sub> : Dose létale 50  
DL<sub>75</sub> : Dose létale 75  
DP : Diphosgène  
ED : Efficacité de décontamination  
FDA : Food and Drug Agency  
GA: Tabun  
GB: Sarin  
GD: Soman  
GF: Cyclosarin  
HD: Ypérite  
HPK: Kératinocytes humains primaires  
HuBChE : Human butyrylcholinestérase  
IL: Interleukine  
JDE: Jonction dermo-épidermique  
MSB : Mécanorécepteur à seuil bas  
L : Lewisite  
NHDF : Fibroblastes normaux dermiques humains  
NMF : Natural moisturizing factors  
NRBC : Nucléaire, Radiologique, Biologique et Chimique  
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques  
OIAC : Organisation pour l'interdiction des armes chimiques  
OPP : Pesticides organophosphorés  
PF : Pronostic fonctionnel  
pH : Potentiel d'hydrogène  
PIE: Perte insensible en eau  
POX : Paraoxon

PRV : Point de regroupement des victimes  
PS : Chloropicrine  
PSS : Poisoning severity score  
QSAR : Quantitative structure activity relationship  
QSPR : Quantitative structure permeability relationship  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
RSDL : Reactive skin decontamination lotion  
SC : Stratum corneum  
SNC : Système nerveux central  
SOFA : Sequential organ failure assessment  
TEWL : Transepidermal water loss  
TF: Terre de foulon  
TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha  
UVs : Ultraviolets  
VR : Agent VX russe  
VX: Agent neurotoxique VX

## **Liste des articles**

### **Accepté**

Jabeen M., Boisgard A.-S., **Danoy A.**, El Kholti N., Salvi J.-P., Boulieu R., Fromy B., Verrier B. & Lamrayah M. Advanced characterization of imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. *Pharmaceutics*, 2020.

### **Soumis et en correction**

**Danoy A.**, Durmaz K., Paoletti M., Vachez L., Roul A. & Verrier B. Aqueous suspensions of Fuller's earth potentiate the adsorption capacities of organophosphorus compound and improve skin decontamination properties. *Journal of Hazardous Materials*.

Roul A., **Danoy A.**, Elkaim E., Dumas P., Haftek M., Pirot F. & Verrier B. Characterization of Fuller's earth used in skin decontamination by optical and synchrotron radiation technologies. *Applied Clay Science*.

## **Liste des communications**

### **2019**

**CBRNE Research and innovative conference** 2019, Nantes. Poster: *Skin decontamination efficiency against organophosphorus compounds: comparison between two clays.*

**Skin and formulation symposium** 2019, Reims. Poster: *Fuller's earth: from a dry powder to an innovative formulation for skin decontamination.*

### **2020**

**Master Sciences du médicament et des produits de santé – Parcours ciblage thérapeutique et épithélium**, 2020, Lyon. Communication : *Contaminants chimiques et décontamination cutanée.*

---

# **Introduction générale**

---



Le présent document synthétise l'ensemble des travaux réalisés au sein de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé (EDISS 205) de l'Université de Lyon. Ce projet de thèse a été mis en place afin de poursuivre les travaux menés par Annick Roul au sein du laboratoire (2014-2018) portant sur « (L') Exposition de la peau aux produits chimiques : méthodologie et évaluation de la décontamination par la terre de foulon ». En effet, la Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique (MRIS) de la Direction Générale de l'Armement (DGA) identifie des thématiques prioritaires lors des appels à projets annuels, dont celle de la décontamination corporelle au moyen de nouvelles formulations et galéniques de solutions liquides.

Ce manuscrit s'intéresse dans un premier temps à un état de l'art de 3 thématiques identifiées comme capitales pour appréhender le projet. Dans un premier temps l'utilisation des chimiques de guerre et de leurs analogues au cours des conflits est traitée avant de détailler la classification des différents composés. Une attention particulière est accordée aux composés organophosphorés ainsi qu'aux mécanismes impliqués dans le développement du toxidrome lors d'une exposition cutanée. La seconde partie de l'étude bibliographique traite de la structure de la peau et des rôles physiologiques qui en découlent, avant de détailler les différentes méthodes de décontamination cutanées disponibles à l'heure actuelle. La décontamination individuelle sèche est notamment opposée à la décontamination humide. Enfin un dernier chapitre détaille la structure des différentes familles d'argiles pour expliquer leurs propriétés, notamment la sorption exploitée pour la décontamination sèche. Des méthodes innovantes de décontamination cutanée développées au cours des vingt dernières années sont présentées afin de comparer l'innovation technologique apportée par notre projet.

La présentation du projet de recherche traitant du développement et de l'évaluation *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de formulations innovantes d'argiles afin de proposer un nouveau dispositif de décontamination cutanée, est réalisée d'après les données présentées dans la partie bibliographique. En effet le risque de contamination cutanée est toujours présent et peut être diminué à l'aide de diverses méthodes de décontamination cutanée qui présentent chacune des avantages et des inconvénients.

La partie des résultats est hiérarchisée en 4 chapitres qui utilisent une méthodologie commune pour l'évaluation des formulations décontaminantes à travers l'utilisation d'un nouveau dispositif d'étude de la diffusion cutanée *ex vivo*, basé sur le principe des cellules de Franz pour la diffusion statique. Chaque chapitre se distingue du précédent par la variation de l'origine de la peau utilisée pour l'expérience (peau de cochon VS peau humaine), l'évaluation d'une nouvelle argile pour la décontamination cutanée ou l'utilisation de molécules contaminantes avec différentes spécificités physiques. Le dernier chapitre propose une

innovation supplémentaire avec le développement d'un modèle de peau lésée et d'une nouvelle formulation décontaminante associée.

La discussion générale permet de comparer les résultats obtenus dans les différents chapitres avec la littérature disponible sur le sujet avant de présenter les perspectives du projet qui seront poursuivies au sein de l'équipe. Enfin la conclusion met en lumière les principales avancées apportées par ce travail de thèse, notamment dans la méthodologie pour la réalisation des tests de décontamination cutanée *ex vivo* et l'utilisation de suspensions d'argiles.

---

# **Etude bibliographique**

---

- 1. Les chimiques de guerre et leurs analogues**
- 2. La décontamination cutanée**
- 3. Les argiles et la décontamination innovante**



# 1. Les chimiques de guerre et leurs analogues

## 1.1. Usage historique et différents agents

### 1.1.1. *Historique des chimiques de guerre*

La plus ancienne trace d'utilisation des armes chimiques remonte à la fin de l'Age de pierre, il y a plus de 10 000 ans (Salem et al., 2019), lorsque les chasseurs enduisaient leurs flèches de poisons d'origine animale (scorpions, serpents venimeux) ou végétale. Les composés chimiques toxiques pour la guerre ont été développés très tôt puisque l'usage de fumées toxiques et irritantes en 2000 avant notre ère par des soldats indiens a été décrit. Avec l'évolution des connaissances scientifiques, différents composés ont permis l'apparition de la guerre chimique comme par exemple l'utilisation d'une préparation à base de soufre par les Byzantins pour la défense de Constantinople en 673 (Haines & Fox, 2014) ou la préparation de bombes au soufre et à l'aconit (alcaloïde puissant qui agit au niveau du système nerveux central (SNC) entraînant une paralysie) aux environs de l'an 1000 par les mongols. La plupart des agents chimiques de guerre ont été découverts au cours des XVIIIème et XIXème siècles : dichlore (1774), cyanure d'hydrogène (1782), chlorure de cyanogène (1802), phosgène (1812), gaz moutarde également appelé ypérite (1882), chloropicrine (1848). L'usage de ces composés, bien que sporadique, donne lieu à la première conférence de la paix à La Haye en 1899 qui va règlementer et bannir l'usage de poisons ou d'armes empoisonnées (Black, 2016). Malgré la ratification de la convention, la première grande utilisation des agents de guerre létaux a lieu le 22 avril 1915 avec la dispersion de dichlore sous forme de gaz par les Allemands, entraînant des lésions aux poumons pour les soldats français et canadiens exposés (Szinicz, 2005). La guerre chimique franchit un nouveau cap à Ypres le 12 juillet 1917 lorsque les militaires allemands utilisent contre les Britanniques l'ypérite, entraînant la formation de bulles au niveau de la peau et la destruction du tractus respiratoire par les vapeurs. Au cours de ce conflit, plus de 200 000 tonnes d'agents chimiques de guerre ont été produites par les grandes puissances impliquées (Allemagne, France, Royaume-Uni, Russie, Etats-Unis) (Pitschmann, 2014) mais environ 125 000 tonnes ont été utilisées faisant 1,25 million de victimes dont 10% de morts. Dans la période de l'entre-deux-guerres des chimistes allemands développent des composés organophosphorés (COP) comme pesticides pour l'usage agricole puis comme armes de guerre à partir du tri-éthyl phosphate synthétisé en 1848 par Franz Anton Vögeli (Lorke & Petroianu, 2019). Lors de la Seconde Guerre mondiale le sarin, le tabun et le soman développés entre 1936 et 1944 ne seront pas utilisés massivement par dissémination aérienne comme lors de la Première Guerre mondiale car le risque de dommages collatéraux est trop important (Haines & Fox, 2014) et parce que les forces Alliées disposent d'une importante capacité d'intimidation. Au cours de ce conflit il n'y a pas d'attaque chimique à proprement parler, mais pour la première fois les armes chimiques sont utilisées

directement contre la population civile avec le Zyklon B (monoxyde de carbone et cyanure d'hydrogène) dans les chambres à gaz (Black, 2016). Après la Seconde Guerre mondiale, la recherche chimique s'est centrée sur les agents neurotoxiques et le développement des agents de la classe V par les Européens, des agents binaires par les Etats-Unis et d'une quatrième génération d'agents appelés Novichoks par les Russes (Pitschmann, 2014). A l'exception de la guerre Iran-Irak, les conflits modernes n'ont pas entraîné l'utilisation massive d'armes chimiques. Leur usage a été détourné contre les civils notamment par des groupes terroristes : par exemple le groupe Aum Shinrikyo a dispersé du sarin en 1994 à Matsumoto et dans le métro de Tokyo en 1995 entraînant une vingtaine de morts (Haines & Fox, 2014). La fin du XXème siècle est marquée par la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques, signée en janvier 1993 et appliquée par 192 pays en avril 1997, qui définit l'interdiction de développement, de production, de stockage et d'utilisation d'armes chimiques (Worek et al., 2016). Cette convention décrit une arme chimique comme « tout élément ou dispositif spécifiquement conçu ou prévu pour être utilisé en liaison directe avec la diffusion d'un agent chimique pour entraîner la mort ou des dommages corporels ». Cette définition s'applique à 3 éléments distincts d'après la fiche documentaire 4 de l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC) :

- les produits chimiques toxiques : tout produit chimique qui par son action sur des processus biologiques peut provoquer chez les êtres humains ou les animaux la mort, une incapacité temporaire ou des dommages permanents ; ou les précurseurs qui correspondent à tout réactif. Pour les produits à double usage, à la fois civil et militaire, il faut appliquer le critère d'utilisation générale pour savoir s'ils sont considérés comme arme chimique.

- les munitions ou dispositifs spécialement conçus pour provoquer des dommages ou entraîner la mort par libération de produits chimiques toxiques : définis comme arme chimique si la conception et la fabrication ont été réalisées pour répondre à ce but.

- l'équipement : il est en liaison directe avec l'emploi de munitions et de dispositifs ; le principe de la spécificité de la conception s'applique pour le qualifier d'arme chimique.

Le double usage de nombreux produits tels que le chlore utilisé comme réactif industriel ou les organophosphorés comme insecticides et herbicides rend impossible l'élimination des armes chimiques de guerre (Sydnes, 2018). L'usage contemporain de ces chimiques reste majoritairement pour de la menace terroriste avec diverses voies de contamination (par contact, aérosolisation, empoisonnement de la nourriture ou de l'eau, utilisation de bombes sales) (Pitschmann, 2014) : en 2016 plus de 13 400 attaques terroristes ont été recensées, faisant plus de 34 000 morts (Ciottone, 2018).

### 1.1.2. Classification des agents chimiques

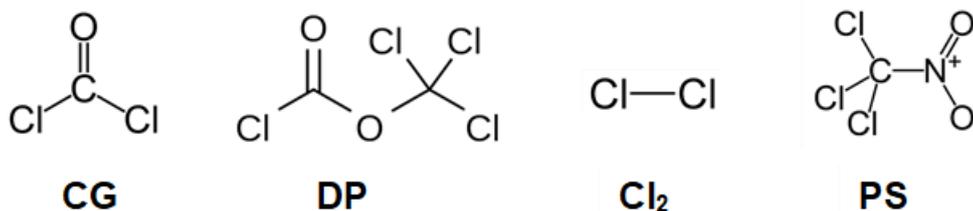
Les armes chimiques de guerre peuvent être classées selon différents critères : leur effet incapacitant, neutralisant ou mortel ; leurs propriétés physico-chimiques (persistance, volatilité, hydro solubilité, tension de surface) ; leur mode d'action (absorption par les poumons, les muqueuses ou la peau) et leurs effets physiologiques (Black, 2016). La classification proposée ici repose sur l'effet incapacitant ou mortel des armes chimiques ainsi que sur leurs effets physiologiques et biologiques (Pacsial-Ong & Aguilar, 2013) (**Tableau 1**).

#### 1.1.2.1. Les agents d'empêchement

Ils correspondent aux **agents de lutte anti-émeute** tels que le gaz lacrymogène et le gaz poivré. Ils sont décrits comme « tout produit chimique qui n'est pas inscrit à un tableau et qui peut provoquer rapidement chez les êtres humains une irritation sensorielle ou une incapacité physique disparaissant à brefs délais après qu'a cessé l'exposition » d'après la fiche documentaire 4 de l'OIAC. Ils sont utilisés sous forme d'aérosols liquides ou solides et leur persistance est faible ce qui explique une absorption majoritaire par les poumons et les yeux. Leur effet va être rapide avec une forte douleur conséquente à la libération de substance P ainsi que des effets plus sévères pour une exposition à de fortes doses : complications ophtalmiques, effets respiratoires au long terme, irritations cutanées avec apparition de bulles et érythèmes.

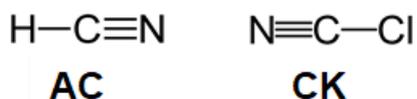
#### 1.1.2.2. Les agents létaux

Les **agents suffocants** : le phosgène, le diphosgène, le dichlore et la chloropicrine (**Figure 1**) sont des agents avec une faible persistance, diffusés sous forme de gaz ce qui permet une absorption par les poumons. Après inhalation des dégâts membranaires vont se créer tout au long du tractus respiratoire causant des lésions pulmonaires puis une infiltration de liquide menant à un œdème pulmonaire puis à la mort par asphyxie.



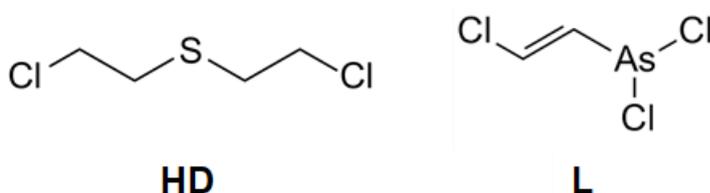
**Figure 1 :** Structures moléculaires des agents suffocants: Phosgène (CG), Diphosgène (DP), Dichlore (Cl<sub>2</sub>) et Chloropicrine (PS).

Les **agents hémotoxiques** : le cyanure d'hydrogène et le chlorure de cyanogène (**Figure 2**) sont des gaz caractérisés par la présence d'un groupe cyanure C≡N dans leur structure. Après une absorption rapide par les poumons, les agents sont distribués dans le sang et le tissu sanguin se retrouve incapable d'utiliser l'oxygène disponible suite à une inhibition du cytochrome aa3 menant à une asphyxie de l'individu.



**Figure 2** : Structures moléculaires des agents hémotoxiques: Cyanure d'hydrogène (AC) et Chlorure de cyanogène (CK).

Les **agents vésicants** : l'ypérite et la lewisite (**Figure 3**) sont des agents avec une persistance élevée qui engendrent des lésions cutanées de type brûlures et cloques après la contamination. Les effets systémiques sont quant à eux retardés car ils apparaissent plusieurs heures après l'exposition, entraînant une destruction des tissus. Ces produits sont redoutables en tant qu'armes chimiques car ils sont peu solubles dans l'eau ce qui rend difficile la décontamination, et leur pouvoir de pénétration dans les matériaux est élevé.



**Figure 3** : Structures moléculaires des agents vésicants : Ypérite (HD) et Lewisite (L).

Les **agents neurotoxiques** : cette famille d'armes chimiques est composée de 4 générations d'agents, qui ont tous en commun d'être des COP. La première génération d'agent a été formulée par les allemands dans les années 30 donc il s'agit de la série G (pour German) : les composés ont une forte volatilité ce qui permet une action très rapide suite à une inhalation. La série V a été développée par les forces Alliées au cours des années 1950 : la persistance des agents a été augmentée pour favoriser la voie percutanée comme mode de contamination. Les agents binaires sont constitués de deux composés chimiques qui ne présentent aucun danger séparément mais qui se combinent lors de la délivrance pour former un agent toxique létal.

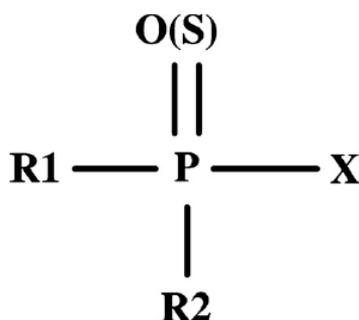
La quatrième génération d'agents neurotoxiques correspond aux Novitchoks : il s'agit des composés les plus toxiques, synthétisés par des scientifiques soviétiques dans les années 1970.

Agents	Composés chimiques	Persistance	Vitesse d'action	Mode d'action	Effets physiologiques	Diffusion	Période de développement
<b>D'empêchement</b>							
<b>Agents de lutte anti-émeute</b>	Gaz lacrymogène Gaz poivré	Faible	Immédiate	Absorption par les poumons, les yeux et la peau	 Larmes, toux et irritation de la sphère ORL et de la peau	Liquide, aérosol	
<b>Létaux</b>							
<b>Agents suffocants</b>	Phosgène Diphosgène Dichlore Chloropicrine	Faible	Variable	Absorption par les poumons	 Accumulation de fluide dans les poumons : œdème pulmonaire et asphyxie	Gaz	Première guerre mondiale
<b>Agents hémotoxiques</b>	Cyanure d'hydrogène Chlorure de cyanogène	Faible	Rapide	Absorption par les poumons	 Tissu sanguin incapables d'utiliser l'oxygène car inhibition du cytochrome aa3	Gaz	Première guerre mondiale
<b>Agents vésicants</b>	Ypérite Moutarde à l'azote	Elevée	Retardée	Absorption par les poumons et la peau	 Brûlures sur la peau, les yeux et les muqueuses, cloques et destruction des tissus	Liquide, aérosol, vapeur et poussière	Première guerre mondiale -1930s
<b>Agents neurotoxiques</b>	Série G	Faible à modérée	Très rapide	Absorption par les poumons	 Convulsions, perte de contrôle du corps et paralysie musculaire jusqu'à la mort	Liquide, aérosol, vapeur et poussière	Deuxième guerre mondiale
	Série V	Très élevée	Rapide	Contact avec la peau			1950s-1960s
	Agents binaires						1970s-1980s
	Novitchok						1970s-1990s

**Tableau 1 :** Classification des agents chimiques selon leur mode d'action et leurs effets physiologiques d'après Pitschmann, 2014 et la fiche documentaire 4 de l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC).

## 1.2. Les composés organophosphorés

La famille des agents neurotoxiques est formée par COP : ils ont une structure commune dérivant de l'acide phosphorique ( $H_3PO_4$ ), de l'acide phosphoreux ( $H_3PO_3$ ) et de l'acide hypophosphoreux ( $H_3PO_2$ ) (Naughton & Terry, 2018) (**Figure 4**).



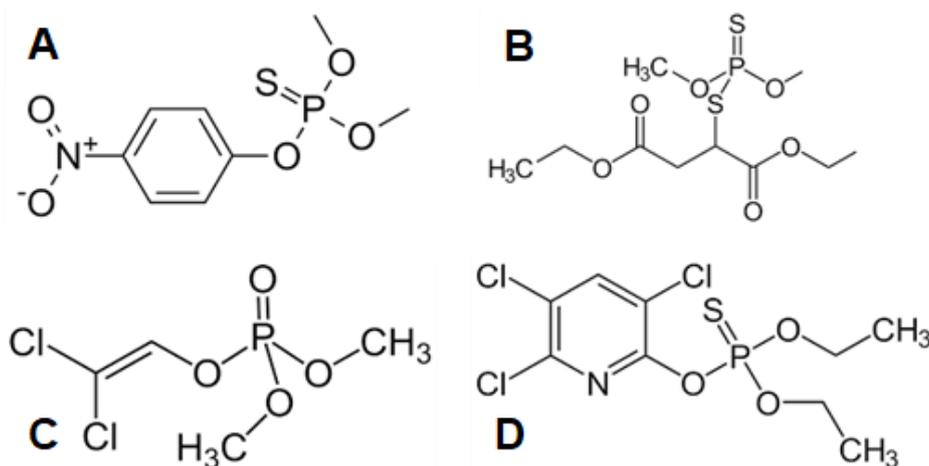
**Figure 4 :** Structure commune aux composés organophosphorés : X = déterminant majeur des classes qui est soumis à l'hydrolyse (Thabet et al., 2009).

Les COP sont parmi les chimiques synthétiques les plus détectés dans l'environnement et les tissus de par leurs nombreux usages (Naughton & Terry, 2018). Ils ont deux types d'utilisation : civile notamment à travers l'utilisation phytosanitaire et dans l'industrie agricole ; militaire depuis la Seconde Guerre mondiale et plus récemment par des groupes terroristes (Rousseau et al., 2000).

### *1.2.1. Les pesticides*

Les pesticides organophosphorés (OPP) sont largement utilisés pour réduire les maladies causées par les insectes et améliorer la qualité des fruits et des légumes (Behkami, 2019), notamment aux Etats-Unis où ils sont les pesticides les plus utilisés (Hoppin et al., 2012). Ils représentent le plus grand groupe de pesticides chimiques puisqu'ils couvrent les herbicides, fongicides, raticides et insecticides car ils sont peu chers avec une action à large spectre (Derbalah et al., 2019). Les insecticides organophosphorés les plus utilisés en usage domestique et agricole sont le chlorpyrifos et le parathion (Mandour, 2013) (**Figure 5**). Ces composés présentent une grande toxicité qui peut atteindre des organismes non visés tels que les oiseaux, les poissons ou l'Homme par différentes voies selon leurs caractéristiques : toxique par inhalation, ingestion ou contact cutané.

L'intoxication aux OPP fait chaque année environ 200 000 victimes dans le monde (K.-X. Chen et al., 2019). La contamination peut être accidentelle suite à l'ingestion de produits traités avec ces pesticides : par exemple Behkami, 2019 a déterminé la quantité de OPP dans des fruits et légumes achetés sur un marché au Canada. Les concentrations étaient deux fois plus élevées pour les fruits non pelés et non lavés ce qui traduit un risque de contamination si les produits ne sont pas bien préparés. L'exposition de la population aux toxiques peut être déterminée grâce aux eaux usées : la présence de COP était significativement inférieure en Martinique par rapport à l'Europe en 2017 (Devault et al., 2018). Pour un résultat plus précis un dosage urinaire des COP peut être réalisé pour déterminer une exposition ou une contamination alimentaire (López-Gálvez et al., 2018). L'usage de ces pesticides peut aussi entraîner une pollution de l'environnement notamment au niveau des cours d'eau à cause des propriétés physico chimiques des composés telles que leur persistance (Derbalah et al., 2019). Une évaluation du risque éco-toxicologique est nécessaire dans les zones où ces pesticides sont utilisés, en comparant la concentration mesurée dans l'environnement à la concentration prédictive sans effet. Si ce ratio est supérieur à 1 des risques pour l'environnement sont probables, avec de possibles effets sur les organismes aquatiques (algues, invertébrés et poissons).



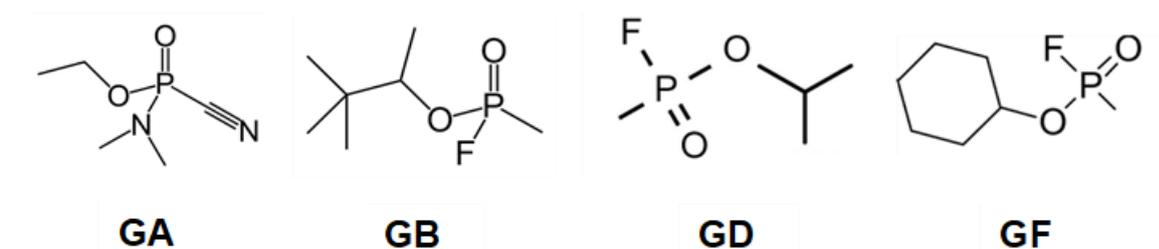
**Figure 5 :** Structure de composés organophosphorés utilisés comme pesticides : A = Parathion, B = Malathion, C = Dichlorvos et D = Chlorpyrifos.

L'intoxication aux OPP peut aussi être aiguë et volontaire suite au mauvais usage du produit, par exemple par un enfant (Hamad et al., 2016) ou dans le but de réaliser un suicide. Ces produits sont peu chers et d'obtention facile grâce à leur large usage ce qui facilite leur utilisation (Mandour, 2013). Au niveau mondial, d'après des données de l'Organisation Mondiale de la Santé, entre 2012 et 2014 13.7% des suicides, soit 110 000 morts, sont imputables à l'usage des OPP avec une grande variabilité selon les régions étudiées : les cas sont peu courants en Europe de l'Ouest ou aux Etats-Unis (Mew et al., 2017). Ces chiffres sont en globale diminution depuis 2006 puisque la population rurale migre vers les zones urbaines et que la réglementation sur l'utilisation des pesticides a été durcie. L'empoisonnement aigu par les OPP reste tout de même le syndrome d'empoisonnement le plus commun retrouvé à l'hôpital (Chen et al., 2019) et il est souvent associé à des troubles hépatiques (augmentation significative des taux enzymatiques d'ALAT et ASAT) imputables aux solvants dans lesquels sont dissouts les toxiques (Mandour, 2013).

### 1.2.2. Les agents chimiques de guerre classiques

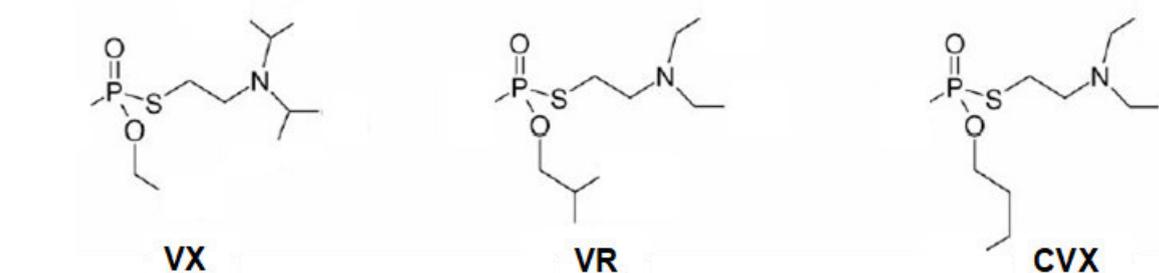
La famille des agents organophosphorés de guerre se compose de plusieurs générations de produits qui ont été développées successivement à partir de la Seconde Guerre mondiale : leur structure commune correspond à celle des organophosphorés présentée précédemment, sous la forme oxon (liaison  $\text{P}=\text{O}$ ).

Le tabun est le premier agent neurotoxique de la série G (**Figure 6**) à avoir été utilisé comme arme chimique mais il est rapidement devenu obsolète face au sarin et au soman qui sont plus volatils et puissants.



**Figure 6 :** Structures moléculaires des agents neurotoxiques de la série G : Tabun (GA), Sarin (GB), Soman (GD) et Cyclosarin (GF).

La série V (**Figure 7**) se différencie par la présence d'un atome de soufre qui augmente sa résistance à la dégradation.



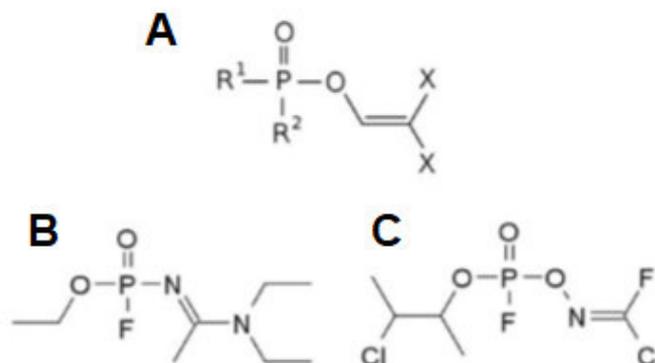
**Figure 7 :** Structures moléculaires des agents neurotoxiques de la série V : VX, VX russe (VR) et VX chinois (CVX).

De par leurs propriétés physiques et chimiques les agents de la série V, et notamment le VX qui est le plus utilisé, contaminent majoritairement par voie cutanée (Dalton et al., 2006) : des modèles de laboratoire sont développés pour étudier les facteurs influençant l'absorption sur différentes espèces afin de prévoir la prise en charge médicale (Hamilton et al., 2004). Le VX est un agent sans odeur (Munro et al., 1999) qui peut être dilué dans l'isopropanol pour une application cutanée (Joosen et al., 2008) (Mumford et al., 2008) dans des conditions occlusives ou non avant de déterminer les niveaux de VX plasmatique et dans la peau pour les associer à la probabilité de survie (Joosen et al., 2017).

### 1.2.3. Les Novitchoks

Le 4 mars 2018 une attaque chimique a lieu sur le territoire anglais : il s'agit de Sergei et Yulia Skripal, un ancien militaire russe et sa fille, qui présentent les symptômes d'une intoxication à un agent neurotoxique (Chai et al., 2018). Après analyse des prélèvements par l'OIAC il s'agit de Novichok russe (Vale et al., 2018). Cette famille de composés a été développée au début des années 1990 à partir d'un squelette organophosphoré : lors de la production la structure chimique est altérée pour que la puissance des composés soit maximale et rapide à la délivrance (Chai et al., 2018). Ils sont synthétisés sous forme d'agents binaires dont les composés stables et présentant une longue durée de vie n'entrent pas dans la définition de l'OIAC. La structure finale des composés reste inconnue mais ils présentent certainement un

fluor lié au phosphore comme les agents G (Vale et al., 2018) (**Figure 8**) : ils ont aussi une faible volatilité et une forte persistance.



**Figure 8** : Structure supposée des Novichoks : A = squelette général des Novichoks (R : groupement alkyl, alkoxy, alkylamino ou fluor ; X : halogène F :Cl/Br ou pseudohalogène CN), B = Structure chimique du A-234 décrite par Mirzayanov et C = par Hoenig et Elli (Chai et al., 2018).

La toxicité de ces composés est 5 à 10 fois plus importante que celle du VX, qui était considéré comme l'agent neurotoxique le plus toxique (Chai et al., 2018) (**Tableau 2**). Suite à une intoxication les symptômes seraient quasiment incurables et une neuro toxicité retardée entrainerait une paralysie 1 à 3 semaines après l'exposition.

Agent neurotoxique organophosphoré	DL <sub>50</sub> administration percutanée(mg/individu)
Sarin	1700
Soman	350
VX	10
A-234	5

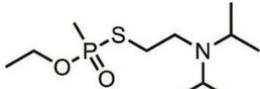
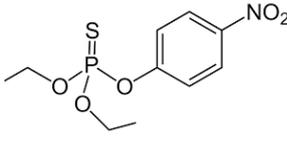
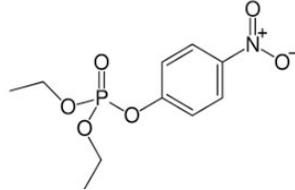
**Tableau 2** : Toxicité cutanée d'agents neurotoxiques de la série G, série V et de la famille des Novichoks (Nepovimova & Kuca, 2018).

#### 1.2.4. Les simulants

Les agents chimiques de guerre sont des composés avec une grande toxicité qui rend impossible leur emploi en laboratoire conventionnel : des simulants avec des propriétés physiques et chimiques semblables à l'agent étudié sont utilisés pour prédire le devenir du toxique (Bartelt-Hunt et al., 2008). Pour un même contaminant chimique plusieurs simulants peuvent être utilisés en fonction des propriétés étudiées et si les propriétés toxicologiques associées au contaminant pour exercer l'effet physiologique doivent être retrouvées. Le choix du simulant se fait donc en fonction de l'utilisation à faire au laboratoire et des propriétés physico chimiques impliquées dans le processus étudié.

Pour évaluer les protocoles d'urgence à mettre en place lors d'accidents industriels et lors d'attaques chimiques, des simulants sont utilisés sur des volontaires sains pour optimiser les protocoles de décontamination d'urgence (James et al., 2018). Dans cette situation, les

simulants doivent avoir une faible toxicité aux doses utilisées, être non corrosifs, non reprotoxiques, non mutagènes et non cancérigènes. Pour des études de pénétration cutanée au laboratoire sur des modèles *ex vivo* d'explants de peau ou *in vivo* murins, les paramètres essentiels pour le phénomène de sorption sont la masse moléculaire, le log P (qui mesure la solubilité différentielle du composé dans l'octanol et l'eau), la solubilité du composé dans l'eau et sa tension de surface. De par ses propriétés physiques et son activité anticholinestérasique, le parathion est utilisé comme simulant du VX : il s'agit d'un OPP qui présente une toxicité nettement inférieure à celle de l'agent (Bartelt-Hunt et al., 2008). Contrairement au VX, le parathion présente une liaison P=S : une étape de métabolisation sera donc nécessaire pour transformer cette liaison en P=O afin d'avoir un composé actif. Pour les études *in vitro* (Sellik et al., 2017) ou de pénétration cutanée *in vivo* (Misik et al., 2015) le paraoxon est préféré au parathion puisque qu'il correspond au composé actif et que sa masse moléculaire et son log P sont plus proches de ceux du VX (**Tableau 3**).

	VX	Parathion	Paraoxon
<b>Structure</b>			
<b>Poids moléculaire (g/mol)</b>	267,4	291,3	275,2
<b>Pression de vapeur à 25°C (mm Hg)</b>	$7,0 \times 10^{-4}$	$6,68 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-6}$
<b>Log P</b>	2,09	3,83	1,98
<b>Solubilité dans l'eau (g/L)</b>	30 (25°C)	0.011 (20°C)	3,64 (20°C)
<b>Tension de surface à 25°C (N/m)</b>	$31,3 \times 10^{-3}$		$45,7 \times 10^{-3}$

**Tableau 3 :** Comparaison des propriétés physiques et chimiques du VX avec 2 de ses simulants : le parathion et le paraoxon.

### 1.3. Intoxication aux composés organophosphorés

#### 1.3.1. *Physiologie*

Pour chaque xénobiotique pénétrant dans l'organisme, la cinétique résultante se découpe en 4 phases : Administration / Distribution / Métabolisme / Elimination. Lors de la contamination cutanée aux COP cette cinétique toxique va donc se mettre en place :

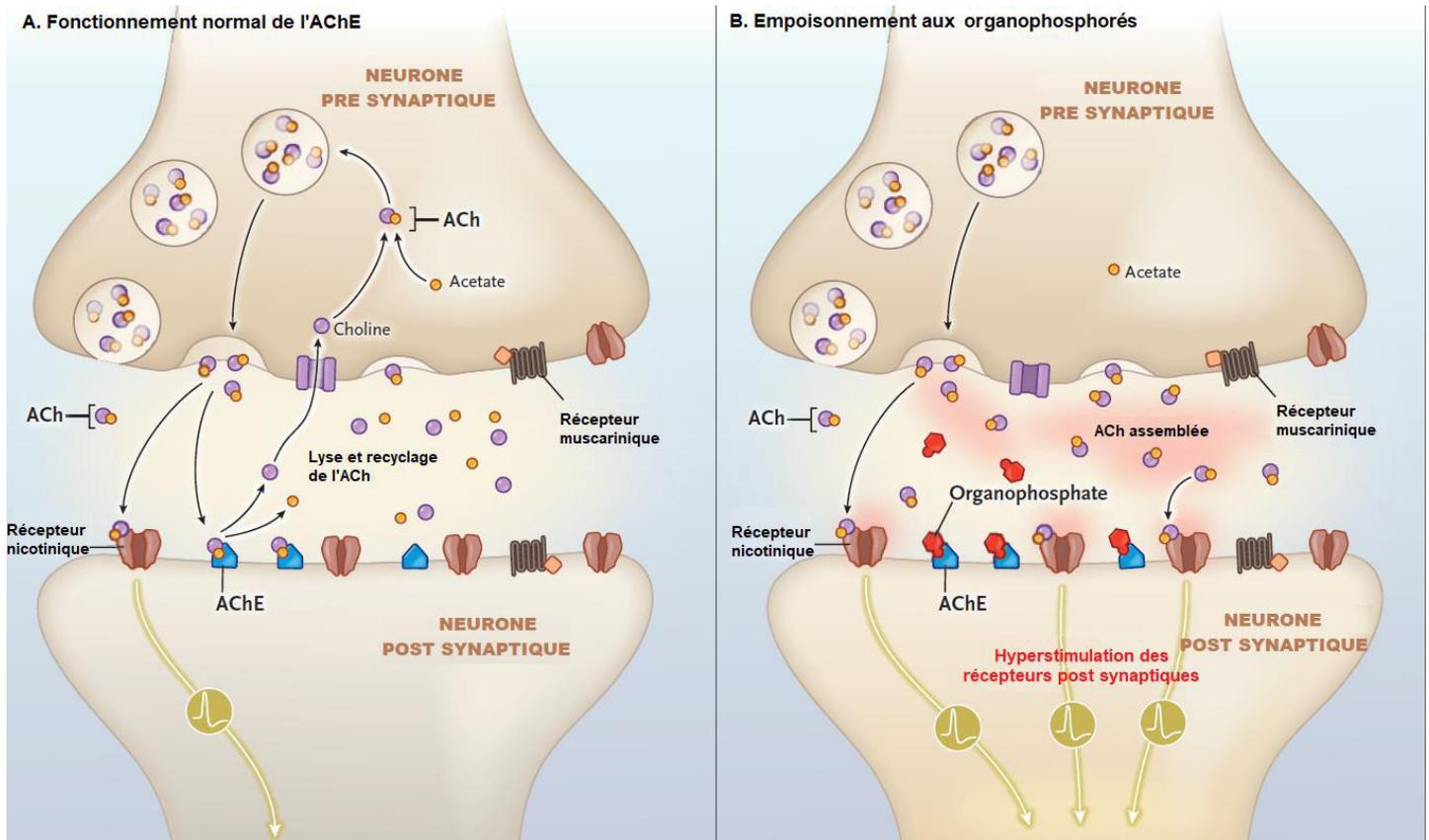
- Administration / invasion : la pénétration du toxique à travers la peau va être lente ce qui entraîne un temps de latence de 3-4h post contamination et une augmentation de la concentration sanguine en contaminant lente alors que la pénétration du toxique par les voies aériennes va être rapide.

- Distribution : lorsque le composé est dans le sang il y a une distribution systémique, y compris dans le système nerveux central puis qu'il y a un passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

- Métabolisme et Elimination : l'hydrolyse enzymatique par des phosphodiesterases dans le plasma va former des composés dérivés d'acide phosphorique et d'acide hypophosphoreux très solubles et non toxiques (John et al., 2015).

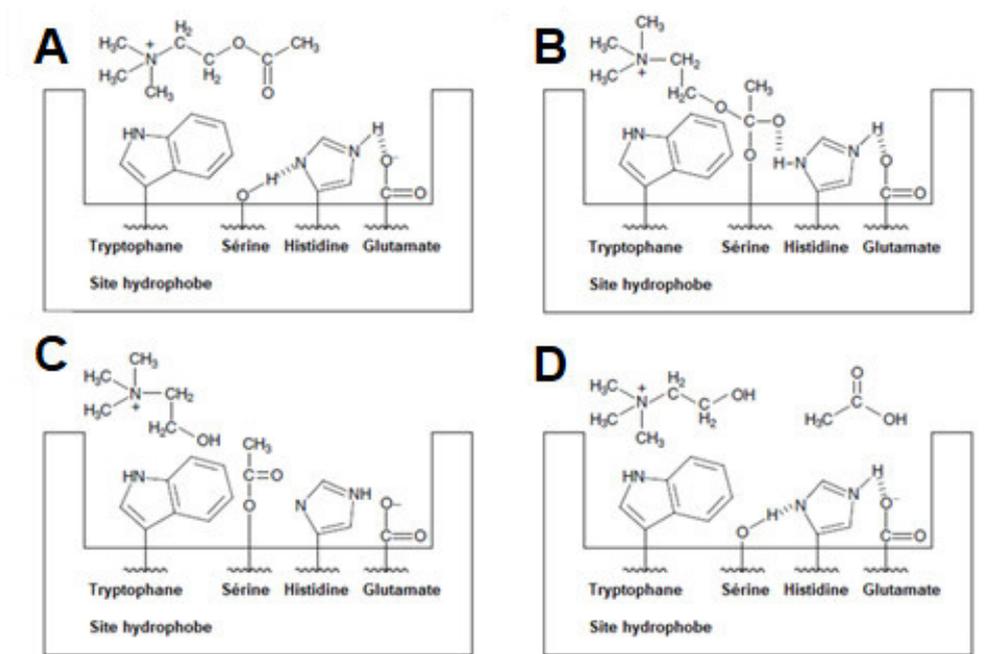
Il existe deux types de contaminants organophosphorés : les composés oxon avec une liaison  $P=O$  et les composés thion  $P=S$  (Vale & Lotti, 2015). Ces derniers sont des contaminants indirects qui doivent subir une bioactivation hépatique en oxons, donc leur délai d'action est plus important ; de plus, ils présentent une forte lipophilie ce qui favorise leur stockage dans les graisses et entraîne une intoxication prolongée (Rousseau et al., 2000).

La toxicité des COP est liée à une inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE), qui est une enzyme essentielle pour le contrôle musculaire. L'acétylcholine (ACh) est un neuromédiateur libéré dans l'espace synaptique pour interagir avec des récepteurs post synaptiques. On la retrouve au niveau des synapses ganglionnaires des neurones du système nerveux autonome et des cellules ganglionnaires au niveau parasympathique (Lessenger & Reese, 1999) : ses récepteurs sont nicotiques (potentiel excitateur) et muscariniques (potentiel inhibiteur ou excitateur au niveau post synaptique). L'ACh va donc interagir avec ses récepteurs post-synaptiques pour modifier la perméabilité membranaire du  $Na^+$  et du  $K^+$  afin de propager l'onde de dépolarisation à travers le corps du neurone post synaptique, puis sera immédiatement dégradée par l'AChE pour limiter l'activité au niveau des neurones (Haines & Fox, 2014). Les COP vont agir sur ce mécanisme en inhibant l'AChE, ce qui va entraîner une stimulation excessive des récepteurs par l'ACh qui ne sera plus dégradée en choline + acétate (Naughton & Terry, 2018) (**Figure 9**).



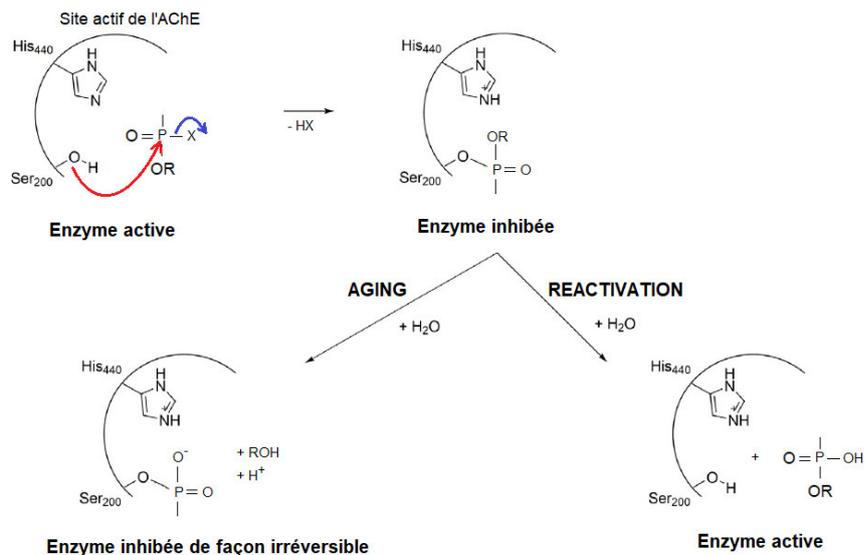
**Figure 9 :** Physiologie de la libération et de l'action de l'acétylcholine au niveau des synapses nerveuses après action sur les récepteurs nicotiniques et muscariniques : **A** = dégradation par l'acétylcholinestérase pour recycler la choline, **B** = acétylcholinestérase inhibée par un composé organophosphoré donc hyperstimulation des récepteurs et des neurones post synaptiques (Henretig et al., 2019).

Dans un contexte physiologique l'ACh va se lier à l'AChE grâce à une attaque nucléophile de la liaison ester par la sérine de l'enzyme entraînant l'hydrolyse de l'ACh (**Figure 10**). La sérine va être acétylée et rapidement recaptée pour régénérer l'AChE alors que la choline est recapturée par le neurone pré synaptique et recyclée avec l'acétyl-CoA pour former un nouveau pool d'ACh (Marrs et al., 2006).



**Figure 10 :** Hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase : **A** = l'ACh se place au niveau du site actif de l'AChE, **B** = formation d'un complexe enzyme-substrat par interaction avec la sérine de l'AChE, **C** = hydrolyse du lien ester de l'ACh pour libérer la choline, **D** = libération de l'acide acétique et AChE qui revient à son état original (Marrs et al., 2006).

Les COP vont inhiber l'AChE par phosphorylation avec une liaison covalente du radical phosphate ou phosphonate à l'hydroxyle de la sérine du site actif à la base d'une poche de l'enzyme (Worek et al., 2016) (Rousseau et al., 2000). Cette attaque nucléophile va entraîner la phosphorylation de l'enzyme qui subira une hydrolyse spontanée après un temps plus ou moins long (**Figure 11**).



**Figure 11 :** Inhibition de l'acétylcholinestérase par un composé organophosphoré : phosphorylation de l'hydroxyle de la sérine du site actif de l'AChE pour inactiver l'enzyme et hydrolyse spontanée pour réactiver l'enzyme ou

phénomène « d'aging » qui inhibe l'enzyme de façon irréversible, adapté de (Nepovimova & Kuca, 2018) et (Worek et al., 2016).

Cette inhibition de l'activité l'AChE se fait dans un premier temps aux jonctions neuronales, ce qui entraîne un excédent d'ACh au niveau des synapses et ensuite cette inhibition apparaît dans le sang, le cerveau et les autres tissus de façon temps-dépendante (Vale & Lotti, 2015). Ce phénomène est énantiosélectif puisque les COP (-) vont entraîner un effet plus important (John et al., 2015). La régénération de l'AChE va être naturelle et spontanée dans les synapses avec un turn-over de 7-10%, ce qui est très faible. Cette inactivation de l'enzyme peut conduire à l'apparition d'un phénomène (Henretig et al., 2019) : il s'agit du vieillissement ou « aging » qui survient à la suite d'une déalkylation partielle dans le site actif de l'AChE (A. Vale & Lotti, 2015). Ce phénomène est dépendant du COP : son demi-temps de vieillissement est très court pour le soman (1,3 minutes) alors qu'un délai plus important est observé pour le sarin et le tabun (3 heures et 13 heures respectivement) (Vale et al., 2012). L'enzyme forme des adduits avec le COP ce qui la rend résistante à l'hydrolyse spontanée et à la réactivation chimique : l'état du patient dépend alors de la synthèse de nouvelle AChE pour dégrader l'ACh excédante (Rousseau et al., 2000). La puissance d'action des Novichoks entraîne un « aging » encore plus rapide et marqué que celui observé pour les agents neurotoxiques classiques (Nepovimova & Kuca, 2018).

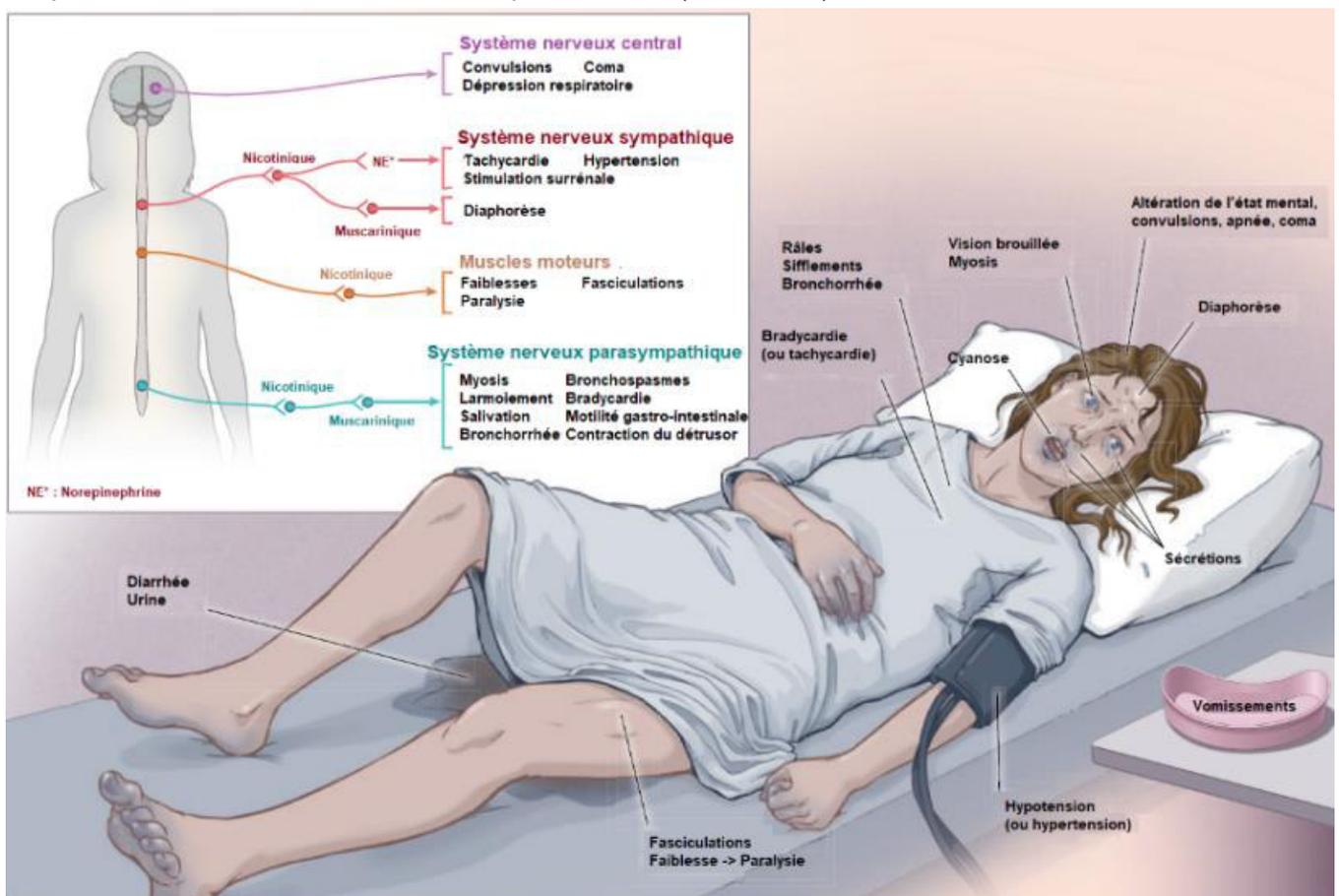
La toxicité des COP peut donc être déterminée par l'étude du niveau d'inhibition de l'activité de l'AChE qui est corrélée avec la transmission neuromusculaire (Thiermann et al., 2005). La méthode d'Ellman de dosage colorimétrique de l'activité enzymatique de l'AChE sanguine peut être utilisée comme méthode diagnostique. Des instruments portatifs ont été développés pour mesurer l'activité des cholinestérasas plasmatiques sur le terrain : le ChE check mobile permet ainsi une prise en charge anticipée des victimes après une suspicion d'attaque chimique (Shihana et al., 2019).

### 1.3.2. Toxidrome

L'intoxication aux COP suite à un accident industriel ou à une attaque chimique nécessite une réponse médicale d'urgence afin de limiter le développement du toxidrome associé (Henretig et al., 2019). Les signes cliniques doivent être reconnus au plus vite au moment de la prise en charge par les unités médicales en complément d'une décontamination précoce de la peau et des yeux. Afin de déterminer le degré d'intoxication et le pronostic vital, le personnel soignant dispose des scores APACHE II, PSS et SOFA qui évaluent respectivement la physiologie aigüe et la santé chronique (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation), la sévérité de l'empoisonnement (Poisoning Severity Score) et la défaillance des organes (Sequential Organ Failure Assessment) (Yuan et al., 2018).

Les symptômes peuvent apparaître très rapidement si l'intoxication est réalisée par inhalation,

ce qui entraîne un décès rapide, tandis qu'une latence de plusieurs heures est observable avec une exposition percutanée. La toxicité aiguë face aux COP a un impact sur plusieurs systèmes : nerveux central, cardiovasculaire, respiratoire, gastro intestinal, sensoriel et moteur avec des atteintes neurologiques et psychiatriques au long terme et des symptômes extra pyramidaux (Naughton & Terry, 2018) (**Figure 12**). Les effets imputables à l'hyperstimulation des récepteurs muscariniques sont les premiers à être observés (Vale & Lotti, 2015) : la forte sollicitation du système parasympathique va entraîner un myosis, une augmentation des sécrétions (salivaires, lacrymales), des crampes gastriques, des bronchospasmes et une bradycardie. Les effets nicotiques sont conséquents à l'hyperstimulation de la glande sympathique avec une hypersudation (diaphorèse) et une tachycardie qui sont complétées par une hyperstimulation de la jonction neuromusculaire entraînant fasciculations, faiblesse musculaire et paralysie. Dans les intoxications aiguës à fortes doses, des effets centraux peuvent être observés tels qu'un état confusionnel, un coma, une apnée et des crises d'épilepsies : l'exacerbation de tous ces effets va entraîner la mort par asphyxie du patient suite au rétrécissement des voies aériennes, à la paralysie des muscles respiratoires et à une production excessive de sécrétions pulmonaires (**Tableau 4**).



**Figure 12 :** Signes cliniques de l'empoisonnement aux composés organophosphorés : l'hyperstimulation des récepteurs nicotiques et muscariniques entraîne une stimulation du système nerveux central, nerveux sympathique, nerveux parasympathique et des muscles moteurs (Henretig et al., 2019).

Signes cliniques	Empoisonnement aux COP		
Myosis / larmoiement	Léger	Modéré	Sévère
Fasciculations localisées			
Hypersalivation / transpiration			
Nausée			
Vomissements / défécation / miction			
Bronchoconstriction / bronchorrhée	Sévère		
Bradycardie			
Dépression respiratoire			
Arthymie / dépression circulatoire	Sévère		
Convulsions			
Coma / arrêt respiratoire / mort	Sévère		

**Tableau 4 :** Evolution des signes cliniques en fonction de la degré d’empoisonnement aux composés organophosphorés (Worek et al., 2016).

Le tableau clinique se déroule donc en 3 temps (Rousseau et al., 2000) et dépend de la voie d’intoxication:

- une crise cholinergique caractéristique d’une intoxication aux COP qui est due à l’hyperstimulation des récepteurs nicotiniques et muscariniques par l’ACh libre ce qui entraîne une excitation générale.

- un syndrome intermédiaire avec une myopathie chez 20-68% des patients qui apparait entre 1 et 4 jours après l’intoxication. La myopathie va toucher en priorité les muscles proximaux avec une atteinte des paires de nerfs crâniens (III, VII, X) et son intensité est liée à la sévérité de l’atteinte toxique et à l’importance de la baisse d’activité de l’AChE. Ce syndrome peut être une rechute après la résolution des symptômes cholinergiques pour les patients exposés à des composés fortement lipophiles (Vale & Lotti, 2015).

- une polyneuropathie peut apparaitre 1 à 3 semaines après la contamination : elle se caractérise par une atteinte sensitivomotrice distale prédominante au niveau des membres inférieurs. Elle est due à une phosphorylation et un « aging » d’au moins 70% de la neuropathy target estérase qui est une protéine membranaire au niveau des nerfs périphériques, ce qui entraîne une dégénérescence axonale et une démyélinisation des fibres nerveuses (A. Vale & Lotti, 2015). Cette neuropathie retardée est indépendante du niveau d’inhibition de l’AChE.

En effet, l'inhibition de l'AChE ne peut pas expliquer à elle seule les symptômes observés lors d'une intoxication aux organophosphorés : d'autres enzymes, récepteurs et protéines sont impliqués (Naughton & Terry, 2018). Suite à une altération des protéines motrices, telles que la kinésine, et du cytosquelette par les COP, le transport axonal peut être perturbé sans que la dose de contaminant impacte le niveau d'AChE. Après une exposition, une neuro inflammation consécutive à un stress oxydant peut être observée ainsi que l'apparition d'auto-anticorps contre des protéines jouant un rôle dans la structure et la fonction des neurones. Ce type d'auto immunité a notamment été observé chez des vétérans de la guerre du Golfe exposés à des OPP et du GB.

### *1.3.3. Antidotes et traitements*

Pour lutter contre les intoxications liées aux agents chimiques, différentes mesures de protection peuvent être mises en place : utilisation de masques de protection avec des filtres avec du charbon actif pour protéger les voies respiratoires ; port de vêtements imperméables ou imprégnés et de crèmes avec un rôle de barrière pour limiter la pénétration cutanée. Ces mesures sont complétées par le développement de méthodes de détection et de décontamination (Szinicz, 2005).

La prise en charge de l'intoxication aux organophosphorés est d'abord non pharmacologique via la décontamination par l'utilisation de poudres adsorbantes et le déshabillage, puis pharmacologique (Nepovimova & Kuca, 2018). Un traitement symptomatique pour libérer et protéger les voies aériennes est administré en complément d'un traitement épurateur et d'un traitement spécifique pour diminuer l'hyperstimulation des récepteurs nicotiques et muscariniques post synaptiques (Rousseau et al., 2000).

La prise en charge de base de ce type d'intoxication repose donc sur 4 piliers : la ventilation mécanique pour réduire la détresse respiratoire, le diazépam qui est un anticonvulsifant, l'atropine qui va entrer en compétition avec l'ACh pour avoir une action antagoniste au niveau des récepteurs muscariniques et une oxime pour permettre la régénération de l'AChE (Vale et al., 2018). Cette thérapie n'a pas d'action sur la crise cholinergique qui peut induire une perte de conscience et des dommages permanents au cerveau (Goldsmith & Ashani, 2018).

Présentation des traitements symptomatiques d'après la fiche Piratox n°4 de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé (Afssaps) maintenant connue sous le nom d'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) :

- Détresse respiratoire : oxygénothérapie au masque ou ventilation contrôlée après intubation.

- Crises convulsives : utilisation du diazépam mais si elles sont mal contrôlées le patient peut passer en état de mal épileptique et devenir réfractaire au traitement, ce qui nécessite le passage à l'association kétamine/atropine pour avoir une efficacité anti épileptique et neuro protectrice (**Tableau 5**). Si elle est administrée assez tôt, l'atropine peut bloquer le démarrage des crises épileptiques.

Populations	Traitement des crises épileptiques	
	Doses initiales ou doses de charge	Doses d'entretien
<b>Adultes</b>	<i>Diazépam*</i> 0,1 à 0,2 mg/kg ou 10 à 20 mg d'emblée en IM/IV lente (2 mg/min). <i>Clonazépam</i> 1 mg en IV lente en 3 min.	<i>Diazépam*</i> 100 mg à raison de 8 mg/h. <i>Clonazépam</i> 4-6 mg sur 24 h en IV lente ou 0,1 à 0,25 mg/h en perfusion.
<b>Enfants (1-15 ans)</b>	<i>Diazépam*</i> 0,2 à 0,3 mg/kg en IV lente ou 0,5 mg/kg en intrarectal. <i>Clonazépam</i> 0,25 à 0,5 mg dilué dans une ampoule de solvant en IV très lente.	<i>Diazépam*</i> répétition de la première dose 10 à 20 min après. <i>Clonazépam</i> répétition de la première dose dans l'heure suivant l'injection intraveineuse.

**Tableau 5 :** Prise en charge des crises épileptiques avant l'installation d'un état de mal épileptique d'après la fiche Piratox n°4 de l'Afssaps.

- Symptômes muscariniques : l'**atropine** est un antagoniste compétitif des récepteurs muscariniques, donc elle va permettre de diminuer les sécrétions pulmonaires, la bronchoconstriction, l'hypotension, et la bradycardie. Les COP induisent une tolérance à l'atropine, ce qui explique que son usage doit être fait à forte dose (Henretig et al., 2019), en plus de l'importance de la crise cholinergique. Elle est commercialisée sous forme de solution injectable de sulfate d'atropine à 1 mg/mL, et son administration se fait sous la forme d'une dose de charge qui se complète avec une dose d'entretien (**Tableau 6**). Des formes plus dosées à 2mg/mL sont disponibles pour les armées et les services de secours. Lorsque les signes d'efficacité du traitement sont observés (assèchement des sécrétions bronchiques, rythme cardiaque normal ou légère tachycardie, réduction de la transpiration), le traitement doit être interrompu pour éviter tout surdosage.

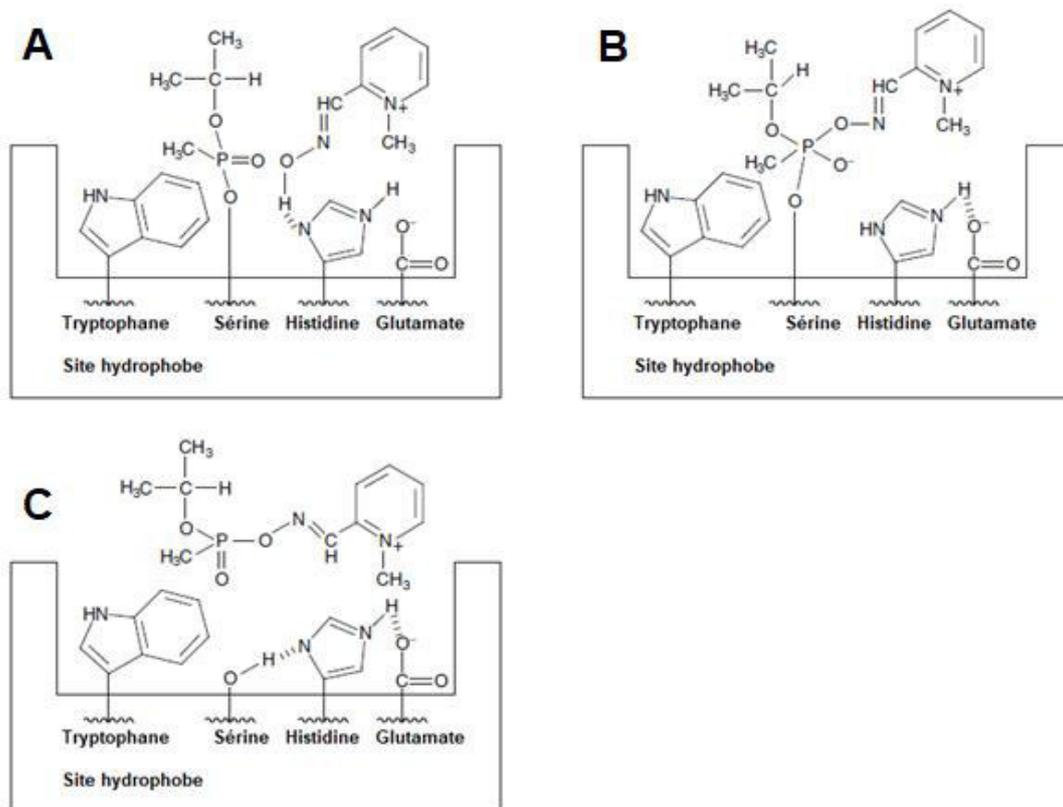
Populations	Doses de charge	Doses d'entretien*	Durée prévisible du traitement
<b>Adultes</b>	<b>2 mg</b> d'emblée en IV lente**, à renouveler toutes les 5 à 10 minutes jusqu'à l'obtention des signes d'une bonne titration (cf. texte).	<b>1,5 à 6 mg/h</b>	La durée d'utilisation ne dépassera pas en général quelques heures mais une surveillance très rapprochée du patient est indispensable à la recherche d'un retour des signes muscariniques (importance de la toxicocinétique de l'OP).
<b>Enfants</b>	<b>0,05 à 0,1 mg/kg</b> , selon l'importance des signes cholinergiques, d'emblée en IV lente*, à renouveler toutes les 5 à 10 minutes jusqu'à l'obtention des signes d'une bonne titration (cf. texte).	<b>0,05 mg/kg.h</b>	

(\*) Une perfusion continue d'atropine ne s'impose pas toujours ; des ré-injections, dictées par la clinique, pourraient suffire.

(\*\*) Pour une utilisation par la voie IV, les victimes devront avoir été au préalable oxygénées. D'autres voies peuvent être utilisées comme la voie intra-osseuse, IM, rectale, orale ou endotrachéale (notamment chez l'enfant).

**Tableau 6 :** Posologies pour le traitement par sulfate d'atropine dans le cadre d'une intoxication aux composés organophosphorés d'après la fiche Piratox n°4 de l'Afssaps.

L'AChE peut être réactivée par l'utilisation d'**oximes** avant que le phénomène d'« aging » ait lieu, c'est-à-dire que la liaison entre le toxique et l'enzyme soit irréversible (Rousseau et al., 2000). Les oximes assurent une protection contre les agents neurotoxiques de par leur capacité à réduire la létalité en induisant peu d'effets secondaires (Marrs et al., 2006) suite à leur réaction directe avec le toxique pour le détacher de l'AChE en formant un complexe oxime-phosphonate (Haines & Fox, 2014) (**Figure 13**). Le délai entre la contamination et l'injection de l'antidote est très important pour évaluer l'efficacité du traitement : s'il est très rapide dans l'usage militaire, il est souvent supérieur à 30 minutes dans l'usage civil. Le méthylsulfate de pralidoxime (Contrathion®) 2% est présenté sous forme de poudre et solvant pour solution injectable à 200 mg de pralidoxime par flacon : la posologie est variable suivant le degré d'intoxication aux composés organophosphorés mais elle se fait généralement sous la forme d'une dose de base élevée et d'une dose d'entretien (**Tableau 7**). L'efficacité du traitement est évaluée par l'amélioration des paramètres respiratoires et la réactivation de l'AChE dans les globules rouges.

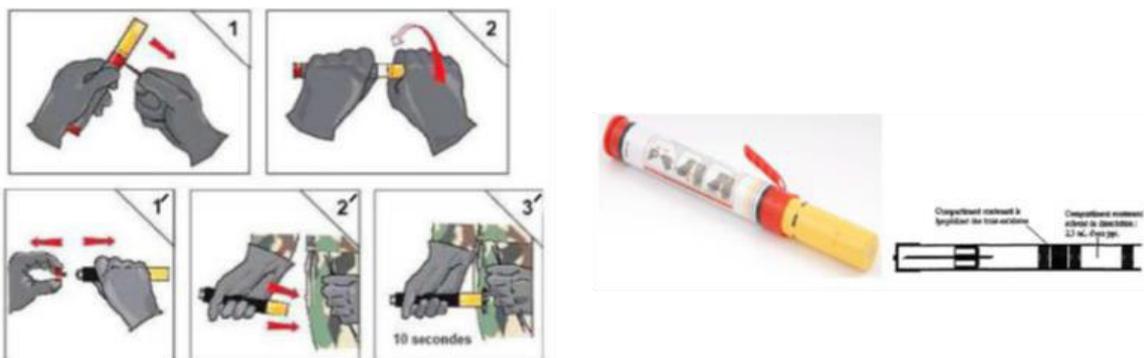


**Figure 13:** Acétylcholinestérase inhibée par le sarin et réactivée par la pralidoxime : **A** = formation d'un lien ester entre le groupe hydroxyle de la sérine de l'AChE et le sarin avec perte du F alors que la pralidoxime forme une liaison hydrogène avec le résidu histidine de l'enzyme, **B** = formation d'un complexe entre l'enzyme inhibée et l'oxime, **C** = pralidoxime qui se lie à la partie isopropyl methylphosphonyl et réactivation de l'enzyme (Marrs et al., 2006).

<b>Traitement par méthylsulfate de pralidoxime, Contrathion®</b> selon la hiérarchisation des symptômes	<b>Posologies(*)</b> 1 flacon de Contrathion® contient 200 mg de pralidoxime base après reconstitution.
<b>Formes Mineures</b>  (traitement optionnel)	<b>Adulte (pralidoxime base) :</b> 200-400 mg en IV lente ou en IM. <b>Enfant (pralidoxime base) :</b> 20 à 40 mg/kg IV en 15 min.
<b>Formes modérées</b>	<b>Adulte (pralidoxime base):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Dose initiale : 1 g (5 flacons) en IV lente ou en IM (jusqu'à 2 g).</li> <li>❖ Dose d'entretien = Perfusion de l'ordre de 5-8 mg/kg.h ou réinjection de 200-400 mg à un rythme déterminé en fonction de l'évolution clinique et des données biologiques (activité AChE de préférence si disponible ou BChE) (par exemple toutes les 4 h environ).</li> </ul> <b>Enfant (pralidoxime base):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Dose initiale : 20 à 40 mg/kg IV en 15 min.</li> <li>❖ Dose d'entretien = 10 mg/kg.h. A ajuster selon la clinique et les données biologiques.</li> </ul>
<b>Formes sévères</b>	<b>Adulte (pralidoxime base):</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Dose initiale : 2 g (10 flacons) en IV lente ou en IM.</li> <li>❖ Dose d'entretien = Perfusion de l'ordre de 5-8 mg/kg.h ou réinjection de 200-400 mg à un rythme déterminé en fonction de l'évolution clinique et des données biologiques (activité AChE de préférence si disponible ou BChE) (par exemple toutes les 4 h environ).</li> </ul> <b>Enfant : idem formes modérées</b>

**Tableau 7 :** Posologies pour le traitement par le méthylsulfate de pralidoxime Contrathion® dans le cadre d'une intoxication aux composés organophosphorés d'après la fiche Piratox n°4 de l'Afssaps.

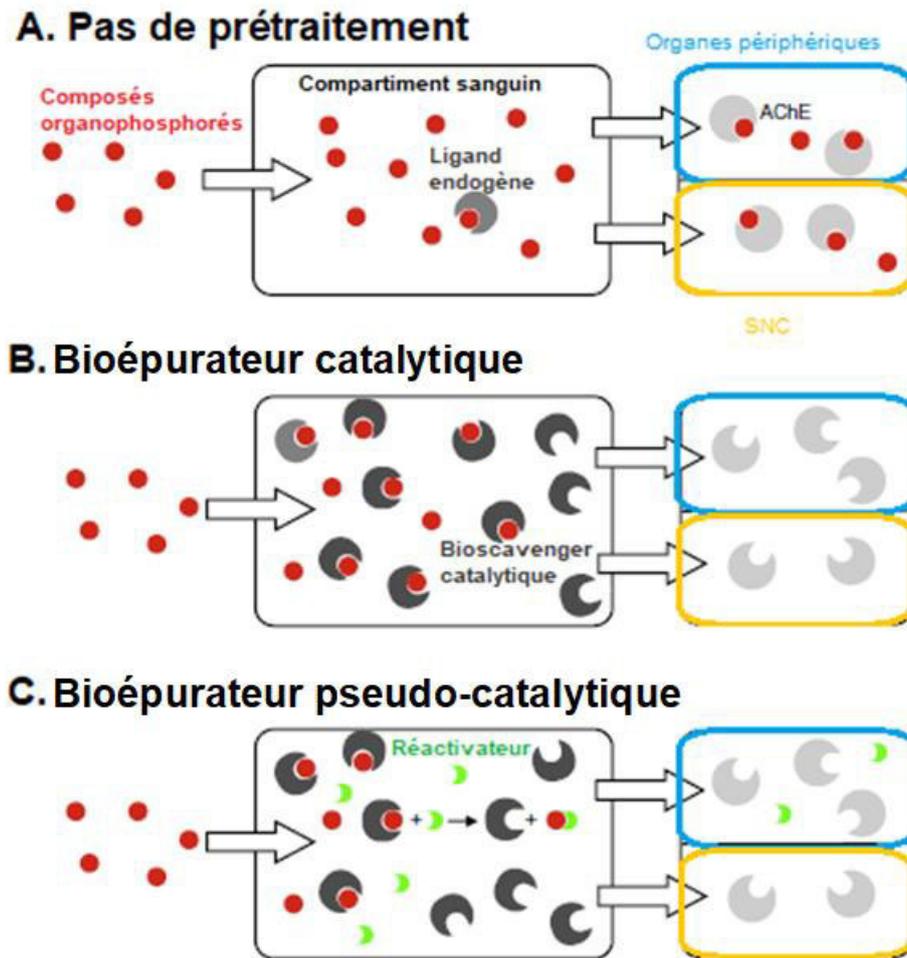
En cas de suspicion d'intoxication aux agents neurotoxiques, pour un usage rapide et facilité sur le terrain, les 3 molécules ont été combinées dans un stylo injecteur (**Figure 14**) : l'Ineupe® comprend 2 mg de sulfate d'atropine, 20 mg de chlorhydrate d'avizafone (prodrogue du diazépam) et 350 mg de méthylsulfate de pralidoxime (correspondant à 217 mg de pralidoxime base).



**Figure 14 :** Reconstitution et administration de la seringue Ineupe® : après retrait de la sécurité (1) le système doit être vissé (2) avant l'injection intra musculaire par pression sur le corps inférieur de l'auto-injecteur, sur la face externe de la cuisse à travers les vêtements.

Dans le cadre d'une intervention militaire en terrain sensible, un prétraitement peut être réalisé afin de prévenir une intoxication aux COP en diminuant les symptômes associés. Des inhibiteurs réversibles de l'AChE tels que des carbamates (physostigmine ou pyridostigmine) sont administrés pour bloquer le site actif de l'enzyme aux neurotoxiques organophosphorés (Lorke & Petroianu, 2019). Le bromure de pyridostigmine est un carbamate avec une amine quaternaire (van Helden et al., 2011) qui sera administré à une dose de 30 mg toutes les 8h avant une potentielle exposition : l'efficacité maximale du pré traitement est obtenue après 3 administrations soit 24h. La fixation réversible avec l'AChE va permettre la formation d'un pool d'enzymes inaccessible aux toxiques organophosphorés dans le sang et les organes. Le SNC restera toujours vulnérable aux neurotoxiques puisque la molécule de bromure de pyridostigmine ne passe pas la BHE (Nachon et al., 2013). L'efficacité de la phytostigmine a été évaluée par Petroianu et al., 2013 pour prévenir le risque de décès chez des rats exposés à une injection intra péritonéale de paraoxon. Avec une administration de 25% de la  $DL_{10}$  du pré traitement, une diminution du risque relatif de décès de 30 à 40% a été observée par rapport à l'absence de traitement pour des doses de paraoxon de  $1DL_{75}$ ,  $2DL_{75}$  et  $3DL_{75}$ .

De nouveaux traitements prophylactiques sont en cours de développement, notamment avec l'utilisation de bio épurateurs qui vont détoxifier les agents neurotoxiques en se liant à eux pour les hydrolyser (Goldsmith & Ashani, 2018) (**Figure 15**). La butyrylcholinestérase humaine HuBChE purifiée à partir de sang humain est un bio épurateur stœchiométrique qui se lie irréversiblement aux COP dans un ratio mole-mole (Nachon et al., 2013). Un prétraitement à forte dose peut protéger d'une intoxication au soman jusqu'à 8  $DL_{50}$  chez les animaux. Les bio épurateurs pseudo-catalytiques correspondent à une association entre de l'HuBChE et des réactivateurs chimiques de type oximes. Enfin, les bio épurateurs catalytiques sont représentés par des enzymes qui dégradent les COP avec un fort turn-over ce qui assure une forte protection même avec une faible dose : on retrouve une grande variété d'hydrolases telles que les carboxylestérases, les phosphodiesterases et la paraoxonase humaine 1.

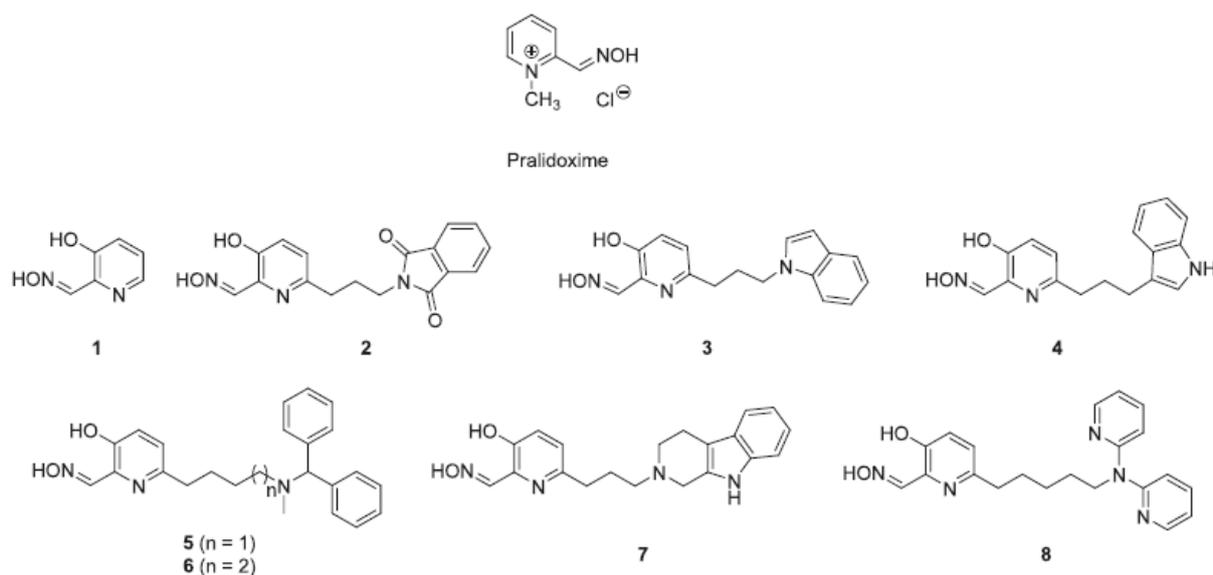


**Figure 15 :** Stratégies de prétraitement pour l’empoisonnement aux composés organophosphorés : **A** = sans prétraitement les COP entrent dans le compartiment sanguin et passent dans les organes périphériques et le système nerveux central pour inhiber l’AChE, des ligands endogènes tels que la HuBChE plasmatique capturent une faible quantité de COP, **B** = une grande quantité de bio épurateur catalytique exogène va capturer les COP dans le compartiment sanguin pour prévenir l’inhibition de l’AChE périphérique et centrale, **C** = la co administration de réactivateurs avec les bio épurateurs catalytiques va augmenter l’efficacité de ces derniers ; adapté de (Nachon et al., 2013).

D’autres inhibiteurs réversibles de l’AChE sont envisagés pour le traitement prophylactique de l’intoxication aux organophosphorés. La galantamine est une molécule utilisée pour le traitement de la maladie d’Alzheimer : c’est un ligand allostérique des récepteurs nicotiques qui passe la BHE pour une action au niveau central. van Helden et al., 2011 ont étudié son potentiel en tant que prétraitement dans le cadre d’une intoxication au sarin ou au soman sur des cobayes et aucune toxicité centrale ou périphérique n’a été observée. Contrairement aux carbamates précédemment cités, la galantamine inhibe spécifiquement l’AChE et n’a pas d’action sur la BChE, ce qui préserve la capacité de bio épurateur catalytique de l’enzyme. De plus, cette molécule passe rapidement la BHE ce qui permet une protection contre les dommages cérébraux imputables aux COP. L’association d’un carbamate avec le caramiphène, un antitussif ayant une activité anticholinergique centrale et antiglutaminergique,

semble être aussi une voie à développer dans le cadre d'un traitement prophylactique par inhibition de l'AChE puisque cette association permet une protection significative lors de l'exposition de rats à du soman.

A l'inverse l'AChE peut être réactivée par des molécules alpha nucléophiles qui attaquent la sérine phosphorylée afin de retirer le groupe phosphyl et restaurer l'enzyme active (Renou et al., 2013). Ces molécules sont chargées, donc le passage de la BHE est faible ce qui signifie qu'il n'y a pas de protection au niveau central. De nouvelles molécules non chargées comprenant 2 parties sont synthétisées pour permettre leur passage dans le SNC (**Figure 16**) : la partie alpha nucléophile est un 3-hydroxy-2-pyridinealdoxime (**1 figure 16**) qui va permettre le clivage de la liaison P-S et un ligand va interagir avec un site périphérique de l'AChE pour augmenter l'affinité d'un réactivateur pour le complexe AChE-COP. Ces deux parties sont liées par une chaîne carbonée de taille variable.



**Figure 16 :** Structures chimiques des principaux réactivateurs d'acétylcholinestérase avec un noyaux pyridinium aldoxime : Pralidoxime chargée et développement de molécules non chargées à partir du composé 1 (3-hydroxy-2-pyridinealdoxime) (Renou et al., 2013).

Une autre stratégie thérapeutique peut être de neutraliser le contaminant avant sa liaison irréversible à l'AChE (Vayron et al., 2000). Les anticorps ont la capacité de lier un composé pour le neutraliser : des souris sont immunisées par un haptène spécifique pour la dégradation du VX avant leur contamination. Il y a alors la création d'anticorps polyclonaux capables de neutraliser le VX : cette activité de protection est spécifiquement due au processus d'immunisation.

L'inhibition de l'AChE n'explique pas à elle seule les symptômes observés lors d'une intoxication aigüe aux COP (Cf 1.3.2.) : des traitements doivent être mis en place pour les

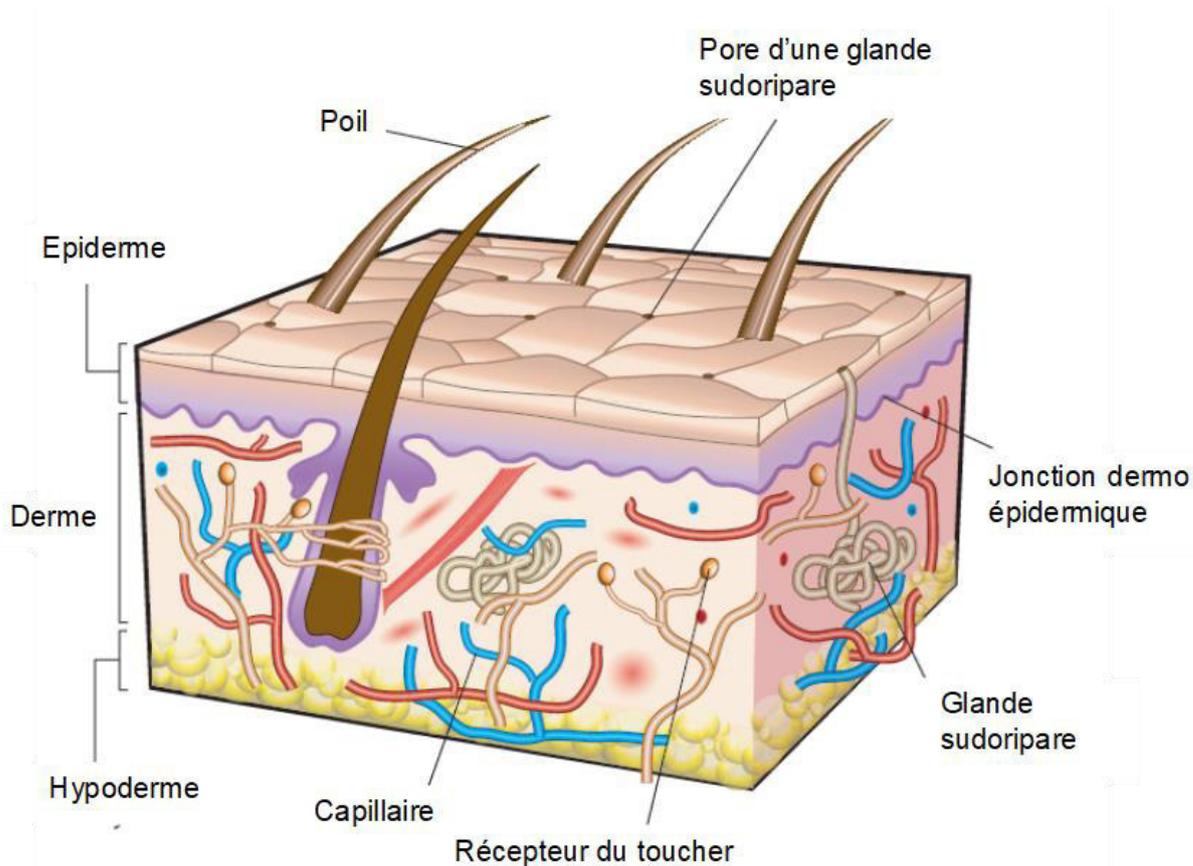
autres voies physiologiques impliquées (Naughton & Terry, 2018). Le MitoQ est un antioxydant qui cible la mitochondrie : son administration préventive chez des rats exposés au dichlorvos (OPP) a démontré une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), une augmentation du taux de glutathion, une diminution de la peroxydation des lipides et de l'oxydation de l'ADN. La stabilité des microtubules peut, quant à elle, être augmentée pour rétablir le transport axonal avec, par exemple, l'utilisation de l'epitholone D actuellement en test pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

## 2. La décontamination cutanée

### 2.1. La peau

#### 2.1.1. Histologie

La peau est le plus grand organe chez l'Homme avec une surface d'environ 2 m<sup>2</sup> et un poids approximatif de 5 kg chez l'adulte (Godin & Toutou, 2007). La surface cutanée assure différents rôles en fonction de sa composition : la peau poilue correspond à plus de 90% de la surface cutanée et permet la perception des sensations tactiles alors que la peau glabre sans follicules pileux développés se trouve majoritairement sur la paume des mains et la plante des pieds, avec une innervation spécifique pour ressentir les détails tactiles (Gould, 2018). Malgré la variabilité de la surface cutanée, la structure interne de la peau reste la même quelle que soit la localisation étudiée : sur une coupe transversale les 3 couches observées sont, de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 17**). L'épaisseur de ces couches est quant à elle variable selon la localisation puisque la peau plantaire possède un épiderme épais de 1,5 mm et un derme de 3 mm contre une épaisseur respective inférieure à 0,1 mm et 1-2 mm pour les différentes zones de la peau poilue.



**Figure 17 :** Morphologie de la peau: présentation des différentes couches cutanées et des annexes cutanées (MacNeil, 2007).

Chacune de ces couches possède une structure et une composition cellulaire spécifiques qui lui confèrent ses propriétés.

#### 2.1.1.1. L'épiderme

Cette couche externe correspond à un épithélium pavimenteux stratifié squameux non vascularisé avec une épaisseur de 75-150  $\mu\text{m}$ , divisé en 4 couches (Joodaki & Panzer, 2018): la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée - le *stratum corneum* (**Figure 18**).

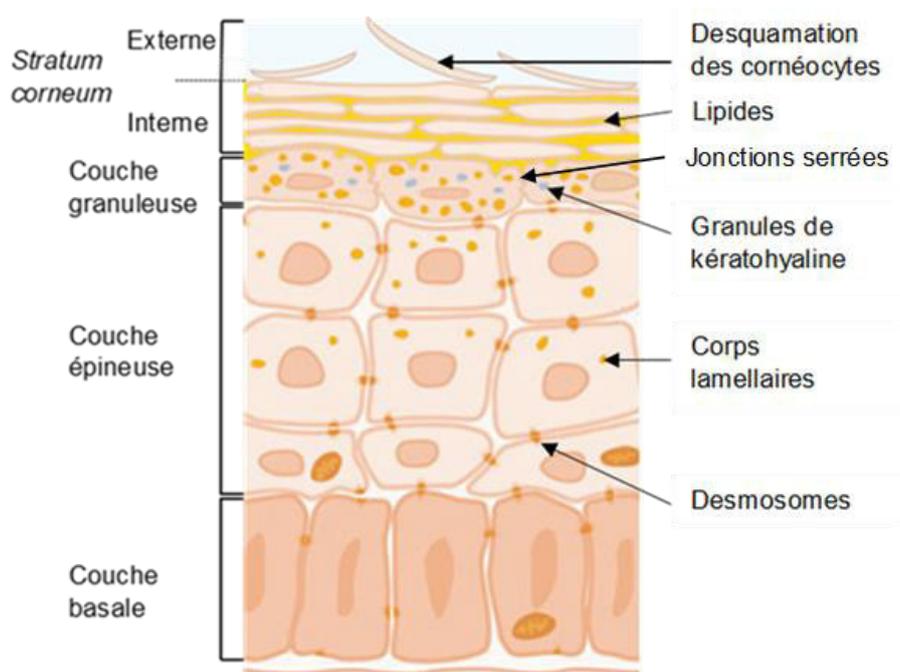
La **couche basale** est composée d'une seule assise cellulaire de kératinocytes cubiques basaux. De façon générale les kératinocytes contiennent des filaments intermédiaires de kératine qui forment le cytosquelette permettant le maintien de la forme des cellules. Ces filaments vont aussi avoir un rôle dans l'intégrité de la couche puisque qu'ils vont permettre la liaison intercellulaire par le biais des desmosomes. Les cellules basales sont composées des cellules souches épidermiques avec un fort ratio nucléo/cytoplasmique (Menon, 2002) : elles se divisent à l'infini de façon asymétrique pour former des cellules de transition, dotées encore de pouvoir de division, qui entament rapidement le processus de différenciation et progressent de façon ascendante à travers l'épiderme. Un autre type cellulaire est retrouvé au niveau de l'assise basale de l'épiderme : les cellules pigmentaires – mélanocytes – qui produisent la mélanine protégeant les noyaux et notamment l'ADN des rayons UVs.

Lors de leur progression vers la **couche épineuse** les kératinocytes perdent leur capacité à se diviser, les filaments intermédiaires de kératine s'organisent et le nombre de desmosomes augmente ce qui donne aux cellules un aspect épineux. Cette couche est composée de 5 à 10 assises de cellules avec les cellules de la partie supérieure qui s'aplatissent et s'allongent. L'observation des corps lamellaires dans le cytosol est réalisée (Feingold & Elias, 2014). Ces éléments de 0,1 à 0,2  $\mu\text{m}$  sont composés d'une membrane bicouche et enrichis en lipides (cholestérol, phospholipides, glucosylcéramides et sphingomyéline) ainsi qu'en enzymes, inhibiteurs d'enzymes, peptides antimicrobiens et autres protéines.

Les kératinocytes vont progressivement s'enrichir en corps lamellaires lors de leur passage dans la **couche granuleuse**, jusqu'à ce qu'ils représentent 20% du volume du cytosol dans la partie supérieure de la couche (Menon et al., 2012). L'aspect granuleux de cette partie de l'épiderme est dû à la présence de granules de kératohyaline basophiles, formés de profilagrine, loricine et déposés sur la kératine. Ces granules vont aussi devenir de plus en plus gros lors de la progression des kératinocytes au sein des 2 à 3 assises cellulaires formant cette couche. Une réorganisation des filaments intermédiaires de kératine et une modification de la nature des jonctions intercellulaires, avec l'apparition de jonctions serrées va entraîner

la polarisation des cellules pour permettre la sécrétion du contenu des corps lamellaires au pôle apical lors du processus de cornification de la peau.

La couche la plus externe de l'épiderme est la **couche cornée** habituellement composée de 18 à 21 assises cellulaires, plus communément appelée *stratum corneum* (SC). Les kératinocytes vont entrer en mort cellulaire par la voie de la cornification (Candi et al., 2005) : il s'agit du processus au cours duquel les kératinocytes vont mourir pour devenir des cornéocytes qui sont des cellules plates avec une enveloppe cornée. Ils correspondent à des filaments intermédiaires de kératine emprisonnés dans une matrice de filagrine formée suite à la transformation de la profilagrine stockée dans les granules de kératohyaline par clivage protéolytique et déphosphorylation. Cette matrice fibreuse compacte est entourée par des lipides insolubles (Candi et al., 2005) sécrétés par les corps lamellaires retrouvés à l'interface avec la couche granuleuse ce qui donne une organisation caractéristique en « brique et mortier » (Menon, 2002). L'espace extracellulaire est comblé de lipides présents en quantité équimolaire : céramides, acides gras libres et cholestérol (Bouwstra & Ponc, 2006) qui sont organisés sous forme de domaines en mosaïque avec des lipides en phase ordonnée (phase cristalline) et en phase désordonnée (phase liquide-cristalline) (Boncheva et al., 2008). Les lipides forment des lamelles entre les cornéocytes (Candi et al., 2005) qui sont organisées de deux manières suivant leur localisation : dans le *stratum compactum* qui correspond à la partie interne du SC, la cohésion inter cellulaire est assurée par les cornéodesmosomes. Ces liaisons sont ensuite dégradées par les enzymes protéolytiques des corps lamellaires dans les couches externes du SC pour former le *stratum disjunctum* (Menon et al., 2012). La perte des jonctions intercellulaires va entraîner le processus de desquamation des cornéocytes qui correspond à la perte de la partie supérieure du SC.



**Figure 18** : Différentes couches composant l'épiderme ; adapté de (Proksch et al., 2009) et (Rawlings & Matts, 2005).

L'épiderme est donc un tissu dynamique avec un renouvellement continu composé d'un épiderme viable de 50-100  $\mu\text{m}$  sur lequel repose le SC (Bouwstra & Ponc, 2006). Les kératinocytes souches de la couche basale entrent dans un processus de différenciation ascendante qui entraîne des changements dans leur structure et leur composition : la progression des cellules à travers les différentes couches de l'épiderme dure 30 à 45 jours (Gould, 2018). L'homéostasie de l'épiderme est conservée grâce au processus de desquamation qui a lieu dans la partie supérieure du SC, et qui est en équilibre avec les phénomènes de prolifération et de maturation des kératinocytes (Candi et al., 2005).

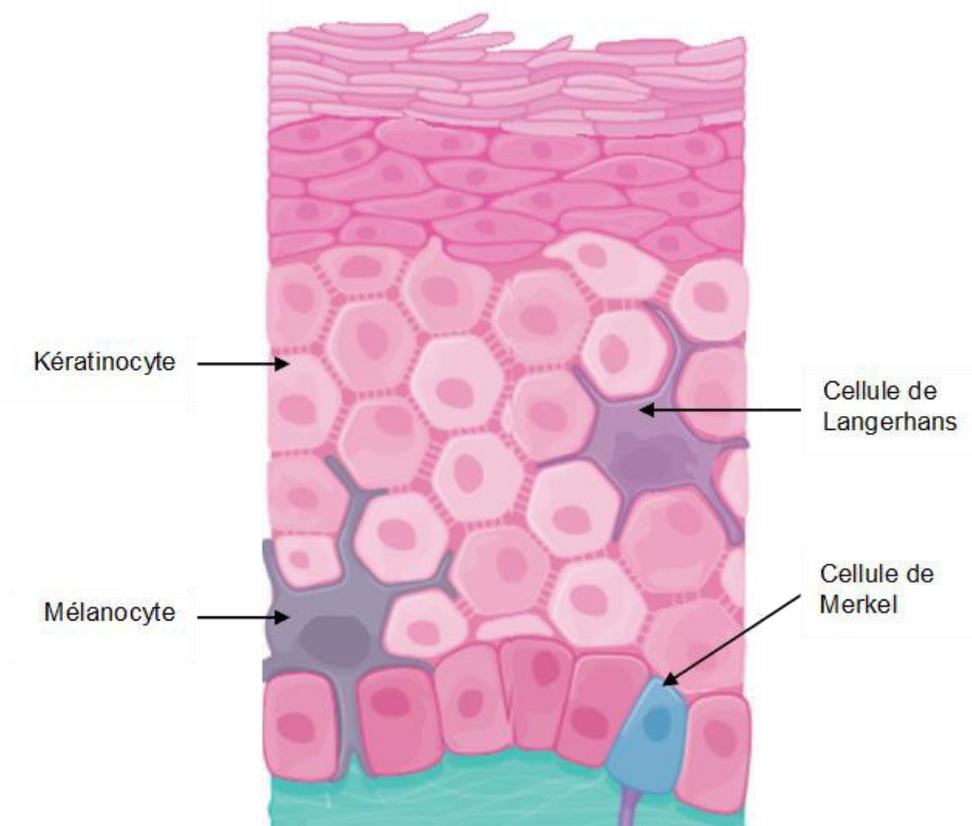
L'épiderme est composé à 90% de kératinocytes qui contiennent de la kératine nécessaire à la formation des filaments intermédiaires pour le développement du cytosquelette de la cellule (Moll et al., 2008). Une cinétique d'expression des kératines est observée pour assurer l'intégrité et la stabilité mécanique des cellules elles-mêmes et de l'ensemble du tissu. D'autres populations cellulaires sont retrouvées au sein des différentes couches de l'épiderme pour assurer différentes fonctions (**Figure 19**) :

- les mélanocytes assurent un rôle de photo protection face aux rayons UVs grâce à la mélanine qui est synthétisée dans le corps cellulaire situé dans la couche basale puis distribuée sous forme de mélanosomes aux kératinocytes via les dendrites.

- les cellules de Langerhans se situent dans les couches épineuse et granuleuse. Ces macrophages spécialisés de la peau sont les seules cellules immunitaires résidentes : après

avoir capté les antigènes, elles traversent la membrane basale pour transmettre l'information vers les lymphocytes présents dans les nodules lymphatiques. La production de cellules effectrices spécifiques de l'antigène assure la réponse immunitaire adaptative (Abdayem & Haftek, 2018).

- les cellules de Merkel situées dans la couche basale sont les cellules sensorielles de l'épiderme : les dendrites réparties dans tout l'épiderme sont responsables de la sensation de toucher et sont sensibles à la pression. Elles sont reliées aux kératinocytes par des desmosomes et innervées à travers la membrane basale par des fibres nerveuses myélinisées qui vont dans le derme.



**Figure 19 :** Présentation des différents types cellulaires composant l'épiderme ; adapté de (Gould, 2018).

#### 2.1.1.2. La jonction dermo épidermique

Il s'agit d'une interface épaisse de 50-80 nm qui se situe entre l'épiderme et le derme. Son aspect est ondulé car des invaginations du derme sont retrouvées dans l'épiderme ce qui forme des papilles dermiques et des crêtes épidermiques. Cette structure est elle-même composée de 3 couches qui sont de l'extérieur vers l'intérieur la lamina lucida, lamina densa (collagène IV) et la zone fibrillaire. Les kératinocytes de la couche basale adhèrent à la jonction dermo-épidermique (JDE) grâce aux hémidesmosomes et aux intégrines présentes à leur pôle basal (Candi et al., 2005). Du côté dermique, des filaments d'ancrage (collagène VII) sont

présents au niveau de la zone fibrillaire pour lier les fibres de collagène du derme (collagène I) et ainsi assurer la cohésion entre l'épiderme et le derme.

### 2.1.1.3. Le derme

Le derme est le tissu de support de la peau : c'est un tissu conjonctif fibro-élastique fortement vascularisé. Il est composé d'un ensemble de 3 protéines fibreuses : le collagène, l'élastine et la réticuline, entravées dans une matrice (Joodaki & Panzer, 2018). Cette dernière a une forte composante cellulaire représentée majoritairement par les fibroblastes qui ont pour rôle la production et l'organisation de la matrice extra cellulaire : ces cellules mésenchymateuses produisent le collagène et l'élastine nécessaires à former la trame fibreuse dans laquelle se trouve la matrice (Driskell & Watt, 2015). Les fibres d'élastine apportent à la peau son élasticité et sa souplesse car elles s'étirent sous la contrainte avant de reprendre leur forme originelle. A l'inverse les fibres de collagène sont peu sensibles à la contrainte ce qui confère à la peau ses propriétés de solidité et de résistance. Les fibroblastes communiquent avec les autres types cellulaires présents dans la matrice pour réguler la physiologie cutanée (Sorrell & Caplan, 2004). Quatre types de cellules immunitaires avec des rôles différents sont retrouvés : les mastocytes qui identifient les éléments pathogènes et libèrent des signaux chimiques pour attirer d'autres cellules immunes, les lymphocytes, les cellules dendritiques qui présentent les antigènes des éléments étrangers ou les macrophages qui nettoient les débris cellulaires. La matrice contient ces différents types cellulaires mais elle est composée en majeure partie d'eau, de sels et de glycosaminoglycanes tels que les protéoglycanes et l'acide hyaluronique. Ces derniers sont responsables de l'aspect gel de la matrice et de la teneur en eau du derme.

Le derme est subdivisé en 2 couches ayant la même composition cellulaire et fibreuse mais dans des proportions différentes, ce qui leur confère des propriétés mécaniques différentes. Le **derme papillaire** correspond au derme superficiel : son épaisseur est en moyenne de 300-400 µm. Il est délimité en hauteur par les papilles dermiques qui sont des structures comprenant les systèmes micro-vasculaires et nerveux au contact de la jonction dermo-épidermique. La limite basse est constituée par le plexus vasculaire superficiel. Cette zone contient beaucoup de cellules et peu de fibres de collagène (de type I et III) et d'élastine, qui sont faiblement organisées, lâches et fines. Le **derme réticulaire** quant à lui présente une forte composante fibreuse avec des paquets épais et organisés de fibres de collagène (majoritairement type I) et peu de cellules. Il s'étend jusqu'à un plexus vasculaire profond, qui délimite aussi la partie supérieure de l'hypoderme (Sorrell & Caplan, 2004). Le derme est donc la seule couche cutanée vascularisée, ce qui explique son rôle pour la régulation thermique, la nutrition et l'oxygénation de la peau. La circulation lymphatique qui permet le drainage et le transport des cellules immunitaires est superposable aux voies artério-veineuses.

L'innervation du derme est mixte : le système nerveux somatique est le médiateur de la sensibilité cutanée. Il est formé par un plexus nerveux profond qui rejoint le plexus superficiel à la jonction entre le derme réticulaire et le derme papillaire. Les terminaisons des fibres sont libres ou en contact avec des corpuscules sensoriels spécialisés dans le derme et l'épiderme. Les différents acteurs sont les thermorécepteurs, nocicepteurs et mécanorécepteurs qui permettent de transmettre des sensations de toucher, de douleur et de chaleur. Le second type d'innervation est assuré par le système nerveux autonome pour le contrôle des mouvements involontaires, la sécrétion de la sueur, la vasomotricité cutanée ou l'horripilation.

#### 2.1.1.4. L'hypoderme

L'hypoderme est la couche cutanée la plus profonde, à l'interface entre le derme et les organes internes. Son épaisseur est variable selon la localisation anatomique mais il représente environ 10% de la masse totale d'un individu (Joodaki & Panzer, 2018). Ce tissu conjonctif richement innervé et vascularisé possède une population cellulaire particulière : les adipocytes. Ce sont des cellules lipidiques qui stockent du gras dans le cytoplasme sous forme de goutte pour ensuite libérer ces lipides lorsque le corps a besoin d'énergie. Les adipocytes sont organisés en lobules séparés par du tissu conjonctif. La fraction stromale vasculaire est aussi présente dans l'hypoderme : elle se compose des vaisseaux sanguins, de cellules péri vasculaires et de macrophages (Anghel & Wahli, 2007).

#### 2.1.1.5. Les annexes cutanées

Il existe 3 types d'annexes cutanées qui vont former une invagination dans les couches cutanées au niveau de leur insertion dans la peau :

- les glandes sébacées sont des glandes retrouvées sur tout le corps sauf sur la plante des pieds et la paume des mains. Ce sont des annexes épidermiques situées dans le derme moyen, très richement vascularisées mais peu innervées car elles sont sous un contrôle hormonal. Elles sont composées par les sébocytes qui sont des cellules matures spécialisées pour la production et la sécrétion holocrine de sébum via le canal pilo-sébacé à la surface de la peau (Zouboulis et al., 2016). Les glandes sébacées sont annexées à un follicule pileux pour former l'unité pilo-sébacée.

- le follicule pileux est associé à un poil et un muscle arrecteur pour compléter l'unité pilo-sébacée. Il est ancré dans la peau sous la forme d'une invagination de l'épiderme dans le derme. Il est composé de différentes parties anatomiques, notamment du bulbe pileux à son extrémité inférieure qui est à l'origine de la pousse du poil. Durant la phase anagène le poil aura une croissance ascendante au sein du follicule jusqu'à la phase télogène qui est une phase statique. La perte du poil correspond à la phase catagène qui amène ensuite sur un

nouveau cycle de pousse d'un nouveau poil (Bernard, 2017). Le muscle arrecteur permettra lors de sa contraction de redresser le poil, en réaction à une émotion ou au froid.

- les glandes sudoripares produisent et sécrètent la sueur, et on en retrouve deux types avec une distribution et des fonctions différentes. **Les glandes sudoripares apocrines** sont associées à des follicules pilo-sébacés. On les retrouve dans des régions particulières telles que les aisselles et les régions uro-génitales. **Les glandes sudoripares eccrines** sont distribuées sur tout le corps avec une densité plus importante sur la paume des mains et la plante des pieds. La partie proximale et le canal excréteur se situent dans le derme et la sueur est déversée à la surface de l'épiderme. (Gagnon & Crandall, 2018).

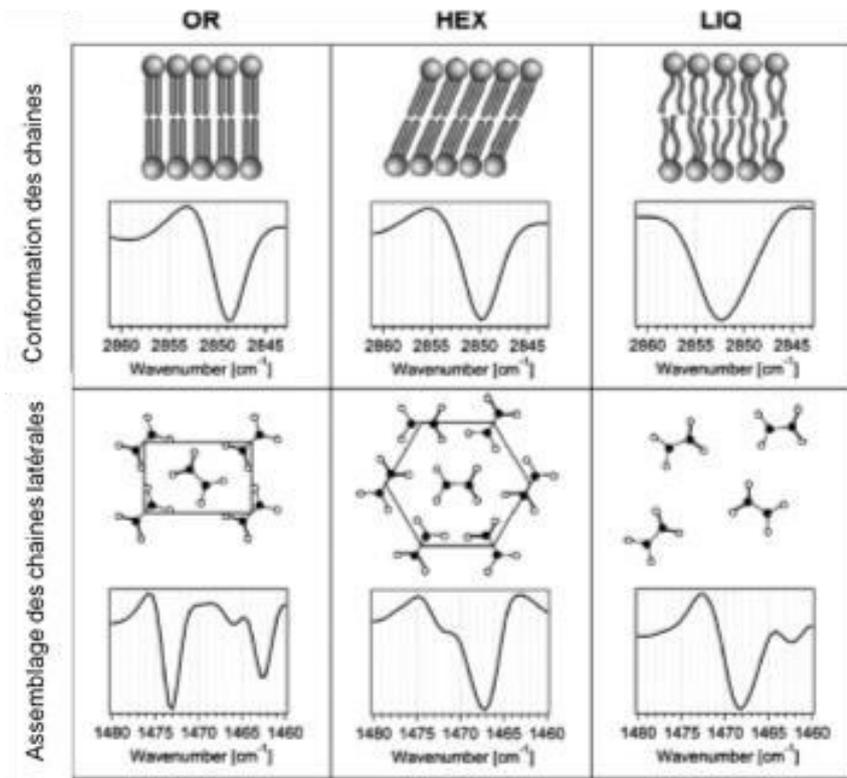
### 2.1.2. Rôles physiologiques

La peau est le plus grand organe du corps et présente une grande diversité au niveau de sa composition cellulaire et protéique de par les différentes couches qui la composent. Cette particularité permet à la peau d'exercer différents rôles pour la protection de l'organisme ou le développement du sens du toucher. L'épiderme avec sa composition multi couche va majoritairement jouer le rôle de barrière physique, métabolique, immunologique et antibactérienne. Grâce aux fibres qui le compose le derme apporte une propriété de protection mécanique à la peau tandis que l'hypoderme est une barrière thermique et une réserve énergétique. La fonction sensorielle de la peau est assurée par l'épiderme et la riche innervation du derme.

#### 2.1.2.1. Barrière physique

La peau humaine est un élément de défense contre les agressions extérieures : sa structure multicouche permet d'assurer une protection face aux molécules exogènes (Godin & Touitou, 2007). La fonction barrière est majoritairement assurée par le SC qui présente une structure en brique et mortier (Phuong & Maibach, 2016) où les cornéocytes sont enrobés dans une matrice lipidique. L'organisation en mosaïque des lipides est essentielle pour le maintien des propriétés du SC : des lipides organisés de façon orthorombique avec les chaînes aliphatiques en conformation *trans* vont former des cristaux. Ces chaînes peuvent aussi s'organiser de façon hexagonale formant une structure moins dense. Les cristaux lipidiques sont espacés par des zones où les chaînes aliphatiques sont moins organisées et où les lipides se trouvent sous forme liquide-cristalline (Boncheva et al., 2008) (**Figure 20**). La formation de cette structure dense dans le SC (Bouwstra & Ponc, 2006) est assurée par la présence des lipides cutanés essentiels: 50% de céramides, 25% de cholestérol, 15% d'acides gras libres (Feingold & Elias, 2014). Cette barrière peut être altérée par l'utilisation de solvants organiques qui vont extraire les lipides (Clarkson & Gordon, 2015) ou au contraire être renforcée par l'utilisation de traitements topiques à base de lipides pour lutter contre certains troubles de la perméabilité

cutanée (Feingold & Elias, 2014). Lors d'une agression ou d'une lésion de la barrière cutanée les cellules de la partie supérieure de la couche granuleuse de l'épiderme sécrètent des corps lamellaires en grande quantité pour augmenter la proportion de lipides dans le SC (Menon et al., 2012). Les lipides extra-cutanés peuvent aussi participer à la régénération de la barrière lipidique cutanée (Feingold & Elias, 2014).



**Figure 20 :** Différents types d'organisation des lipides dans le Stratum corneum : orthogonale OR, hexagonale HEX et liquide-cristalline LIQ (Boncheva et al., 2008).

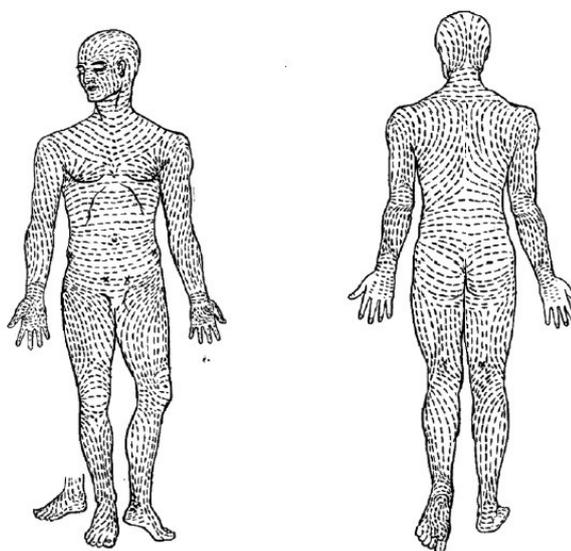
#### 2.1.2.2. Barrière mécanique

Les propriétés mécaniques de la peau sont principalement assurées par le derme et sa matrice extra cellulaire où les fibres de collagène sont majoritairement impliquées dans le phénomène de résistance à la tension (Hendriks et al., 2006). Lorsque la peau est soumise à une contrainte mécanique, une résistance et une réponse élastique sont mises en place grâce aux fibres de collagène I et III et aux fibres élastiques (Breitkreutz et al., 2013). A cause de leur composition, la réponse mécanique des tissus est non linéaire (Joodaki & Panzer, 2018) : pour une faible contrainte seules les fibres élastiques répondent tandis que les fibres de collagènes restent lâches et non porteuses. Les fibres de collagène sont recrutées lorsque la contrainte s'accroît ce qui augmente la rigidité du tissu. Enfin dans une troisième phase toutes les fibres de collagènes sont recrutées et la peau est à sa rigidité maximale. Une fois cette contrainte terminée, la peau revient spontanément et progressivement à sa forme de départ (Piérard, 1999). Chez l'Homme la peau est constamment sous tension ce qui met en évidence

des lignes de Langer avec les fibres de collagène orientées parallèlement au sens de la tension maximale (Diridollou et al., 2000) (**Figure 21**).

Les propriétés mécaniques de la peau ne peuvent pas être seulement attribuées aux fibres de collagène et d'élastine présentes dans le derme : il s'agit d'un phénomène plus complexe qui fait intervenir toutes les couches de la peau (Piérard, 1999). En effet, le SC est une membrane compacte avec une forte flexibilité et une faible capacité d'élongation ; il repose sur l'épiderme viable composé de kératinocytes peu déformables à cause de la présence de filaments intermédiaires de kératine dans leur cytoplasme. Le derme papillaire présente des papilles dermiques à sa surface qui s'aplatissent sous l'effet de la contrainte alors que le derme réticulaire sous-jacent contribue à la majeure partie des fonctions de tension de la peau grâce à la présence de gros faisceaux de collagène connectés et emballés dans des plans parallèles à la surface cutanée.

Enfin le gras sous-cutané composant l'hypoderme permet aux couches supérieures de se mettre en tension. L'âge et l'exposition aux rayonnements UVs ont un effet sur la réaction de la peau face aux contraintes mécaniques puisqu'une fragmentation des fibres élastiques est observée ce qui entraîne une perte d'élasticité.



**Figure 21** : Lignes de Langer définies par les fibres de collagène dans le derme (Joodaki & Panzer, 2018).

### 2.1.2.3. Barrière contre la perte en eau

La peau assure une fonction barrière pour empêcher les éléments extérieurs de pénétrer dans l'organisme mais également pour limiter la perte en eau endogène (Proksch et al., 2009). Son rôle dans la régulation homéostasique de l'eau dans le corps est lié à la capacité de contrôle de la perméabilité cutanée du SC (Phuong & Maibach, 2016). La barrière physique formée par les cornéocytes joints par les cornéodesmosomes et les lipides du SC est imperméable à

l'exception d'une faible perte en eau qui hydrate les couches externes du SC pour qu'il conserve sa plasticité (Rawlings & Matts, 2005). Cette eau est aussi nécessaire aux réactions enzymatiques qui permettent la maturation du SC et sa desquamation. A part les lipides lamellaires intercellulaires qui forment une barrière semi perméable, les « natural moisturizing factors » NMF contenus dans les cornéocytes jouent un rôle important dans la régulation des mouvements hydriques à travers le SC. Ces derniers sont formés par du matériel intra et extra cellulaire hygroscopique tels que l'acide hyaluronique, les acides aminés libres issus de la dégradation de la filaggrine et le glycérol qui retiennent l'humidité au niveau de la couche cornée pour lutter contre l'effet dessiccateur de l'environnement. La composition lipidique interconéocytaire est très importante puisqu'un déficit dans l'un des 3 types de lipides indispensables induit un trouble de la perméabilité se traduisant par une augmentation de la perte insensible en eau (PIE ; transepidermal water loss (TEWL)) (Menon, 2002).

#### 2.1.2.4. Barrière immunologique et antibactérienne

La barrière cutanée a aussi une propriété de barrière immunologique et antibactérienne qui s'explique par différentes propriétés de la peau. En effet, la surface cutanée est recouverte d'un film constitué de produits de la kératinisation de l'épiderme et du film hydro lipidique. Ce dernier est constitué d'une phase aqueuse et d'une phase lipidique qui interagissent avec la flore cutanée. Les bactéries présentes à la surface de la peau font partie de la flore résidente non pathogène ou de la flore transitoire, qui constituent ensemble le microbiote cutané comprenant aussi les champignons et les virus (Coates et al., 2019). Le film de surface contrôle aussi le pH de la surface cutanée qui se situe entre 4,1 à 5,8 avec des variations notamment au niveau de la tête, du tronc et des extrémités. Le maintien du pH est essentiel pour le maintien de l'activité anti microbienne : un pH acide limite la colonisation par les bactéries pathogènes (Proksch, 2018). De plus le pH influence la desquamation des cornéocytes et donc le maintien de la barrière cutanée en ayant un effet sur le catabolisme des éléments structurels. Le pH cutané peut varier suite à l'application de produits topiques ou de détergents ; l'acidification est utilisée pour le traitement des blessures car elle entraîne une augmentation de l'activité antimicrobienne accompagnée de l'altération de l'activité des protéases, de la libération d'oxygène, de l'augmentation de l'angiogenèse et de l'épithélialisation. Les lipides de la barrière cutanée et leurs produits de dégradation présentent donc des propriétés antimicrobiennes intrinsèques (Feingold & Elias, 2014).

La peau n'est pas seulement une barrière car elle présente une immunité spécifique qui permet de la qualifier comme organe lymphoïde périphérique (Matejuk, 2018). L'immunité est assurée par plusieurs types cellulaires : les cellules de Langerhans et les lymphocytes dans l'épiderme, plusieurs sous-populations de cellules dendritiques, des macrophages, des lymphocytes et des mastocytes dans le derme. L'efficacité du système immunitaire de la peau dépend

fortement de la communication entre les cellules cutanées et les cellules immunitaires ; par exemple les kératinocytes ont un rôle dans l'immunité innée et adaptative puisqu'ils participent avec les neutrophiles à la formation de peptides antimicrobiens et à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$ ). Le vieillissement cutané affecte les capacités de réponse immunitaire et entraîne une augmentation des infections cutanées et des cancers.

#### 2.1.2.5. Barrière thermique

L'hypoderme est constitué d'adipocytes chargés de lipides. Ces cellules graisseuses peuvent être de 2 types. Les cellules blanches ou beiges sont spécialisées dans le stockage d'énergie sous forme de triglycérides libérés par hydrolyse enzymatique (Cohen & Spiegelman, 2016). Le tissu adipeux constitué de cellules brunes est quant à lui un lieu privilégié de la thermogénèse qui est essentielle pour la survie en milieu froid car l'hydrolyse du gras va entraîner la production de chaleur (Harms & Seale, 2013).

#### 2.1.2.6. Barrière contre les rayonnements UVs

Les rayonnements UVs représentent un facteur de risque important dans le développement de mélanomes et autres cancers cutanés (Natarajan et al., 2014). Ces cancers sont moins fréquents chez les personnes avec la peau pigmentée : les mélanocytes présents dans la couche basale de l'épiderme produisent la mélanine qui absorbe les UVs pour limiter la formation de lésions photo-induites sur l'ADN (Fajuyigbe et al., 2018). La couleur de la peau est déterminée par la mélanine dans l'épiderme et par le ratio entre les 2 pigments qui la composent : l'eumélanine (noir) et la phéomélanine (clair). La quantité de ces deux pigments est déterminée génétiquement mais il y a aussi une influence des facteurs environnementaux.

#### 2.1.2.7. Fonction sensorielle

La peau ne remplit pas seulement des fonctions barrières puisque c'est l'organe médiateur du toucher. Son innervation est réalisée par différents neurones sensoriels qui transmettent différentes informations : les nocicepteurs pour la douleur, les prurirécepteurs pour la sensation de grattage, les thermorécepteurs pour ce qui est relatif à la température, et les mécanorécepteurs à seuil bas (MSB) pour les stimuli mécaniques non liés à la douleur et au toucher (Zimmerman et al., 2014). La peau des mammifères est recouverte de poils à plus de 90% : ce type de peau est associé au toucher émotionnel tandis que la peau qui se situe sur la paume des mains et la plante des pieds permet le toucher discriminant. Il y a d'autres types de peaux spécialisées selon le rôle qu'elles jouent : au niveau génital on retrouve de la peau lisse spécialisée pour le plaisir sexuel sur le clitoris et le pénis, la peau des lèvres est spécialisée pour l'aide à la localisation de la nourriture. On appelle les téguments de ces parties anatomiques les semi-muqueuses.

### **2.1.3. Mécanismes et voies d'absorption**

De par sa localisation et ses propriétés, la peau est une interface entre le milieu extérieur et les organes. Cette barrière semi-perméable régule le passage de diverses substances (molécules chimiques avec une effet pharmacologique, éléments étrangers pathogènes...) via différentes voies d'absorption et selon une cinétique précise.

#### **2.1.3.1. Voies d'absorption**

La voie transdermique est une voie de choix pour la délivrance de molécules car la peau possède une grande surface accessible facilement. La molécule peut être appliquée en topique sous la forme d'un dispositif transdermique tel qu'un patch pour assurer une délivrance en continue, ou sous la forme d'une liquide ou d'un semi-solide qui pénètre au sein des différentes couches de la peau. L'organisation intrinsèque du SC en brique et mortier limite le passage des molécules hydrophiles (Naik et al., 2000) ce qui fait que la barrière cutanée est peu perméable (Lademann et al., 2011). Trois voies sont retrouvées au niveau cutané pour permettre le passage des molécules à travers le SC (Lane, 2013) (**Figure 22**) :

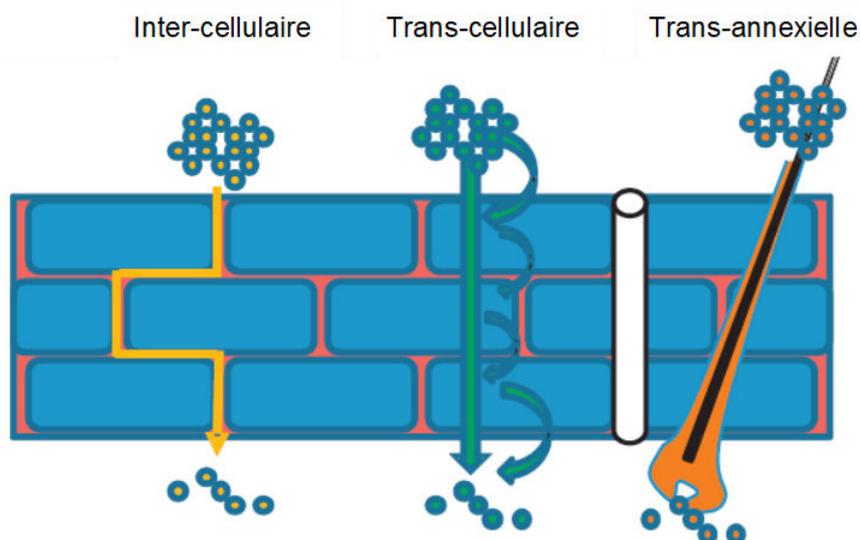
- la voie intercellulaire représente la voie majoritaire : les molécules lipophiles progressent au sein de la matrice lipidique entre les cornéocytes

- la voie trans-cellulaire : les molécules passent à travers les cornéocytes sans pénétrer dans la matrice lipidique

- la voie trans-annexielle : elle correspond au passage des molécules à travers la peau via les appendices cutanés tels que les follicules pileux ou les glandes sébacées. Les substances déposées en topique s'accumulent tout au long des appendices cutanées qui forment alors des réservoirs (Ngo et al., 2010). Cette voie d'absorption reste minoritaire et non significative car les glandes sébacées et les follicules pileux occupent seulement 0,1% de la surface cutanée (Lane, 2013).

Les molécules hydrosolubles pénétreront par les voies trans-cellulaire et trans-annexielle (Bos & Meinardi, 2000) tandis que des molécules dites amphiphiles, c'est-à-dire présentant une partie lipophile et une partie hydrophile, pourront pénétrer par les voies inter-cellulaire et trans-cellulaire selon leurs propriétés physico chimiques.

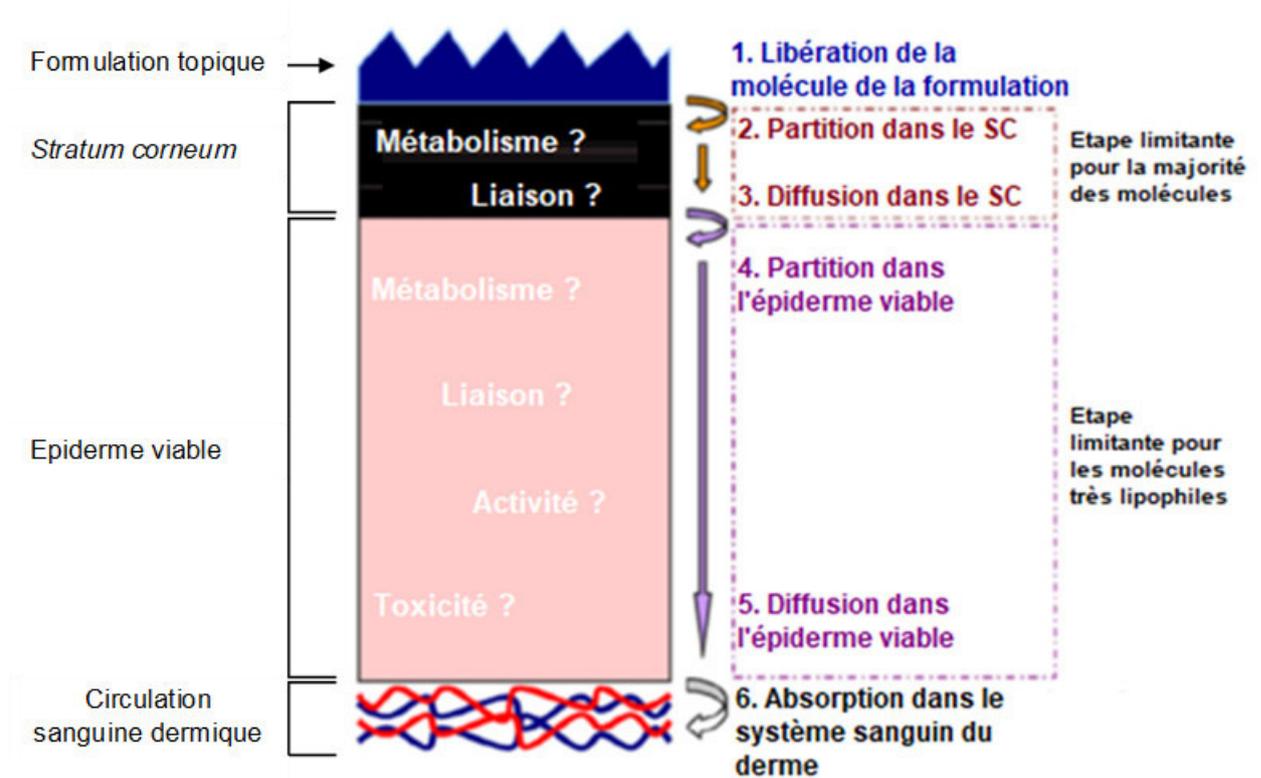
Les capacités d'absorption de la peau sont variables en fonction du site anatomique et donc du nombre de couches cellulaires composant le SC (Ngo et al., 2010).



**Figure 22 :** Différentes voies d'absorption cutanée à travers le stratum corneum (Lane, 2013).

#### 2.1.3.2. Cinétique d'absorption

Lorsqu'un produit est appliqué en topique plusieurs étapes se succèdent avant que la molécule active soit délivrée dans la circulation sanguine. Dans un premier temps elle doit être libérée de la formulation et pénétrer à travers le SC (Lane, 2013). La diffusion à travers le SC est complexe puisqu'elle est composée de 15 étapes qui dépendent à la fois des propriétés physico chimiques de la molécule, du véhicule d'application et de la méthode d'application (Phuong & Maibach, 2016). La progression de la molécule à travers le SC est aussi dictée par le gradient de diffusion qui est un processus cinétique passif. La loi de Fick décrit le déplacement de particules du milieu avec la concentration la plus élevée vers le milieu avec la concentration la plus faible pour obtenir un état d'équilibre avec une homogénéité de concentration lorsque deux milieux sont séparés par une membrane perméable. Lorsque la molécule arrive dans la dernière assise cellulaire composant le SC il va y avoir un phénomène de partition dans l'épiderme viable suivi par la diffusion au sein de cette couche avant la diffusion dans le derme et la prise en charge par le réseau vasculaire dermique (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Cinétique d'absorption cutanée lors d'une application topique ; adapté de (Lane, 2013).

Le passage transcutané de molécules est donc régulé par les propriétés intrinsèques des différentes couches de la peau et par celles de la molécule : l'ensemble de ces paramètres compose la **Règle des 5 de Lipinski** pour définir un bon candidat médicament (Choy & Prausnitz, 2011) :

- la masse moléculaire doit être  $< 500$  Da
- la structure ne doit pas comporter plus de 5 donneurs de liaison hydrogène
- la structure ne doit pas comporter plus de 10 accepteurs de liaison hydrogène
- le  $\log P$  (coefficient de partition octanol/eau) doit être  $< 5$

Les composés lipophiles, avec  $\log P$  positif, se dissolvent et diffusent facilement au sein du SC mais ils ont une diffusion limitée dans l'épiderme viable et le compartiment sanguin hydrophile (Klingner, 2007). Idéalement les molécules possèdent une partie lipophile et une partie hydrophile pour ne pas rester stockées dans le SC : ce sont des composés amphiphiles (Naik et al., 2000). La pénétration cutanée des composés chimiques peut être prédite à l'aide de modèles mathématiques basés sur leurs propriétés physico chimiques : il s'agit du quantitative structure activity relationship (QSAR) (Chen et al., 2018). Des modèles appelés quantitative structure permeability relationship (QSPR) intègrent aussi le structure hétérogène du SC (Lian et al., 2008).

La cinétique d'absorption d'un produit peut être modifiée par des phénomènes chimiques et/ou physiques. La molécule elle-même peut être modifiée sous forme de pro-drogue par dérivatisation pour augmenter sa lipophilie afin de favoriser son passage à travers le SC avant une métabolisation pour revenir à la molécule de base diffusant facilement dans les régions hydrophiles (Naik et al., 2000). Des composés chimiques augmentant la pénétration cutanée peuvent aussi être utilisés au sein des formulations appliquées en topique pour altérer la fonction barrière de la peau de façon réversible (Bos & Meinardi, 2000). Il existe différents types de composés tels que des alcools, amines, terpènes, esters et surfactants qui vont agir selon différents modes d'actions : les alcools par exemple solubilisent les lipides du SC. L'augmentation de la pénétration cutanée peut aussi être la conséquence de la mise en place de conditions occlusives lors de l'application topique. En effet, l'occlusion entraîne une augmentation de la température et une pénétration jusqu'à 5 fois plus rapide du chimique (Klingner, 2007). Ce résultat s'explique par le fait que l'évaporation du produit est limitée et que la PIE est bloquée ce qui augmente l'hydratation du SC qui est linéairement corrélée avec l'absorption cutanée (Ngo et al., 2010). L'utilisation de dispositifs externes de type ultrasons ou iontophorèse modifie la cinétique d'absorption cutanée. Enfin, des phénomènes intrinsèques tels que le vieillissement ou une pathologie cutanée modifient l'organisation lipidique et donc la perméabilité cutanée pour favoriser le passage de molécules exogènes (Bouwstra & Ponec, 2006; Clarkson & Gordon, 2015).

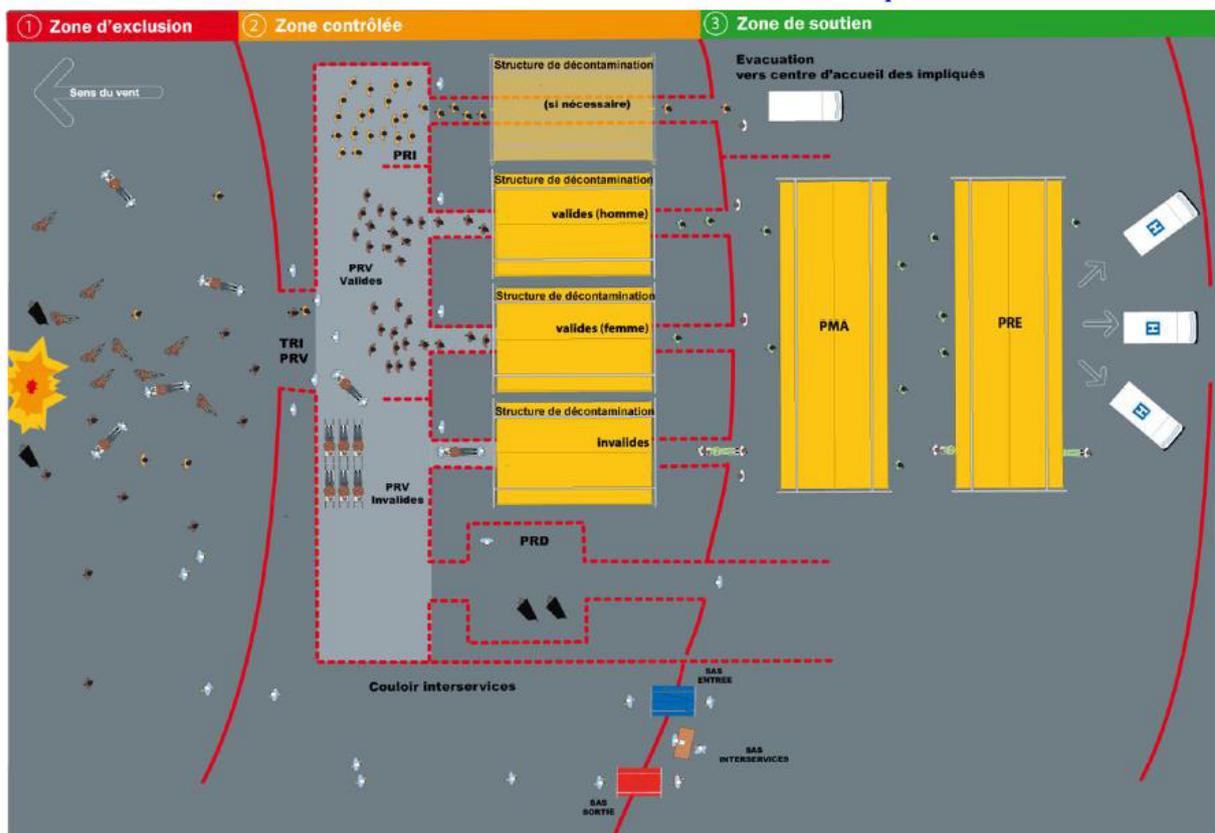
## 2.2. Principes de la décontamination

Après la survenue d'un incident ou d'une attaque Nucléaire, Radiologique, Biologique ou Chimique (NRBC) un processus de décontamination est mis en place. La décontamination se déroule en plusieurs étapes, en débutant par le tri des victimes selon leur degré d'atteinte et leur mobilité. Ensuite leur prise en charge est assurée pour déterminer le contaminant impliqué avant d'effectuer une décontamination à grande échelle. Dans certaines conditions ce type de décontamination n'est pas possible ce qui implique l'utilisation de systèmes de décontamination individuels. Afin de prédire leur efficacité, différents modèles d'étude sont utilisés en laboratoire : cellules de diffusion, modèles de peau *ex vivo*, animaux de différentes espèces pour les études *in vivo*.

### 2.2.1. Mise en place de la décontamination de masse

En France, la réponse à un évènement NRBC est gérée par le préfet avec le plan département et zonal PIRATOX. Le délai avant la mise en place de la décontamination est un des éléments clef pour assurer une bonne efficacité de décontamination suite à un incident ou une attaque NRBC. La reconnaissance de l'évènement toxique est l'étape qui initie la diffusion de l'appel vers les services de premiers secours concernés afin que les moyens de secours soient acheminés sur le lieu concerné. La « **Circulaire 700-SGDN-PSE-PPS Moyens de secours pour attaque terroriste chimique** » décrit la mise en place d'un zonage précédant le montage opérationnel des structures de décontamination (**Figure 24**). La première des 3 zones retrouvées est la zone d'exclusion : il s'agit de la zone contaminée qui comprend la zone de danger immédiat et la zone de danger sous le vent (500 mètres si le ciel est découvert). Juste après, dans le sens opposé au vent, se trouve la zone contrôlée où sont retrouvés les points de regroupement des victimes (PRV) et les structures de décontamination. Cette zone a un fonctionnement très règlementé afin de réduire la contamination et de prévenir la contamination croisée. La zone de soutien est la zone propre qui se trouve en aval dans le sens opposé au vent.

Schéma général d'une intervention face à une action terroriste mettant en œuvre des matières chimiques



PRV = POINT DE REGROUPEMENT DES VICTIMES SYMPTOMATIQUES  
PRD = POINT DE REGROUPEMENT DES PERSONNES DECEDEES

PRI = POINT DE REGROUPEMENT DES PERSONNES IMPLIQUEES  
PMA = POSTE MEDICAL AVANCE

PRE = POINT DE REPARTITION DES EVACUATIONS

**Figure 24 :** Zonage réalisé lors d'un évènement CRBN conformément à la circulaire 700-SGDN-PSE-PSS Moyens de secours pour attaque terroriste chimique.

Les victimes sont extraites de la zone d'exclusion pour limiter leur contact avec l'atmosphère toxique et pour réaliser une étape de détection et d'identification du toxique. Le papier détecteur PDF1 est utilisé à cet effet : il permet l'identification de composés chimiques de guerre liquides en changeant de couleur à leur contact (**Figure 25**). Cette étape est très compliquée en terrain opérationnel ce qui entraîne un traitement de façon globale sans antidote spécifique dans un premier temps (Clarkson & Gordon, 2015).



**Figure 25 :** Papier détecteur PDF1 ([www.ouvry.com](http://www.ouvry.com))

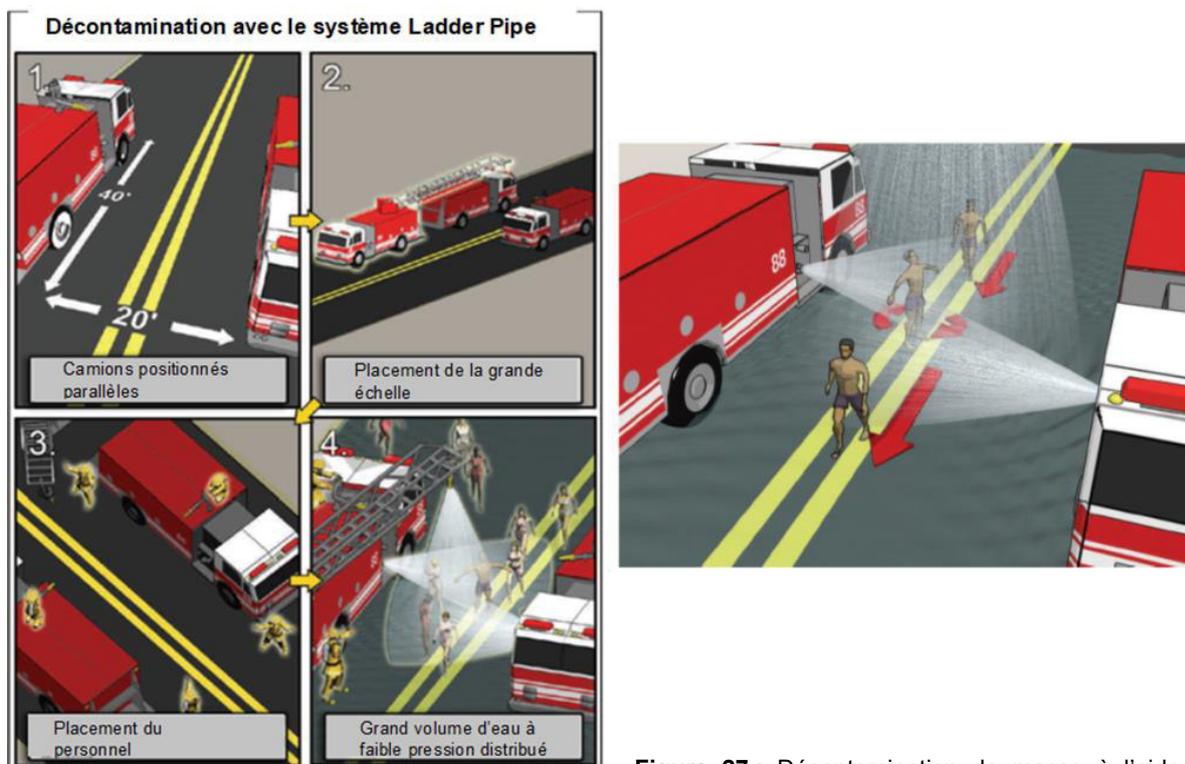
La zone contrôlée est organisée en plusieurs structures de décontamination d'urgence. Les victimes sont triées en fonction de leur mobilité, des symptômes et d'une éventuelle contamination visuelle avant un second tri médical qui prend en compte leur état clinique et leur prise en charge médicalisée. Les personnels qui œuvrent dans cette zone possèdent des équipements de protection individuelle pour éviter le risque d'exposition secondaire et de contamination (**Figure 26**).



**Figure 26 :** Exemple d'un équipement de protection individuelle avec une pompe à air utilisé par l'Armée Américaine (Braue et al., 2008).

La décontamination des victimes est réalisée par le retrait des habits, ce qui réduit la quantité de contaminant associé à l'individu de 75 à 90 % (Houston & Hendrickson, 2005). Les vêtements sont déposés dans des sacs en plastique identifiés et fermés pour éviter toute aérosolisation ou évaporation du contaminant suivant qu'il soit sous forme solide ou liquide, puis les victimes appliquent un protocole de décontamination individuelle. La communication entre le personnel des unités de soin et les victimes est essentielle lors de cette étape pour permettre d'assurer l'efficacité du protocole (Carter et al., 2016). Une tenue « propre » est ensuite fournie aux victimes qui progressent dans la zone de soutien qui possède un poste médical avancé et qui gère leur recensement et leur transfert vers les établissements de santé. Cette étape est cruciale pour éviter l'engorgement des hôpitaux avec des patients asymptomatiques (Baxter et al., 2020).

Dans certaines situations ce type de dispositif ne peut pas être mis en place ce qui implique une réponse opérationnelle spécialisée (Chilcott, Mitchell, et al., 2019). Il s'agit du déploiement de ressources spécialisées et d'une décontamination à l'aide du système de propulsion d'eau à grande échelle (ladder pipe) (**Figure 27**) : des camions de pompier se placent de façon parallèle afin de créer un couloir dans lequel les victimes vont circuler après avoir retiré leurs vêtements contaminés. Lors de leur progression elles seront aspergées par de grands volumes d'eau tempérée à 30-35°C et à fort débit, directement distribuée depuis les camions.



**Figure 27** : Décontamination de masse à l'aide du système de propulsion d'eau à grande échelle (Lake et al., 2013).

Ces protocoles de décontamination à grande échelle sont développés et testés grâce à des essais d'exposition *in vivo* chez l'Homme en variant les modes de contamination, la température et l'humidité, le type de vêtements et le contaminant pour représenter au mieux les différentes situations susceptibles de se produire (Baxter et al., 2020).

### *2.2.2. La décontamination individuelle*

La décontamination est définie par le retrait ou la neutralisation du composé toxique de l'individu, de la structure, de l'équipement ou de l'environnement (Schwartz et al., 2012). Elle a pour but de diminuer l'exposition du patient au toxique ainsi que l'exposition secondaire des équipes médicales. Les prérequis d'un décontaminant sont : l'efficacité contre un grand nombre de contaminants, la sécurité d'utilisation, une application facile, une action rapide, la stabilité au cours du temps et sous différentes conditions atmosphériques et le faible coût (Bjarnason et al., 2008). Afin d'être efficaces contre les composés chimiques de guerre et les toxiques chimiques industriels, les décontaminants doivent agir à la surface de la peau pour atteindre le toxique à neutraliser sans former des produits toxiques et augmenter l'absorption cutanée. Théoriquement la pénétration cutanée d'un composé chimique contaminant est stoppée après son retrait de la peau, mais en cas de mauvaise décontamination des résidus peuvent persister à la surface cutanée et entraîner une contamination prolongée (Dennerlein et al., 2015). Les chimiques de guerre sont des composés lipophiles avec une faible masse moléculaire ce qui favorise leur absorption : on observe une corrélation positive entre la quantité de toxique contenue dans le SC et l'absorption du contaminant pendant 4 jours (Zhu et al., 2016). Ce phénomène s'explique car le SC va former une couche réservoir permettant un relargage différé (Dennerlein et al., 2015).

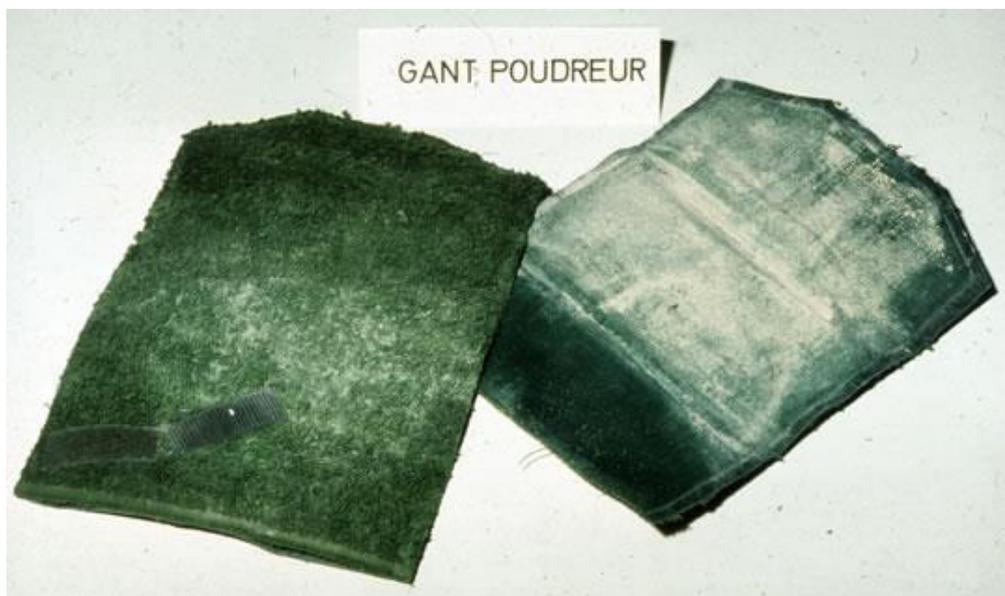
Deux types de décontamination sont opposés : la décontamination dite « sèche » fait intervenir des matériaux adsorbants telles que des poudres minérales, tandis que la décontamination « humide » est réalisée avec de l'eau ou des dispositifs visqueux.

#### *2.2.2.1. La décontamination sèche*

La décontamination sèche repose sur le retrait physique de l'agent sans nécessairement le désactiver. Cette décontamination fait partie de la réponse opérationnelle initiale : elle intervient les plus rapidement possible après la contamination et se réalise au moyen de matériaux adsorbants (Chilcott, Mitchell, et al., 2019). L'individu applique lui-même le décontaminant qui va retirer le liquide de la surface cutanée de façon passive (Kassouf et al., 2017). Il s'agit d'une décontamination d'urgence qui peut être mise en place 15 à 20 minutes après la contamination dans un contexte civil, et qui peut précéder une décontamination plus formelle mise en place par des unités spécialisées (Chilcott, Mitchell, et al., 2019).

Elle peut être réalisée avec différents matériaux, spécifiques ou non à la décontamination. Par exemple des alèses ou de l'essuie-tout, facilement retrouvés dans des ambulances ou des industries, ont démontré leur efficacité lors de la réalisation des tests *in vivo* à grande échelle avec des simulants chez l'Homme (Amlôt et al., 2017; Chilcott, Mitchell, et al., 2019; Kassouf et al., 2017). La qualité de la décontamination avec ces matériaux est dépendante de de la qualité de l'information fournie à l'utilisateur : en effet les « victimes » ayant reçu des instructions claires et précises sur la méthodologie de décontamination présentent de meilleurs résultats que ceux n'ayant reçu aucune instruction (Amlôt et al., 2017).

N'importe quel matériau de type poudre et pouvant adsorber un liquide avant de pouvoir être brossé ou enlevé de la peau peut être utilisé pour la décontamination cutanée. C'est ainsi que le sable propre, la farine ou encore le talc peuvent être utilisés dans des situations d'urgence. La **terre de foulon** est l'argile utilisée par les services des Armées pour la décontamination sèche : c'est une argile avec un fort pouvoir adsorbant, non toxique, peu chère et facilement conditionnable (Taysse et al., 2007). Elle se présente sous forme de poudre libre ou d'un gant poudreux avec une face pour le dépôt de la poudre et l'autre face pour la déplacer (**Figure 28**). Les principaux défauts de ce type de dispositif sont l'absence de détoxification de l'agent car la terre n'a pas de pouvoir neutralisant, et la formation de poussières contaminantes qui peuvent conduire à des cas de contaminations croisées et compliquer la gestion des déchets (Bjarnason et al., 2008; Taysse et al., 2007).



**Figure 28** : Gant poudreux contenant de la terre de foulon pour la décontamination sèche (kymoa.fr)

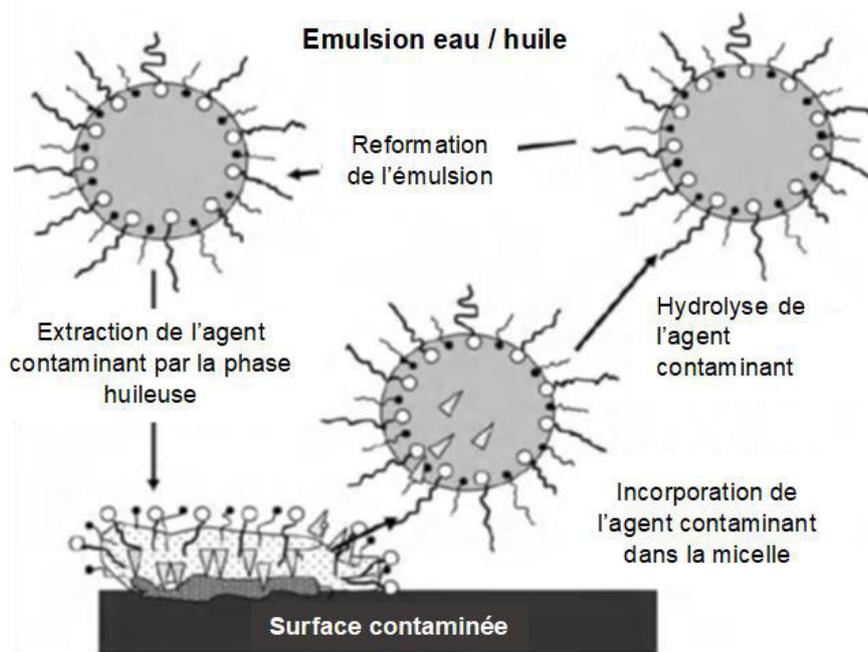
Tous ces systèmes de décontamination sèche n'entraînent pas un risque d'augmentation de la pénétration cutanée du contaminant en comparaison aux méthodes de décontamination

humide où le liquide peut entraîner le contaminant à travers les couches cutanée (Chilcott, Larner, et al., 2019).

#### 2.2.2.2. La décontamination humide

La décontamination humide repose sur plusieurs mécanismes d'action : un retrait physique du contaminant par le liquide, une solvatation et une émulsification par l'utilisation de surfactants avec des propriétés amphiphiles ou la désactivation chimique par hydrolyse ou chloration oxydative par exemple (Chan et al., 2013).

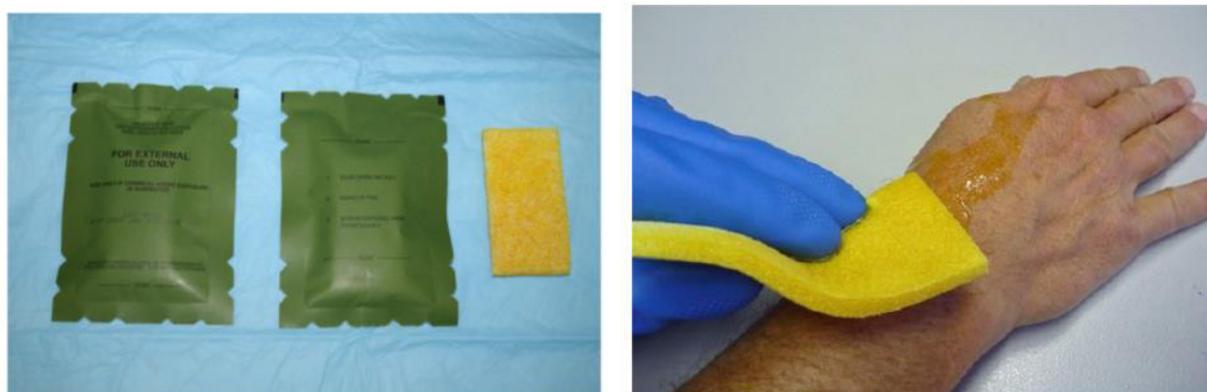
La décontamination aqueuse est la décontamination humide la plus simple à mettre en place. Elle permet la dilution du toxique ainsi que son rinçage, une diminution du taux de la réaction chimique et de la réaction inflammatoire tissulaire et permet de restaurer le pH cutané normal dans le cadre des brûlures acides et alcalines. Des paramètres tels que le flux, le volume et la température de l'eau influencent l'efficacité de la décontamination : pour garantir une décontamination efficace il est recommandé que la température de l'eau soit entre 30 et 40 °C (Pavlikova et al., 2018). L'ajout de détergents tels que le laurylsulfate de sodium va permettre le développement de micelles et d'émulsions avec une forte efficacité de décontamination (Forsberg et al., 2020; Kim et al., 2011). La formation d'émulsions va permettre de combiner les avantages d'une phase aqueuse et d'une phase organique pour avoir une phase continue huileuse qui va dissoudre le toxique avant sa prise en charge par l'eau pour l'hydrolyse (**Figure 29**). Ce type de décontamination liquide est donc idéal mais présente un défaut majeur car les détergents peuvent déranger l'organisation des lipides du SC et donc avoir un effet qui augmente la pénétration de l'agent contaminant (Phuong & Maibach, 2016). Moody & Maibach, 2006 ont mis en évidence un « wash in effect » qui peut survenir lors de la décontamination aqueuse. Il s'agit de l'augmentation de la pénétration cutanée due à une hyperhydratation de la peau qui augmente sa perméabilité (Misik et al., 2012). Une partie du contaminant passe alors dans la peau pour devenir bio disponible via le système sanguin. Cet effet « wash in » est augmenté par les surfactants qui entraînent la délipidation, la fluidisation des membranes et une irritation cutanée.



**Figure 29 :** Décontamination humide d'une surface contaminée avec de l'eau additionnée de surfactant (K. Kim et al., 2011).

Afin d'éviter le risque d'augmentation de la pénétration cutanée par le décontaminant, de nouveaux systèmes humides avec une composition plus visqueuse ont été développés. Le kit de décontamination M291 autrefois utilisé par l'Armée américaine était composé d'un applicateur en coton non tissé dans lequel était compris un adsorbant actif avec du charbon et une résine réactive (Ambergard XE-555) (Clarkson & Gordon, 2015). Après sa fixation sur le doigt, le dispositif était appliqué sur les zones contaminées entraînant le dépôt d'une poudre noire après que la résine échangeuse d'ions ait fixé l'agent toxique. A l'inverse de la terre de foulon cette dernière décompose les agents neurotoxiques et vésicants (Capoun & Krykorkova, 2014). Ce système permettait une décontamination efficace en une seule étape de façon non toxique et non irritante (Braue et al., 2011). L'efficacité de décontamination du système reposait tout de même majoritairement sur le déplacement physique du contaminant par l'applicateur car la vitesse d'hydrolyse des agents était lente (Kim et al., 2011). Ce kit a été remplacé par le Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) qui est un dispositif développé par la recherche des armées au Canada et approuvé en 2003 par la Food Drug Agency (FDA) pour la décontamination de la peau exposée aux composés chimiques de guerre et aux toxines biologiques (Bjarnason et al., 2008; Fentabil et al., 2020). Ce système de décontamination repose à la fois sur un retrait physique de l'agent et sur sa neutralisation (Thors et al., 2017). Il est composé d'une éponge saturée en solution de sel de potassium et de 2,3 butanedione monoxime (KBDO) dissout dans un solvant semi aqueux de monométhyl éthers de polyéthylène glycol (Fentabil et al., 2020) (**Figure 30**). Le KBDO neutralise les toxiques alors que l'éponge assure une décontamination physique en déplaçant le toxique de la peau et en

forçant son contact avec la lotion pour que la réaction nucléophile d'inactivation se produise. Cette lotion alcaline (pH 10,35-10,85) qui présente un fort pouvoir décontaminant sur les agents neurotoxiques et vésicants décontamine une surface jusqu'à 4 m<sup>2</sup> et peut être conservée pendant 3 ans (Capoun & Krykorkova, 2014; Fentabil et al., 2018). Le RSDL représente aujourd'hui le gold standard en terme de décontamination cutanée mais son cout élevé rend son usage inapproprié pour de la décontamination de masse (Schwartz et al., 2012). Malgré ses nombreux avantages cette méthode de décontamination ne peut pas être utilisée sur les plaies car elle induit une diminution des fibres de collagène dans les phases précoces de la cicatrisation (Clarkson & Gordon, 2015). La décontamination des blessures doit donc être réalisée par un nettoyage à l'eau isotonique et le remplacement régulier des bandages qui sont alors considérés comme contaminés.



**Figure 30** : Kit de reactive skin decontamination lotion (RSDL) pour la décontamination cutanée humide (Capoun & Krykorkova, 2014; Schwartz et al., 2012).

### 2.2.3. Modèles d'étude disponibles au laboratoire

Une évaluation des différents systèmes de décontamination est nécessaire avant leur utilisation chez l'Homme. Il existe différents types de modèles d'études qui sont classés en *ex vivo* et *in vivo* suivant qu'ils correspondent à un explant ou à un animal entier.

Les procédures à mettre en place sont définies par la norme **NF X52-122 « Sécurité et protection du citoyen – NRBC-E – Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine »** du 16 janvier 2016. Elle décrit notamment les modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* ainsi que les protocoles de contamination et décontamination.

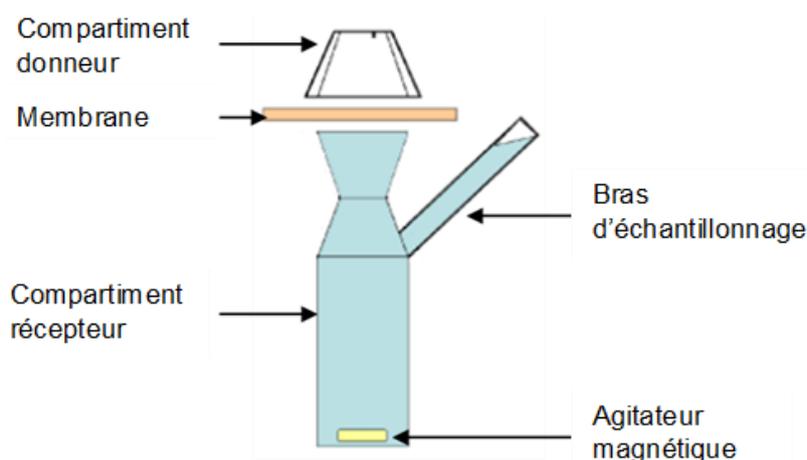
#### 2.2.3.1. Modèles *ex vivo*

L'utilisation de ces modèles permet de réaliser une étape de criblage avant de passer aux tests *in vivo* qui sont longs, coûteux et qui nécessitent une approche éthique dans la démarche expérimentale. Les tests de diffusion cutanée sont réalisés sur des explants cutanés animaux ou humains dans des conditions occlusives ou non (Josse, 2020). Le défi rencontré lors de

l'utilisation de ces modèles est la standardisation intra et inter laboratoires : afin de comparer des résultats il est nécessaire d'utiliser le même type de cellule de diffusion et le même type de membrane avec des facteurs expérimentaux identiques (Chilcott et al., 2005).

Il existe plusieurs types de **cellules de diffusion** mais elles sont toutes composées des mêmes éléments : un compartiment donneur et une membrane semi-perméable à l'interface avec le compartiment récepteur qui est équipé d'un bras d'échantillonnage pour collecter le liquide. La cellule statique de Franz est la plus utilisée (**Figure 31**) : le milieu sous agitation reste le même tout au long de l'expérience. A l'inverse la cellule « flow through » permet de mimer un environnement similaire aux conditions physiologiques car le liquide dans le récepteur est continuellement remplacé, ce qui ressemble à la circulation sanguine (Karadzovska et al., 2012; Thors et al., 2016). Du fait de son fonctionnement la diffusion statique peut entraîner une accumulation de produit dans le récepteur ou une diminution de la solubilité du composé testé dans le liquide récepteur (Chilcott et al., 2001). Pour éviter ces limitations il est nécessaire de se placer dans les conditions SINK : la concentration dans le liquide récepteur ne doit pas dépasser 30% de la concentration de saturation. De nouveaux modèles de cellules de diffusion ont été développés et sont utilisés dans des cas précis. Une cellule de diffusion miniature appelée Vitropharma® a été décrite par Salmon et al., 2015 : elle permet de réduire la taille de la membrane utilisée tout en assurant une équivalence biopharmaceutique avec la cellule de Franz pour la diffusion des composés. Pour les études de décontamination cutanée Matar et al., 2014 a développé une cellule de diffusion spécifique qui permet l'exposition d'une grande surface cutanée (20 cm<sup>2</sup>) selon des conditions proches de la réalité sur le terrain. En effet, il y a un système de contrôle de flux d'air sur la peau qui est associé à un système permettant de changer l'orientation de la peau. Des morceaux de tissus peuvent être ajoutés à la surface de la peau pour mimer les vêtements et un système de lavage à l'eau peut être utilisé pour reproduire les conditions hydrodynamiques de la décontamination de masse par propulsion d'eau à grande échelle.

Lorsque la membrane entre les compartiments donneur et récepteur est une peau, elle est placée de telle sorte que la face dermique soit en contact avec le liquide récepteur, sans former de bulles (Misik et al., 2011). Une des limites de ce type de système est le manque de représentativité de l'ensemble de la peau par rapport à un être vivant, ici seules les propriétés barrières de l'épiderme sont étudiées (Baxter et al., 2020).



**Figure 31** : Cellule de diffusion ex vivo statique (Misik et al., 2011).

La membrane semi-perméable présente entre les deux compartiments de la cellule de diffusion peut avoir différentes origines (**Tableau 8**). Les **membranes synthétiques** représentent le modèle le plus simple car elles sont faciles d'obtention et elles permettent de limiter la variabilité entre les expériences. Ce type de membrane possède de nombreuses limites dont celle de ne pouvoir être utilisé que pour du pré-criblage car il n'y a pas de possibilité d'extrapoler les résultats sur un modèle *in vivo* (Millerioux et al., 2009).

La **peau de cochon** est souvent utilisée comme modèle prédictif de la perméabilité de la peau humaine en raison des ressemblances histopathologiques et physiopathologiques entre les deux peaux (Godin & Touitou, 2007; Matar et al., 2014; Taysse et al., 2007). Tout comme chez l'Homme, selon le site de prélèvement la peau de cochon présente des variations dans l'épaisseur du SC, le nombre et la distribution des glandes ou le ratio en fibres de collagène et d'élastine. In et al., 2019 ont comparé la peau humaine abdominale avec de la peau de cochon originaire de 4 zones anatomiques (oreille, flanc, dos et bas de l'abdomen) : il n'y a pas de différences entre les épidermes qui sont tous constitués de 4 couches et les kératinocytes ont le même aspect. Le derme est quant à lui divisé en deux couches avec un réseau de fibres élastiques moins dense chez le cochon. De par sa densité en follicules pileux équivalente à l'Homme, la peau de l'oreille de cochon est la plus adaptée pour réaliser des études de diffusion *ex vivo* afin de prédire la perméabilité de la peau humaine. Bien qu'il réponde à la contamination à l'ypérite en formant des vésicules comme la peau humaine ce modèle est tout de même limité puisqu'on observe la formation d'un réservoir qui n'existe pas chez l'Homme (Taysse et al., 2007). Lors de l'extrapolation *in vivo* la majorité des tests *in vitro* ont surestimé la pénétration des composés car la peau humaine est généralement moins perméable que la peau animale (Jung & Maibach, 2015; Phuong & Maibach, 2016).

La **peau humaine** reste le meilleur modèle pour les études de pénétration cutanée *ex vivo*. En effet les données obtenues sont comparables à celles chez l'Homme *in vivo* car il n'y a pas

d'extrapolation inter-espèce à faire (Moore et al., 2014). Elle est chère car elle est difficile à obtenir : la peau est excisée sur des cadavres au niveau de la cuisse ou de l'abdomen, ou de la peau fraîche est récupérée à partir des déchets opératoires lors d'abdominoplasties (Hui et al., 2012).

Le dernier modèle de membrane semi-perméable pouvant être utilisé dans des cellules de diffusion est la **peau humaine obtenue par culture 3D**. Ce type de modèle est une alternative aux deux précédents car il permet de s'abstenir de l'extrapolation inter-espèce et de simplifier l'approvisionnement en peau. Ces modèles artificiels de peau sont complets puisqu'ils présentent la même morphologie et composition lipidique que la peau tout en possédant des marqueurs biochimiques permettant la différenciation (Netzlaff et al., 2005; Phuong & Maibach, 2016). Ces différents modèles possèdent tout de même des limitations : ils ont une faible fonction barrière car le phénomène de desquamation est altéré et des cellules non kératinisées sont retrouvées à la surface (Netzlaff et al., 2005).

Modèle <i>ex vivo</i>	Membranes	Peau de cochon	Peau humaine	Culture de peau 3D
<b>Avantages</b>	Pas de variabilité Modèle facile d'obtention	Respect de l'histopathologie et de la physiopathologie (In et al., 2019; Matar et al., 2014; Taysse et al., 2007) Modèle cohérent pour l'étude de l'ypérite car formation de vésicules (Taysse et al., 2007)	Ne nécessite pas d'extrapolation pour le <i>in vivo</i> (Moore et al., 2014) Modèle utilisable pour les études en cosmétique	Morphologie et composition lipidique maîtrisées pour être au plus près de la peau humaine (Netzlaff et al., 2005) Différents modèles selon différentes modalités de culture (Netzlaff et al., 2005) Modèle utilisable pour les études en cosmétique
<b>Inconvénients</b>	Couche simple donc pas de possibilité d'extrapoler pour du <i>in vivo</i> , permet seulement du pré-criblage (Millerieux et al., 2009)	Formation d'un réservoir dans la peau qui n'existe pas chez l'Homme (Taysse et al., 2007) Variabilité en fonction du lieu d'excision de la peau (In et al., 2019) Problèmes lors de l'extrapolation des résultats (Netzlaff et al., 2005)	Chère et difficile d'obtention (In et al., 2019)	Faible fonction barrière car cellules non kératinisées et desquamation altérée (Godin & Touitou, 2007; Netzlaff et al., 2005)

**Tableau 8 :** Comparaison des avantages et inconvénients des différents modèles *ex vivo* pour l'étude de la décontamination cutanée.

### 2.2.3.2. Modèles *in vivo*

Pour des raisons d'éthique, les tests avec des chimiques de guerre ne peuvent pas être réalisés sur l'Homme : le modèle animal est donc utilisé. Les tests sur les animaux deviennent de plus en plus controversés ce qui a amené une régulation au niveau mondial (Krishna et al.,

2020). La règle des 3R définit le cadre de l'expérimentation animale car il s'agit de remplacer, réduire et raffiner.

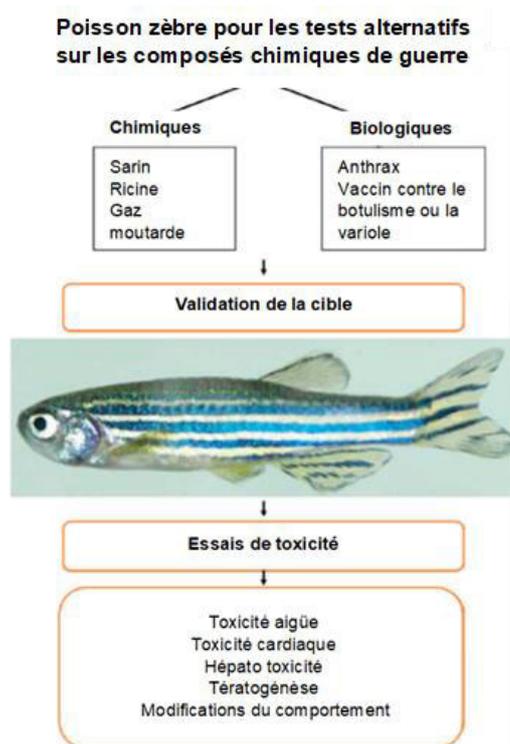
- Remplacer : l'utilisation d'animaux doit être remplacée par la modélisation informatique, l'utilisation d'invertébrés tels que le nématode ou la drosophile, l'utilisation de formes immatures de vertébrés avec des formes larvaires ou embryonnaires et la méthodologie *in vitro* avec des lignées cellulaires ou des explants issus de déchets d'abattoirs. Enfin les tests *in vivo* sur humains volontaires sont réalisés dans le cadre de procédures non invasives et n'altérant pas la santé.

- Réduire : il est nécessaire de développer des méthodes pour minimiser l'utilisation d'animaux de laboratoires et permettre aux chercheurs de comparer les données. Dans ce sens des bases de données sont créées pour permettre le partage des résultats : la conception de l'expérience ainsi que l'analyse statistique sont améliorés.

- Raffiner : il faut utiliser les avancées scientifiques pour diminuer la souffrance, la douleur, le stress et améliorer la qualité de vie des animaux durant toute la durée de l'expérimentation. L'utilisation de méthodes non invasives, la gestion de la douleur avec un protocole antalgique et analgésique adapté ou l'enrichissement du milieu permettent d'améliorer la qualité de la recherche scientifique.

Les modèles animaux sont divers et nécessitent une extrapolation adaptée à l'espèce pour prédire les résultats chez l'Homme (Baxter et al., 2020) (**Tableau 9**). Pour les études d'absorption cutanée il est important de noter que la peau animale est généralement plus perméable que la peau humaine (Jung & Maibach, 2015).

Le poisson, et plus précisément le **Danio rerio** ou **poisson zèbre**, est considéré comme un modèle intermédiaire pour les études de criblage de toxicité entre le *in vitro* et le *in vivo* (Krishna et al., 2020) (**Figure 32**). En effet le poisson zèbre possède un développement rapide et du fait de sa petite taille nécessite peu de place dans l'animalerie (Yozzo et al., 2013). Dans le cadre de l'exposition aux contaminants OP ce modèle est utilisé pour le criblage à grande échelle d'antidotes car sa production d'AChE est bien caractérisée (Faria et al., 2015). L'inhibition de l'AChE induite par les COP est comparable à celle observée chez l'Homme (Küster, 2005) et les signes cliniques de l'intoxication sont connus ce qui fait du poisson zèbre un bon modèle prédictif pour l'inhibition de l'AChE due aux COP (Kais et al., 2015). En revanche, ce modèle ne peut pas être utilisé pour évaluer l'efficacité de décontamination cutanée d'un produit en raison de la présence d'écaillés à la surface du poisson.



**Figure 32 :** Utilisation du modèle du poisson zèbre *in vivo* pour les tests sur les composés chimiques de guerre (Krishna et al., 2020).

Les rongeurs sont souvent utilisés lors d'expériences *in vivo* car ils sont facilement disponibles, peu chers et faciles à manipuler et stocker (Jung & Maibach, 2015). Le **cobaye** est utilisé en routine pour les études de toxicité percutanée (Braue et al., 2011; Joosen et al., 2013) : il possède des niveaux de carboxylestérases faibles comme l'Homme (Clarkson & Gordon, 2015) ce qui en fait un modèle pertinent pour les études avec des composés inhibiteurs de l'AChE (Fentabil et al., 2020). Le **rat** est largement utilisé pour les études de cicatrisation et de décontamination cutanée (Chan et al., 2013; Clarkson & Gordon, 2015). Lors d'une contamination aux COP des signes nicotiniques et muscariniques sont observés avant la mort de l'animal (Misik et al., 2012). La perméabilité est augmentée par rapport à l'Homme car le rat possède un épiderme et un SC plus fins, un nombre d'appendices cutanés plus élevé et une composition en lipides du SC différente (Jung & Maibach, 2015). Les **souris** de souche SKH1 hairless sont un modèle de choix pour l'étude de décontaminants cutanés car l'absence de poils permet de mettre en place un score visuel corrélé avec l'apparition d'érythèmes et d'escarres (Dorandeu et al., 2011; Taysse et al., 2011). La composition lipidique du SC est proche de celle de l'Homme ce qui permet d'utiliser cette espèce de façon adéquate pour les études de pénétration cutanée (Jung & Maibach, 2015).

Les études prédictives de l'absorption cutanée chez l'Homme sont préférentiellement réalisées chez le **cochon** (Bjarnason et al., 2008). Ce modèle est considéré comme prédictif pour la peau humaine car leurs compositions sont quasi identiques : pilosité équivalente, arrangement

des fibres de collagène et élastiques comparables, épiderme épais et différencié dans les deux cas (Clarkson & Gordon, 2015; Jung & Maibach, 2015; Simon & Maibach, 2000). Cependant des différences notables sont observées au niveau de la vascularisation qui est plus faible chez le cochon et de l'absence de glandes eccrines en comparaison avec l'Homme (Jung & Maibach, 2015; Simon & Maibach, 2000). De plus l'absorption percutanée dépend de la région étudiée : des différences significatives sont observées entre une étude de pénétration sur l'oreille ou au niveau de l'épigastre (Hamilton et al., 2004), certainement à cause de l'importance du compartiment graisseux qui limite le passage des composés (Jung & Maibach, 2015). Pour finir ces animaux ont une taille imposante ce qui complique leur gestion par l'animalerie et leur cout d'entretien est important (Clarkson & Gordon, 2015).

Le dernier modèle *in vivo* disponible pour les études de décontamination cutanée est le **singe rhésus** : sa proximité phylogénétique avec l'Homme en fait un modèle de choix (Jung & Maibach, 2015). La pilosité de certaines zones telles que les aisselles, le tronc et les jambes est faible et les variations régionales de l'absorption sont semblables à l'Homme. La taille des singes permet la collection de multiple échantillons, notamment sanguins, mais représente aussi un inconvénient pour l'entretien des animaux qui est couteux (Godin & Touitou, 2007; Jung & Maibach, 2015).

Modèle <i>in vivo</i>	Poisson	Cobaye	Rat	Souris	Cochon	Singe rhésus
<b>Avantages</b>	Dans le cadre des 3R modèle intermédiaire entre le <i>in vitro</i> et le <i>in vivo</i> pour du criblage de toxicité (Krishna et al., 2020) Pour l'intoxication aux OP production d'AChE bien caractérisée (Faria et al., 2015; Kais et al., 2015; Küster, 2005) Développement rapide et prend peu de place (Yozzo et al., 2013)	Rongeurs facilement disponibles, peu chers et faciles à manipuler et stocker (Jung & Maibach, 2015)  Le plus relevant pour les études d'inhibition de l'AChE (Braue et al., 2011; Clarkson & Gordon, 2015; Fentabil et al., 2020) Modèle de routine pour la toxicité percutanée (Braue et al., 2011; Joosen et al., 2013)	Pour les études de contamination et cicatrisation (Clarkson & Gordon, 2015; Misik et al., 2012) Conseillé pour les études de toxicologie (Chan et al., 2013)	SKH1 hairless pour appliquer les contaminants en topique et observer des réactions cutanées (Dorandeu et al., 2011; Taysse et al., 2011)	Modèle de choix pour l'absorption cutanée (Bjarnason et al., 2008; Hamilton et al., 2004) Modèle prédictif de la peau humaine car quasi identique : pilosité, épiderme, arrangement des fibres de collagène et élastiques (Clarkson & Gordon, 2015; Jung & Maibach, 2015; Simon & Maibach, 2000)	Proche de l'Homme phylogénétiquement, variations régionales d'absorption semblables à l'Homme, collection de multiples échantillons sanguins possible grâce à la taille (Jung & Maibach, 2015)
<b>Inconvénients</b>	Pas un modèle d'étude de la perméabilité cutanée	Perméabilité plus importante que chez l'Homme (Jung & Maibach, 2015) Différence de pénétration cutanée par rapport à l'Homme (Chan et al., 2013)			Taille imposante des animaux compliqués à gérer par l'animalerie et chers (Clarkson & Gordon, 2015) Importance du site anatomique car variation de l'absorption notamment oreille/épigastre (Hamilton et al., 2004; Simon & Maibach, 2000) Différences dans la vascularisation et les glandes (Jung & Maibach, 2015; Simon & Maibach, 2000)	Cout et disponibilité (Godin & Touitou, 2007; Jung & Maibach, 2015)

**Tableau 9 :** Comparaison des avantages et inconvénients des différents modèles *in vivo* pour l'étude de la décontamination cutanée.



### 3. Les argiles et la décontamination innovante

#### 3.1. Les argiles

Le terme « argile » regroupe un ensemble d'éléments issus d'une matière rocheuse naturelle. Ce groupe est très hétérogène tant au niveau des structures, des propriétés que de l'usage qu'il en est fait.

##### 3.1.1. Structure

Un minéral est un élément ou un composé chimique présent sous forme cristalline et qui résulte d'un procédé géologique (Nadziakiewicz et al., 2019). On retrouve parmi ces composés les minéraux argileux et les argiles : les deux termes ne sont pas équivalents et décrivent chacun des structures différentes (Bergaya & Lagaly, 2006). Les minéraux argileux n'ont pas une définition précise : en effet il s'agit de structures organisées en couches sans réelle définition de taille, dont les couches ou les particules sont anisotropes. Il existe plusieurs types de surface appartenant à cette famille et leur modification est simple pour obtenir de nouveaux composés. La majorité des minéraux argileux présente de grandes propriétés de plasticité et la spécificité de durcir au séchage. A l'opposé, les argiles ont une origine exclusivement naturelle et la taille de leurs particules est un élément clef pour leur définition. Les phyllosilicates qui les composent possèdent les mêmes propriétés de plasticité et de durcissement que les minéraux argileux (**Tableau 10**).

	Minéraux argileux	Argiles
<b>Origine</b>	Naturelle ou synthétique	Naturelle
<b>Taille des particules</b>	Pas de critère de taille	Fines (2-4 µm)
<b>Constituants</b>	Variés	Majoritairement des phyllosilicates
<b>Propriétés</b>	Plasticité	Plasticité
	Durcissement au séchage	Durcissement au séchage

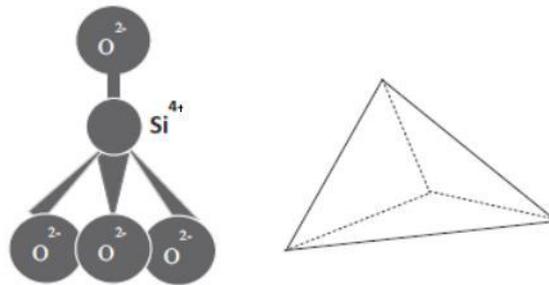
**Tableau 10** : Comparaison des minéraux argileux et des argiles (Bergaya & Lagaly, 2006).

Le terme argile fait donc référence à des alumino-silicates composés principalement de matériaux à grains fins avec une fraction colloïdale de terre, roches, sédiments et eau (Gitari & Mudzielwana, 2018). Ces petits phyllosilicates hydratés, avec une granulométrie fine et des particules cristallines de 2-4 µm présentent une structure cristalline unique (Jlassi et al., 2018). En effet tous les composés de cette famille sont formés à partir d'atomes d'aluminium, silicate

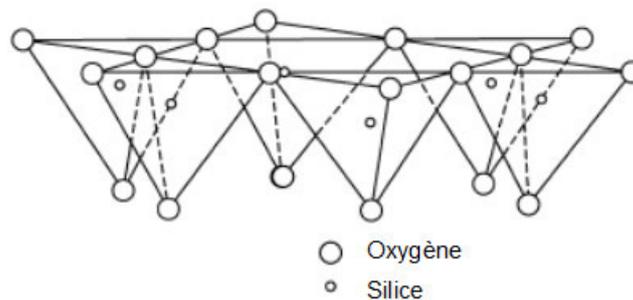
et oxygène organisés en deux types de feuillets correspondant aux deux unités basiques des phyllosilicates (Galan, 1996; Nadziakiewicz et al., 2019).

Suivant l'organisation et l'orientation des atomes, deux types de feuillets sont formés :

- le feuillet tétraédrique : un atome de  $\text{Si}^{4+}$  central est coordonné avec 4  $\text{O}^{2-}$  pour former un tétraèdre  $\text{SiO}_4^{4-}$  (**Figure 33**) qui est lié au tétraèdre adjacent en partageant 3 O des angles ce qui permet de former une maille 2D hexagonale dans laquelle tous les tétraèdres sont orientés dans la même direction (**Figure 34**) (Galan, 1996; Mousa et al., 2018). Les atomes d'oxygène aux angles du tétraèdre peuvent être remplacés par des groupements hydroxyles.

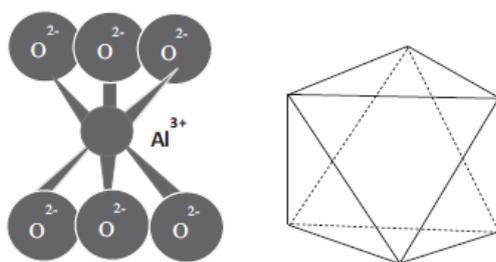


**Figure 33 :** Tétraèdre de  $\text{SiO}_4^{4-}$  composant l'unité de base des feuillets tétraédriques des phyllosilicates (Uddin, 2017).

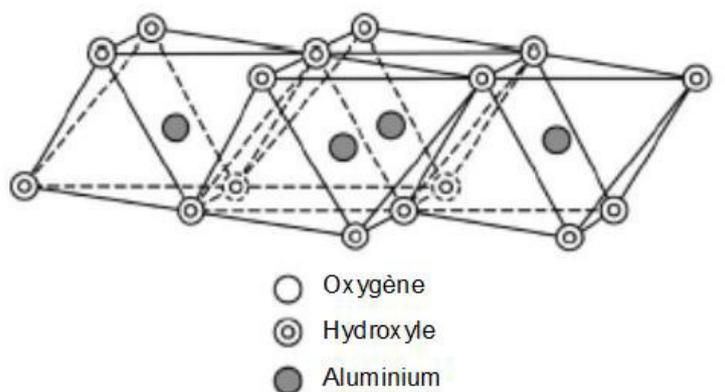


**Figure 34 :** Feuillet tétraédrique composé d'unités  $\text{SiO}_4^{4-}$  orientées dans la même direction (Galan, 1996).

- le feuillet octaédrique : un cation métallique est coordonné avec 6  $\text{O}^{2-}$  ou  $\text{OH}^-$  pour former un octaèdre (**Figure 35**). La nature de l'ion métallique va conditionner la forme du feuillet lorsque les octaèdres vont s'organiser entre eux : la présence de  $\text{Mg}^{2+}$  permettra la formation d'un feuillet trioctaédrique alors que  $\text{Al}^{3+}$  va conduire à la formation d'un feuillet dioctaédrique (**Figure 36**) (Mousa et al., 2018). Les feuillets vont être formés par le partage d'atomes d'oxygène entre les octaèdres pour former une structure plane.



**Figure 35 :** Octaèdre de  $AlO_6^{9-}$  composant l'unité de base des feuillets octaédriques des phyllosilicates (Uddin, 2017).

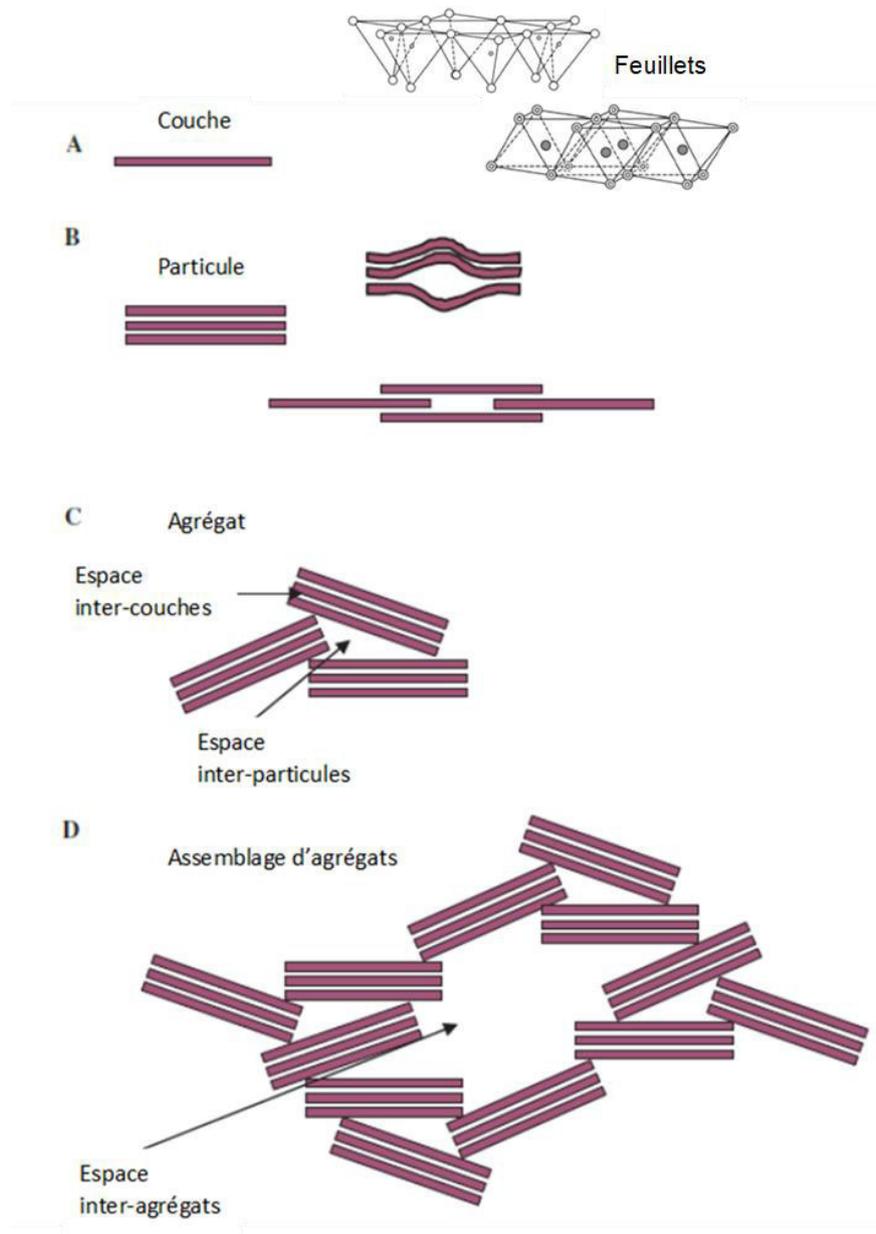


**Figure 36 :** Feuillelet dioctaédrique composé d'unités  $AlO_6^{9-}$  formant une surface plane (Galan, 1996).

Les feuillets vont s'assembler selon des motifs précis en partageant des oxygènes ou des hydroxyles pour former des couches neutres ou chargées négativement dont l'arrangement et la composition vont être à l'origine des différences physiques et chimiques entre les différentes argiles (Galan, 1996). La présence de minéraux associés et d'impuretés, de type quartz ou oxyde de fer, va aussi influencer sur les propriétés intrinsèques aux argiles (Nadziakiewicz et al., 2019).

La structure des argiles est définie par l'assemblage des couches en particules qui vont ensuite former des agrégats qui sont observables macroscopiquement (Bergaya & Lagaly, 2006). La disposition des particules pour la formation des agrégats entraîne l'apparition d'espaces inter-particulaires puis inter-agrégats dus à la relative rigidité des particules dans leur forme brute (**Figure 37**).

L'organisation des feuillets au sein des couches définit 3 types de couches qui permettent de classer les différentes argiles en 4 familles et ainsi déterminer leurs propriétés (Gitari & Mudzielwana, 2018).



**Figure 37 :** Diagramme présentant l'argile à différents niveaux : **A** = couche constituée par l'assemblage des feuillets octaédriques et tétraédriques ; **B** = particule formée par l'assemblage de plusieurs couches, les couches peuvent se déplacer ou gonfler créant ainsi des pores ; **C** = agrégat résultant de l'assemblage de plusieurs particules avec la définition d'espace inter-particules ; **D** = assemblage d'agrégat lorsque plusieurs agrégats sont ensemble et forment des espaces inter-agrégats ; adapté de (Bergaya & Lagaly, 2006) et (Galan, 1996).

### 3.1.2. Classification

La classification des argiles adoptée par le "Nomenclature Committee of International Association for the Study of Clays (AIPEA) » repose sur plusieurs points (Jlassi et al., 2018) :

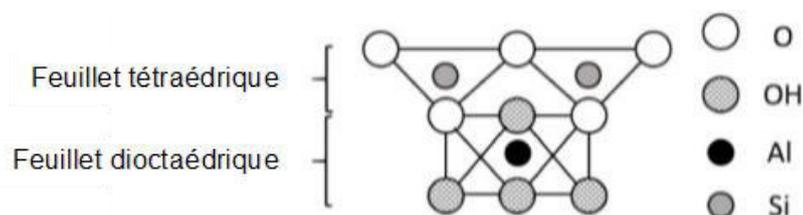
- la combinaison des feuillets qui forment les couches : les feuillets octaédriques (O) et tétraédriques (T) sont assemblés selon un modèle 1 :1 ; 2 ;1 ou 2 :1 :1 (TO, TOT ou TOT + autre couche)

- le type de cation composant le feuillet O, formant ainsi un feuillet trioctaédrique ( $Mg^{2+}$ ) ou dioctaédrique ( $Al^{3+}$ )
- la nature des cations présents dans l'espace inter-couche
- le type de composé dans l'espace intercouche (cation, molécule d'eau ...).

Cette classification permet donc de définir 3 familles d'argiles en fonction de la constitution de leurs couches : les argiles 1 :1, les argiles 2 :1 et les argiles 2 :1 :1 ; les argiles intercalées correspondent quant à elles à l'empilement aléatoire ou ordonné d'au moins deux types d'argiles. Une quatrième famille d'argiles fibreuses avec une structure cristalline particulière en rubans est aussi décrite.

### 3.1.2.1. Argiles 1 :1

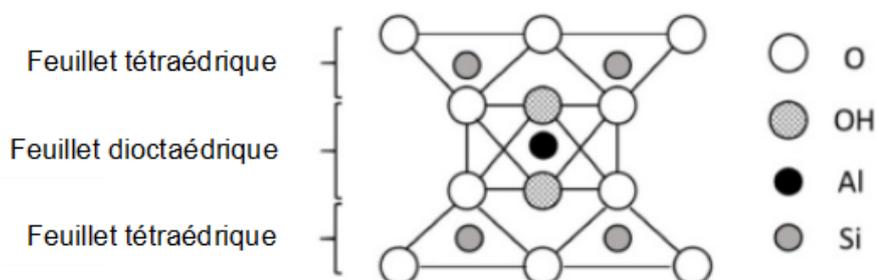
Les couches de ces argiles sont composées par une simple couche tétraédrique  $SiO_4^{4-}$  et une couche octaédrique : la nature de l'ion métallique va définir deux groupes d'argiles. Le groupe des kaolins qui présente un feuillet dioctaédrique avec la présence de l'ion  $Al^{3+}$  possède une composition générale résumée par la formule  $Al_2Si_2O_5(OH)_4$  (Brigatti et al., 2006; Galan, 1996). Ce groupe est constitué par la kaolinite, la dickite, la nacrite, l'halloysite et l'hisingerite (Brigatti et al., 2006). Lorsque le feuillet est trioctaédrique avec la présence de l'ion  $Mg^{2+}$ , il s'agit du groupe des serpentines avec une composition générale  $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$ . Les argiles riches en magnésium sont la lizardite, l'antigorite et la chrysotile. Dans ces deux groupes d'argiles 1 :1 la distance intercouche (qui comprend la couche ainsi que l'espace entre deux couches) est de 7 Å et les couches sont électriquement neutres (Claverie et al., 2019; Nadziakiewicz et al., 2019). L'ensemble du réseau est stabilisé par des liaisons hydrogènes entre les couches (Jlassi et al., 2018) ce qui empêche toute expansion entre les couches (Gitari & Mudzielwana, 2018). L'espace inter-particules est quant à lui pauvre en cation ce qui limite les propriétés d'adsorption des argiles à leur surface (Nadziakiewicz et al., 2019). Les particules se retrouvent sous forme de plaquettes dures et larges de quelques centaines de nm et épaisses de quelques dizaines de nm (Jlassi et al., 2018). Le représentant majeur de cette famille d'argile est la kaolinite (**Figure 38**) (Claverie et al., 2019).



**Figure 38** : Structure des couches de la kaolinite de la famille des argiles 1:1 (Nadziakiewicz et al., 2019).

### 3.1.2.2. Argiles 2 :1

Toutes les argiles de cette famille ont des couches constituées par un feuillet octaédrique compris entre deux feuillets tétraédriques (**Figure 39**). Quatre types d'argiles 2 :1 sont décrites, en fonction des propriétés intrinsèques des feuillets, de la charge des couches et de la présence d'ions dans l'espace inter-couches.



**Figure 39** : Structure des couches des argiles 2 :1 lorsque le feuillet central est dioctaédrique (Nadziakiewicz et al., 2019).

Les argiles 2 :1 électriquement neutres sont la pyrophyllite ( $\text{Al}_2\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ ) lorsque le feuillet est dioctaédrique et le talc lorsque le feuillet est trioctaédrique (Brigatti et al., 2006). Pour ces minéraux, aucun cation n'est présent dans l'espace inter-couche et la cohésion est assurée par des interactions de type van der Waals. Leur faible teneur en humidité et leur inertie chimique font de ces composés de bons absorbants (Nadziakiewicz et al., 2019).

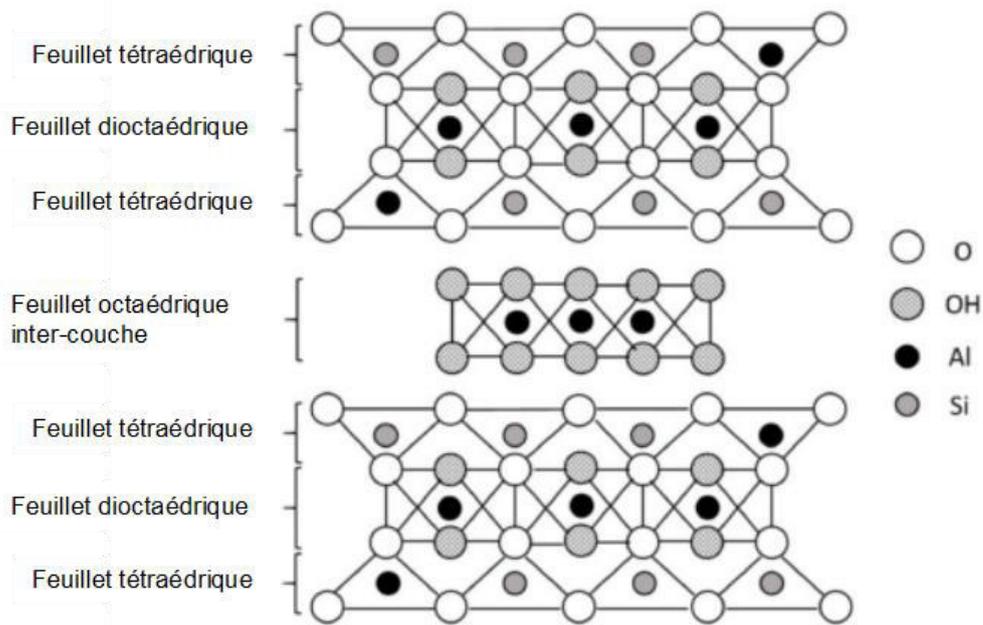
Toutes les autres argiles avec des couches 2 :1 présentent une charge totale négative au niveau de leurs couches. Les smectites sont le chef de file de cette famille d'argile : la montmorillonite, la beidellite, la nontronite et la volkonskoïte avec une formule générale  $(\text{OH})_4\text{Si}_8\text{Al}_4\text{O}_{20} \cdot \text{NH}_2\text{O}$  présentent un feuillet dioctaédrique. A l'inverse l'hectorite, la saponite et la saconite possèdent un feuillet trioctaédrique à base de  $\text{Mg}^{2+}$  (Brigatti et al., 2006; Galan, 1996). Les smectites sont très utilisées en raison de leur grande réactivité : des substitutions isomorphiques sont possibles au sein des feuillets pour remplacer le  $\text{Si}^{4+}$  de la couche tétraédrique par  $\text{Al}^{3+}$ , et le  $\text{Al}^{3+}$  de la couche octaédrique par  $\text{Fe}^{2+}$ . De plus la présence permanente de charges négatives à la surface des feuillets conditionne la présence de nombreux cations échangeables dans l'espace inter-couche :  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{H}^+$  (Brigatti et al., 2006; Gitari & Mudzielwana, 2018). Ces cations sont majoritairement hydratés car des molécules d'eau sont présentes dans cet espace (Jlassi et al., 2018). Lorsque les feuillets sont « fermés » la distance intercouche est de 10 Å mais la présence des cations peut entraîner un phénomène d'expansion.

A l'inverse les vermiculites possèdent des cations inter-couches avec de forts liens qui limitent l'expansion de l'argile (Nadziakiewicz et al., 2019).

Enfin l'illite a la même structure que la montmorillonite mais les couches sont liées entre elles par des cations  $K^+$  non hydratés. Il en est de même pour les micas qui contiennent des cations  $Na^+$  ou  $Ca^{2+}$ .

### 3.1.2.3. Argiles 2 : 1 : 1

Cette famille d'argile a une structure de base 2 : 1 où l'espace inter-couche est occupé par un feuillet intermédiaire octaédrique de type brucite (présence  $Mg^{2+}$  ou  $Fe^{2+}$ ) ou gibbsite ( $Al^{3+}$ ) (Nadziakiewicz et al., 2019) (**Figure 40**). Les chlorites qui représentent cette famille possèdent une distance intercouche de 14 Å et sont non expansives (Claverie et al., 2019).



**Figure 40 :** Structure des couches des argiles 2 : 1 : 1 avec un feuillet inter-couche gibbsite (Nadziakiewicz et al., 2019).

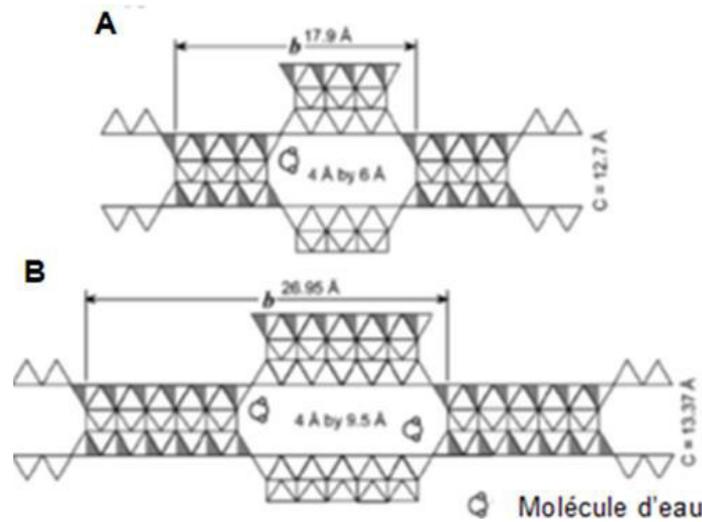
### 3.1.2.4. Argiles intercalées

Cette famille est très hétérogène car il y a une grande diversité dans la nature des couches associées (Claverie et al., 2019). Les compositions les plus souvent observées sont illite-smectite et mica-chlorite.

### 3.1.2.5. Argiles fibreuses

La sépiolite et la palygorskite (ou attapulgite) diffèrent des autres silicates car elles ne présentent pas des feuillets octaédriques continus (Galan, 1996). Ces alumino-silicates présentent tout de même une structure cristalline 2 : 1 mais sous forme de rubans qui sont reliés entre eux par inversion des tétraèdres  $SiO_4^{4-}$  le long d'une série de liens Si-O-Si. Le feuillet octaédrique est donc discontinu à chaque inversion du feuillet tétraédrique ce qui donne aux argiles un aspect fibreux avec des canaux parallèles à la longueur des fibres. L'expansion latérale est limitée donc les feuillets sont transformés en bandes rectangles dont la longueur

est caractéristique des deux groupes d'argile (Jlassi et al., 2018) (**Figure 41**). Les canaux contiennent de nombreuses impuretés tel que du quartz ou des molécules d'eau qui permettent la formation d'une zéolithe.



**Figure 41** : Structure en ruban des argiles fibreuses et taille des canaux **A** = palygorskite ; **B** = sépiolite (Galan, 1996).

Les 3 familles d'argiles classiques présentées possèdent des caractéristiques comparables (**Tableau 11**) qui vont être responsables de leurs propriétés et de leurs usages.

Composition des couches	Structure du feuillet octaédrique		Distance inter-couche	Charge électrique des couches	Représentation de la structure générale
	Diocatédre	Trioctatédre			
1 :1	<b>Kaolins</b> Kaolinite, dickite, nacrite, halloysite, hisingerite	<b>Serpentines</b> Lizardite, antigorite, chrysotile	7 Å	Neutre	
2:1	<b>Pyrophyllite</b>	<b>Talc</b>	10 Å	Neutre	
	<b>Smectites</b> Montmorillonite, beidellite, nontronite, volkonskoïte	<b>Smectites</b> Hectorite, saponite, saconite		Négative	
	<b>Vermiculites</b>	<b>Vermiculites</b>			
	<b>Illites</b>				
2:1:1	<b>Micas</b>	<b>Micas</b>	14 Å	Variable	
	<b>Chlorites</b>	<b>Chlorites</b>			

**Tableau 11** : Résumé des principales familles de silicates et de leurs caractéristiques ; adapté de (Brigatti et al., 2006) et (Jlassi et al., 2018).

### 3.1.3. Propriétés

Les propriétés des phyllosilicates découlent de leur structure cristalline unique : les charges de surface et la grande surface spécifique sont responsables des phénomènes de sorption tandis que la capacité d'échange des cations (CEC) situés dans l'espace inter-couche favorise les phénomènes d'hydratation et de gonflement des argiles, influant sur leur plasticité et donc sur leur rhéologie (Jlassi et al., 2018).

#### 3.1.3.1. Phénomènes de sorption

La surface spécifique d'une argile est définie par le rapport de sa surface sur sa masse, et elle s'exprime en  $m^2/g$  (Jlassi et al., 2018). Les phyllosilicates possèdent des feuillets poreux et un espace entre les couches qui constituent les particules (Nadziakiewicz et al., 2019) : ces surfaces externes entre les particules et internes entre les couches participent à la surface spécifique des argiles (**Tableau 12**).

Clay	Internal Surface ( $m^2/g$ )	External Surface ( $m^2/g$ )	Total Surface ( $m^2/g$ )
Kaolinite	0	10–30	10–30
Illite	20–55	80–120	100–175
Smectites	600–700	80	700–800
Vermiculite	700	40–70	760
Chlorite	–	100–175	100–175

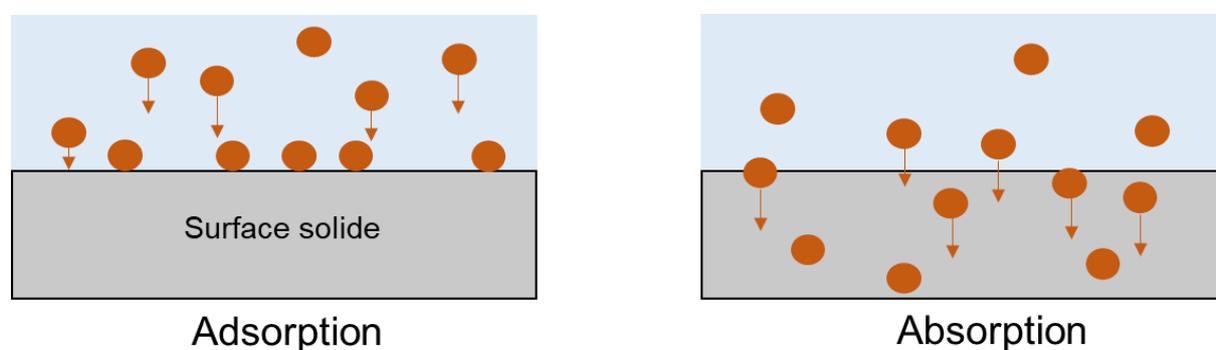
**Tableau 12 :** Participation de la surface interne et de la surface externe des particules d'argile à la surface spécifique (Jlassi et al., 2018).

Cette surface spécifique est directement responsable des propriétés de sorption des argiles (Galan, 1996). L'**absorption** est liée à la pénétration de molécules solides dans un solide absorbant, ce qui implique un contact entre les deux. Le solide doit être poreux et perméable mais il doit aussi posséder une grande surface spécifique pour avoir de fortes capacités de sorption. Ce phénomène d'absorption est dépendant des propriétés du liquide, telles que sa densité, sa viscosité ou sa tension de surface (**Figure 42**). L'**adsorption** repose quant à elle sur l'interaction des molécules de liquide avec la surface solide grâce à des forces attractives faibles et peu spécifiques. Elle est influencée par la taille, la forme et la polarité des particules liquides impliquées : en effet si les molécules sont trop grosses ou avec une faible polarité, l'adsorption se fera uniquement par les surfaces externes de l'argile car le passage dans les couches ou les canaux ne sera pas possible. L'adsorption se fait jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint ou que l'adsorbat soit saturé (Ngulube et al., 2017). Elle peut être d'origine physique avec des interactions moléculaires faibles de type van der Waals / interactions hydrophobes, ou chimique par l'échange d'électrons.

Il est possible de quantifier l'adsorption d'un liquide sur un solide poreux, notamment une argile, à l'aide d'isothermes d'adsorption (Feng et al., 2018). Cette méthode détermine la

concentration adsorbée dans une solution en équilibre avec l'interface de l'adsorbant (Ngulube et al., 2017). L'isotherme de Langmuir décrit une adsorption monocouche où l'adsorption d'une molécule sur un site particulier ne dépend pas de l'occupation du site d'adsorption voisin. L'isotherme de Freundlich est caractéristique de l'adsorption sur des surfaces hétérogènes. Ce phénomène peut être réversible ou non : par exemple l'adsorption de césium  $Cs^+$  par une argile est réversible sur les surface planes de cette dernière, alors qu'elle est irréversible dans l'espace inter-couche (Park et al., 2019). En effet, les phyllosilicates présentent une surface basale plane avec des charges négatives permanentes dues aux substitutions isomorphiques dans les feuillets, et des surfaces latérales couvertes par des sites dont les charges dépendent notamment du pH (Macht et al., 2011). De plus, des informations spécifiques sur les pores d'une argile, telles que la distribution de la taille apparente, le volume ou l'aire spécifique, peuvent être obtenues par la méthode de la sorption de  $N_2$  (Feng et al., 2018). Il est ainsi possible de quantifier le volume de gaz adsorbé dans les mésopores (pores de 2-50 nm entre les particules d'argile, produits par les arrangements microstructuraux des particules) et micropores (espaces inter-particulaires  $<2nm$  dans les régions cristallines et sur le bord des argiles) (Macht et al., 2011).

Le phénomène d'adsorption sur une argile peut aussi être mesuré à l'aide d'autres méthodes : microscope à force atomique, spectroscopie RMN (Park et al., 2019), adsorption étendue des rayons X pour les fines structures (analyse de la géométrie des structures des atomes cibles).



**Figure 42:** Comparaison des phénomènes d'adsorption et d'absorption de particules en suspension à la surface d'un solide. L'adsorption se caractérise par une rétention uniquement à la surface du solide tandis que l'absorption entraîne le passage des particules dans le solide.

### 3.1.3.2. Capacité d'échange des cations

D'un point de vue théorique, la capacité d'échange des cations (CEC) correspond à la quantité de charges élémentaires portées par les cations situés dans l'espace inter-couche, qui peuvent être échangées pour équilibrer la charge électrique de 100 grammes d'argile calcinée. Cette valeur s'exprime donc en milliéquivalents/100g d'argile calcinée et ne varie pas avec le degré d'hydratation (Jlassi et al., 2018). Le nombre de feuillets composant les couches de

l'argile, les cations présents dans les feuillets ainsi que le pH sont des éléments déterminants de sa valeur (Claverie et al., 2019; Nadziakiewicz et al., 2019). La CEC peut fortement varier en fonction de la famille d'argile considérée (**Tableau 13**).

Clay	CEC (meq/100 g of Calcined Clay)
Kaolinite	5–15
Illite	10–40
Smectites	80–150
Vermiculite	100–150
Chlorite	10–40

**Tableau 13** : Comparaison de la capacité d'échange des cations de différentes argiles (Jlassi et al., 2018).

### 3.1.3.3. Gonflement des argiles

Les propriétés de gonflement des argiles sont généralement attribuées aux smectites qui ont la capacité d'adsorber une grande quantité d'eau grâce à leur grande surface spécifique et à la flexibilité de leurs feuillets (Jlassi et al., 2018). Le gonflement correspond à l'augmentation de la distance entre les feuillets au sein de chaque particule puis à l'augmentation de la distance entre les particules (Salles et al., 2010). L'expansion des distances intra-couches et inter-particulaires est due aux forces d'attraction entre l'eau et les cations ou la surface des feuillets. La cinétique de gonflement est un phénomène qui se déroule en 3 étapes : lors du contact initial entre l'eau et l'argile les molécules d'eau vont passer dans l'espace inter-couche et hydrater les cations qui s'y trouvent. Dans un même temps des molécules d'eau vont être adsorbées sur les surfaces des feuillets pour former progressivement 3 pseudo couches d'eau et augmenter la distance inter-couche. La seconde étape correspond à la formation d'une pâte d'argile lorsque les particules sont hydratées : des molécules d'eau sont attirées par l'eau déjà adsorbée à la surface du solide et les particules se maintiennent ensemble par des ponts d'eau à leur point de contact. Enfin, la transformation de ce gel rigide en gel souple marque la fin du gonflement des argiles (Jlassi et al., 2018; López-Lilao et al., 2017).

Pour les smectites qui présentent une distance inter-couche de 10 Å, l'augmentation de cette distance est proportionnelle au nombre de couches d'eau qui s'adsorbent dans l'espace inter-couche : elle passe à 12,6 Å pour une adsorption monocouche à 19 Å pour une triple couche (Jlassi et al., 2018). La bentonite peut adsorber de grandes quantités d'eau et ainsi augmenter son volume de 12 à 15 fois (Nadziakiewicz et al., 2019). Ces capacités de gonflement sont en lien avec les caractéristiques structurales des argiles : composition des couches, nature des cations interchangeables et densité de l'argile (Chemeda et al., 2014; Pusch, 2006, p. 6).

Les argiles fibreuses ne gonflent pas en présence d'eau : la longueur des fibres et le nombre de groupement silanols à la surface des couches jouent un rôle dans l'agrégation des fibres entre elles et la formation d'un réseau qui capture l'eau et augmente la viscosité (Chemeda et

al., 2014). Pour les mélanges d'argiles, tels que bentonite-palygorskite ou bentonite-sépiolite, les propriétés dépendent majoritairement de la proportion en argile gonflante et de la charge de ses couches.

#### 3.1.3.4. Interactions

Les argiles sont biocompatibles et peuvent interagir avec des composés de nature très variable. L'intégration d'argiles dans des polymères permet d'augmenter les propriétés mécaniques et de dégradation du polymère de base. En effet, les silanols chargés négativement à la surface externe de l'argile font des interactions électrostatiques avec les groupes cationiques de polymères qui s'intercalent entre les couches de l'argile .

Le contrôle de la libération de biomolécules peut être réalisé par l'utilisation d'argiles. Ces éléments vont interagir via l'intercalation des biomolécules dans l'espace inter-couche de l'argile par échange de cations, l'adsorption par interaction électrostatique et la liaison des biomolécules (Mousa et al., 2018).

Lors d'une mise en contact de l'argile avec des cultures cellulaires, ces dernières ont montré une assimilation de l'argile, dépendante de la taille, de la forme et de la charge des particules. Par exemple, pour des particules de 25-30 nm, un phénomène d'endocytose est observé (Mousa et al., 2018).

#### 3.1.3.5. Modification des argiles

Les argiles sont des produits bruts dont les propriétés précédemment présentées peuvent être modifiées par l'Homme. Les capacités d'adsorption des argiles peuvent être améliorées par l'ajout de surfactants organiques cationiques ou la modification par intercalation de cations dans l'espace inter-couche. La méthode la plus utilisée est la pillarisation qui transforme le phyllosilicate en matériel microporeux et mésoporeux ce qui augmente la surface spécifique sans changer la composition minéralogique de l'argile (Gitari & Mudzielwana, 2018).

La surface spécifique peut aussi être augmentée par chauffage de l'argile pour entraîner la perte des molécules d'eau associées. Cette méthode doit tout de même être réalisée sous contrôle car un chauffage trop important peut détruire les micropores et le réseau formant la structure de l'argile (Galan, 1996).

Le paramètre le plus critique à modifier pour faire varier le pouvoir adsorbant des argiles est le pH car il joue sur le degré d'ionisation des couches et des cations inter-couches régulant ainsi les interactions (Uddin, 2017).

#### 3.1.4. Utilisation

Les différentes utilisations des argiles reposent sur leurs caractéristiques structurales et chimiques, et donc sur leurs propriétés.

#### 3.1.4.1. Détoxification

Les sols ont une composition géologique complexe, comprenant notamment des argiles. Lors de l'utilisation de pesticides sur des cultures ou dans des jardins, ces derniers vont diffuser dans le sol et être adsorbés par les argiles (van Beinum et al., 2005). Ce phénomène de sorption est dépendant du temps et va parfois être irréversible car le produit induit des changements structuraux de l'argile. L'adsorption est meilleure sur des systèmes dispersés par rapport à des agrégats et elle est favorisée dans les sols humides (Villaverde et al., 2009). Cette constatation a permis d'envisager l'utilisation d'argiles pour la détoxification de milieux aqueux.

De nombreux polluants sont retrouvés dans les eaux usées : la ciprofloxacine est un antibiotique induisant des résistances bactériennes et détruisant des micro-organismes, tandis que l'amitriptyline est un antidépresseur fortement consommé au Royaume-Uni (Chang et al., 2016; Tsai et al., 2016). Malgré sa structure en ruban qui empêche son expansion et restreint l'entrée de gros cations organiques dans les canaux, la palygorskite est utilisée pour décontaminer l'eau. La quantité adsorbée de ces deux composés est dépendante du pH de la solution car il va avoir un effet sur la charge ionique de la molécule. Les propriétés d'adsorption des argiles peuvent aussi être mises à profit pour purifier les eaux contenant des métaux lourds ou des radionucléides (Claverie et al., 2019). En effet les méthodes pour le traitement des eaux sont peu efficaces si la concentration en contaminant est faible donc la méthode de l'adsorption avec les argiles est utilisée en raison de son faible cout et de la grande disponibilité des argiles (Uddin, 2017). La détoxification avec de la palygorskite a démontré une adsorption des ions métalliques  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cr^{4+}$  et  $Cu^{2+}$  monocouche selon un isotherme de Langmuir (Potgieter et al., 2006).

La détoxification peut aussi être *in vivo* par l'administration orale d'argile dans le cadre d'un empoisonnement par les pesticides, notamment au paraquat (Gawarammana & Buckley, 2011). Le produit sera donc adsorbé sur l'argile pour empêcher son passage en systémique et éliminé par voie naturelle puisque les argiles ne sont pas digérées. Les phyllosilicates sont aussi utilisés comme ingrédients actifs au sein du tractus gastro-intestinal en tant qu'antiacides (adsorption de l'excès de  $H^+$ ), protecteurs gastro-intestinaux (lors d'un ulcère l'activité mucolytique des enzymes envers les muqueuses augmente ce qui entraîne des irritations et des sécrétions gastriques) et anti diarrhéiques (forte capacité de sorption des argiles qui va diminuer la teneur en liquide des selles) (Carretero & Pozo, 2010). De plus, les argiles ont la capacité de lier les mycotoxines ce qui explique l'enrichissement de certains aliments pour les animaux (Nadziakiewicz et al., 2019). Il faut tout de même prendre en compte que ce type de procédé diminue la valeur nutritive des aliments et de certains nutriments, tels que les vitamines, ce qui peut causer un déséquilibre nutritionnel.

#### 3.1.4.2. Agent de texture

Les argiles sont utilisées pour augmenter la stabilité et la viscosité de suspensions grâce à leurs propriétés rhéologiques : elles vont participer à la formation d'une structure « gélifiée » lorsqu'elles sont ajoutées en faible quantité dans un milieu liquide (Chemedda et al., 2014). Cette propriété est mise à profit par l'utilisation de smectites et de palygorskite dans les industries de forage ou pharmaceutiques.

#### 3.1.4.3. Dermatologie et cosmétique

Le soin par les boues médicinales, autrement appelé pélothérapie, est pratiqué depuis l'antiquité pour traiter toutes sortes de troubles : rhumatologiques, sécrétoire, inflammatoires et cutanés (Carretero, 2020). De plus les argiles ont une utilisation médicinale et dermocosmétique depuis la préhistoire (Moraes et al., 2017) et depuis le XVII<sup>ème</sup> siècle la terre de foulon est couramment utilisée au Royaume-Uni comme composé pharmaceutique et cosmétique (Beneke et al., 2002). Les argiles mélangées à de l'eau favorisent la cicatrisation cutanée et exercent une action antiseptique (Dário et al., 2014). L'effet antibactérien est direct via des interactions de surface ou indirect en interférant avec les propriétés physico-chimiques d'un environnement particulier. Ces deux effets pharmacologiques ont été décrit par Dário et al., 2014, sur des rats wistar ayant subi une brûlure au troisième degré : lorsqu'elle est comparée avec les contrôles, l'application quotidienne d'une suspension d'argile a permis d'accélérer la cinétique de cicatrisation tout en évitant une prolifération microbienne. Les phyllosilicates sont donc utilisés comme protecteurs en dermatologie car ils protègent la peau contre les agents extérieurs et contre les exsudats et les excréments de liquide (Carretero & Pozo, 2010).

Actuellement les alumino-silicates sont utilisés dans l'industrie cosmétique en tant qu'abrasifs, antiagglomérants, agents gonflants et agents opacifiants (Elmore, 2003). Pour ce domaine les argiles présentent de nombreux avantages : douceur, fine granulométrie, pH proche de la peau, bon effet exfoliant, humidifiant, propriétés adsorbantes pour le retrait des impuretés et du sébum (Pan-On et al., 2018). Bien que des techniques précises de préparation et de purification doivent être décrites avant leur usage, de nombreuses et diverses formulations cosmétiques contiennent ces composés (Carretero & Pozo, 2010; Elmore, 2003; Moraes et al., 2017) (**Tableau 14**).

Argile/Formule/Type de couche	Nomenclature pharmaceutique	Application
Kaolin/Si <sub>2</sub> Al <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (OH) <sub>4</sub> /1 :1	Kaolin	Crèmes dermocosmétiques, masques pour le visage, poudres, émulsions, produits de maquillage
Talc/Mg <sub>3</sub> Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> /2 :1	Talc	Produits de maquillage, déodorants, savons, poudres pour bébé
Smectite/(Al <sub>1,67</sub> Mg <sub>0,33</sub> )Si <sub>4</sub> O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> M <sup>+</sup> <sub>0,33</sub> /2 :1	Bentonite	Emulsions, poudres de maquillage, protection solaire
Illite/KAl <sub>2</sub> (Si <sub>3</sub> Al)O <sub>10</sub> (OH) <sub>2</sub> /2 :1	Mica	Ombre à paupières, produits de maquillage, rouge à lèvres
Palygorskite/(Mg,Al,Fe <sup>3+</sup> ) <sub>5</sub> (Si,Al) <sub>8</sub> O <sub>20</sub> (OH) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O/2:1	Attapulgit	Masques pour le visage, émulsions, poudres et crèmes dermocosmétiques

**Tableau 14 :** Principales utilisations des aluminosilicates en cosmétique et dermocosmétique (Moraes et al., 2017).

### 3.2 Méthodes innovantes de décontamination cutanée

La terre de foulon est un phyllosilicate utilisé sous forme de poudre comme décontaminant universel contre les chimiques de guerre (Cf partie 2.2.2.1). Cette poudre chimiquement inactive, peu chère et facile à conserver exerce son activité par l'adsorption des contaminants liquides. Généralement elle est utilisée comme décontamination d'urgence sur le terrain opérationnel avant de pouvoir réaliser une décontamination humide à l'eau (Dachir et al., 2020). Lors de son évaluation *in vivo* sur des cochons pour décontaminer du VX ou de l'ypérite, l'efficacité de décontamination déterminée est semblable à celle de la RSDL qui inactive les contaminants. La terre de foulon présente l'avantage de retirer rapidement et quasi complètement l'agent chimique même lorsqu'il est présent à la surface de la peau et ce de façon non spécifique. Son utilisation facile par simple application et son absence de réactivité chimique permettent un usage sur la peau. Cette méthode de décontamination ne détoxifie pas réellement le toxique puisqu'elle n'a aucun pouvoir neutralisant. De plus, la poudre doit être précautionneusement collectée après son usage pour éviter que les particules fines avec le toxique adsorbé restent adhérentes à la peau ou se répandent dans l'air et contaminent de nouveaux individus par inhalation (Dachir et al., 2020; Poirier et al., 2017).

Il est donc nécessaire de développer de nouveaux agents décontaminants pour une application cutanée, basés sur différents éléments clés : la décomposition du toxique, l'efficacité de décontamination et/ou la protection (Kim et al., 2011).

### 3.2.1. Décontaminants à base de terre de foulon

Afin d'évaluer un nouveau système de décontamination la forme galénique de la terre de foulon a été modifiée pour passer de la forme poudre à une suspension aqueuse (Roul et al., 2017). La capacité d'adsorption de la terre a d'abord été évaluée sur des solutions aqueuses de 4-cyanophénol avant de déterminer l'efficacité de décontamination *ex vivo* d'une suspension aqueuse de 10g de poudre dispersés dans 100 mL d'eau sur de la peau d'oreille de cochon pour décontaminer le 4-cyanophénol. Lors de la comparaison avec une décontamination avec de la poudre libre ou de l'eau, la suspension aqueuse de terre de foulon a démontré la meilleure efficacité (88,1 % d'efficacité de décontamination contre 71% pour la terre sous forme de poudre et 53,6% pour l'eau) (**Tableau 15**).

Porcine explant	Method I	Method II	Method III	Method IV	Method V
					
Decontaminant	FE dry, free powder	FE loaded on adhesive strip	FE loaded on palmar face of single use wash glove	FE (10 g) soaked in 100 ml of purified water as suspension	Demineralized water press with pipette Pasteur (3 ml)
Depot of FE	0.15 g cm <sup>-2</sup> Possible occlusion	0.03 g cm <sup>-2</sup>	0.02 g cm <sup>-2</sup>	0.65 g cm <sup>-2</sup>	-
Method of decontamination	Full coverage of area with free powder	Full coverage of area with adhesive strip applied with finger pressure	Full coverage of area with palmar face glove	Full coverage of area with the suspension	Showering with a direct water stream (23 ml cm <sup>-2</sup> min <sup>-1</sup> )
Time	1 min	15 s	30 s	1 min	15 s
DE (%)	71.0 ± 20.3	72.0 ± 14.3	60.8 ± 22.1	88.1 ± 8.3	53.6 ± 10.2

DE, decontamination efficiency (mean ± SD, n = 30); FE, fuller's earth.

**Tableau 15 :** Evaluation de différentes méthodes de décontamination du 4-cyanophénol sur de la peau de cochon (Roul et al., 2017).

Un gel de décontamination cutanée (Dermal Decontamination Gel DDGel) à base de phyllosilicates a été développé et breveté par Cao, Elmahdy, et al., 2018 (brevet WO 2017/053594 A1). Cette formulation est à base de Kollidon SR (3g), lutrol (1g), carboxymethyl cellulose (0,3), terre de foulon (2,5g), bentonite (0,5g), eau (2mL) et éthanol (10mL). Une des propriétés majeures de ce gel est la formation d'un film après séchage, ce qui permet son retrait par arrachage. La détermination des coefficients de partage de plusieurs simulants des chimiques de guerre dans le SC et dans le DDGel a permis d'envisager le DDGel comme outil de décontamination cutanée. En effet, ce dernier exerce une affinité compétitive sur les simulants au niveau de leur liaison au SC ce qui permettrait une désorption des chimiques liés. Ce dispositif a été évalué *ex vivo* sur des cellules de diffusion avec de la peau humaine pour la décontamination du sulfure de chloroéthyle éthyle (2-CEES simulant de l'ypérite) et du méthylphosphonate de diisopropyle (DIMP, intermédiaire durant la synthèse du sarin utilisé comme simulant) (Cao, Elmahdy, et al., 2018; Cao, Hui, et al., 2018). Dans les deux cas, le

DDGel s'est montré plus efficace que la RSDL pour diminuer la quantité de contaminant qui pénètre dans la peau (**Tableau 16**). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que le DDGel retire une partie du toxique du SC et forme une liaison avec le contaminant à la surface de la peau ce qui empêche sa pénétration.

Procédure de décontamination	Quantité totale cumulée (moyenne ± écart type)	Facteur d'efficacité de décontamination
Contrôle sans décontamination	174,44 ± 89,64	1
DDGel	17,31 ± 9,45	10,1
RSDL	39,45 ± 21,78	4,4

**Tableau 16** : Efficacité de décontamination du DDGel et de la RSDL lors d'une contamination ex vivo de peau humaine avec du 2-CEES (Y. Cao, Hui, et al., 2018).

### 3.2.2. Décontaminants à base d'oxydes métalliques

Les oxydes métalliques sont des agents prometteurs pour la décontamination car ils possèdent une grande réactivité (Štengl et al., 2012). Les nanoparticules d'oxyde de métal possèdent en plus une grande surface ce qui augmente l'adsorption des chimiques de guerre et la quantité de sites réactifs disponibles (Salerno et al., 2017). Le principal mode d'action de ces particules est l'hydrolyse des molécules pour former des composés moins toxiques.

#### 3.2.2.1. Oxyde de zirconium

L'hydroxyde de zirconium est utilisé pour le retrait de différents composés chimiques car en plus de présenter une grande surface spécifique et une grande porosité, il réalise des réactions particulièrement fortes avec les gaz acides grâce à la présence de groupements OH terminaux basiques (Bandosz et al., 2012). Sa grande réactivité avec le VX induit une forte hydrolyse tandis qu'elle est plus modérée pour le soman qui a du mal à diffuser au sein de la surface hydrophile du  $Zr(OH)_4$ .

#### 3.2.2.2. Oxyde de cérium

Les nanoparticules de  $CeO_2$  sont des sorbants réactifs pour la dégradation des COP dans un solvant à température ambiante. La capacité de dégradation du paraoxon (POX) en solution aqueuse *in vitro* a été démontrée par Salerno et al., 2017. La maîtrise de la méthode de synthèse des nanoparticules est très importante car l'activité de dégradation dépend de la structure de ces particules (Trenque et al., 2020).

#### 3.2.2.3. Oxyde de titane

Štengl et al., 2012, a modifié les propriétés de particules de  $TiO_2$  en introduisant du germanium  $Ge^{4+}$  : des changements structuraux de la forme cristalline sont apparus en plus du changement de morphologie des particules et de l'augmentation de la surface spécifique et de

la porosité. L'évaluation de ces particules dopées pour convertir l'ypérite, le soman et le VX en composés non toxiques a été positive. De plus, pour le soman et le VX cette dégradation est améliorée par rapport à des particules de  $\text{TiO}_2$ .

#### 3.2.2.4. Oxyde de zinc

Les oxydes métalliques fonctionnalisés présentent une grande réactivité et une meilleure adsorption des chimiques de guerre grâce à la modification de leur morphologie et de leur surface spécifique (Kumar et al., 2013). L'oxyde de zinc ZnO possède une forte réactivité mais une faible surface ce qui réduit son pouvoir adsorbant : son couplage au CuO permet la formation d'un nanocomposite binaire. Lors de son évaluation sur de l'ypérite, il a été démontré que peu importe la proportion du mélange, la réactivité du nanocomposite est plus importante que celle des deux oxydes métalliques seuls (100% de dégradation de l'ypérite en 16h).

#### 3.2.2.5. Oxyde de zinc titane

Sharma et al., 2019, a développé et évalué des lingettes de décontamination à base de  $\text{ZnTiO}_3$  et Ag pour la décontamination chimique et biologique. Il s'agit d'un composé multicouche évalué *in vivo* sur des rats contaminés par des simulants de chimiques de guerre : le 2-CEES pour l'ypérite et le chlorophosphate de diéthyle (DCP) pour les agents nerveux. La décontamination par les lingettes après 45 minutes d'exposition a mis en évidence une diminution des effets cutanés induits par le 2-CEES, et une absence de modification du niveau sanguin d'ACHé pour l'exposition au DCP. Le  $\text{ZnTiO}_3$  possède une forte sélectivité pour les molécules lipophiles et sa forme nano offre une grande surface spécifique qui favorise la décontamination par adsorption.

### 3.2.3. Décontamination des peaux lésées

La peau est une barrière physique pour la pénétration d'éléments étrangers et l'apparition d'une plaie cutanée induit l'accès direct à la circulation systémique et aux organes. Dans le cadre d'une contamination chimique il est donc nécessaire de retirer le contaminant de la plaie ou de diminuer son temps de résidence (Mannis & Brandl, 2015). La recommandation actuelle pour la décontamination des plaies est l'utilisation abondante de solution saline physiologique bien que cette approche ne soit pas optimale.

L'aloé vera est une plante qui présente des propriétés cicatrisantes ; elle est utilisée pour la cicatrisation des plaies mécaniques et par brûlure chez les animaux. Son application topique pourrait être bénéfique pour la protection des plaies cutanées dues à l'ypérite. Une formulation à base d'aloé vera, de bétaine (dérivé de la choline impliqué dans la production du glutathion pour la régulation de la réponse inflammatoire) et de N,N'-dichloro-bis[2,4,6-trichlorophenyl]urée (décontaminant de l'ypérite) a été développée par Lomash & Pant en 2014. Son application sur des souris contaminées a démontré une efficacité de

décontamination ainsi qu'une prolifération des fibroblastes, une épithélialisation et une synthèse de collagène en faveur d'une cicatrisation.

Sur le champ de bataille le risque de traumatisme associé à un saignement est très présent. Des traitements hémostatiques sont donc développés tel que le WoundStat™ qui est une smectite granuleuse qui réduit les hémorragies et augmente la survie immédiate de souris sévèrement lésées (Gerlach et al., 2010). L'hémostase a lieu grâce à ses propriétés super-adsorbantes qui permettent la concentration des facteurs de la coagulation et des plaquettes, et aux charges négatives qui activent la cascade de coagulation pour aider à la formation du thrombus. Une fois que l'hémorragie est stoppée il est nécessaire de retirer tout l'agent de la plaie pour éviter une inflammation locale. Dalton et al., 2015, ont évalué ce produit pour la décontamination cutanée afin de proposer un produit dual, à la fois hémostatique et décontaminant. La décontamination *ex vivo* du soman sur de la peau de cochon a démontré des résultats significatifs lorsque la poudre est appliquée 30 secondes après la contamination. La même méthodologie a été employée par H. L. Lydon et al., 2017, pour la décontamination de peaux de cochon endommagées par retrait de 100 µm d'épiderme à l'aide d'un dermatome. Le WoundStat™ s'est montré autant efficace que la terre de foulon pour la décontamination de l'ypérite, du soman et du VX. Afin de poursuivre l'étude de ce candidat pour la décontamination de plaies cutanées, des tests *in vivo* ont été réalisés sur des cochons (Lydon et al., 2018). Le retrait de 100 µm d'épiderme a permis de réaliser une plaie superficielle avec un léger saignement local. Après 30 secondes d'exposition au VX à une dose de 5DL<sub>50</sub> les animaux ont été décontaminés avec 2g de produit : la décontamination augmente le taux et la durée de survie. Bien que l'application du WoundStat™ n'ait pas d'effet sur la diminution de l'activité de l'ACHé, une diminution significative de la quantité de VX au site d'exposition, dans la circulation sanguine et au niveau des organes cibles est observée.

### 3.2.4. Autres systèmes de décontamination

#### 3.2.4.1. Méthode enzymatique

L'hydrolyse des chimiques de guerre peut être réalisée par des enzymes : la diisopropyl fluorophosphatase (DFPase) issue du calamar présente une forte réactivité envers les COP (Stehle et al., 2014). L'intégration de cette enzyme au sein d'une microémulsion de Lanol 99 (phase huileuse) et Simulsol SL55 (surfactant amphiphile) lui permet de conserver son activité puisque le suivi par spectroscopie RMN de la dégradation du sarin par la formulation montre une réaction quasi complète en 50 minutes. Ces données permettent d'envisager ce type de système comme bon prototype pour la décontamination cutanée.

#### 3.2.4.2. Utilisation des cyclodextrines

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques formés par des unités glucose liées entre elles (Cabal et al., 2004). Elles présentent une cavité centrale hydrophobe entourée par

un anneau hydrophile formé par les groupements hydroxyles. Les  $\beta$ -cyclodextrines ont montré des résultats positifs pour la décontamination de rats exposés au soman. Leur capacité à emprisonner le contaminant pour permettre son hydrolyse fait d'elles des composés prometteurs qui pourraient être utilisés pour la décontamination de la peau, des muqueuses et des plaies (Poirier et al., 2017).

### 3.2.4.3. Modification de la galénique

Les émulsions « pickering » sont des émulsions solides stabilisées où l'émulsifiant classique a été remplacé par des particules solides absorbées à la surface de gouttes d'huile pour stabiliser l'interface huile/eau (Salerno et al., 2016). Ces émulsions sont donc sans surfactant ce qui permet une limitation de l'augmentation indésirable de la pénétration cutanée associée. Dans le cadre de la décontamination, ce système permet la solubilisation du contaminant dans l'émulsion et son adsorption sur les particules stabilisantes tandis que les gouttes devraient permettre une meilleure répartition de l'émulsion à la surface de la peau.

Un gel de chitosan fonctionnalisé avec le nucléophile pyridine-2-aldoxime est proposé comme candidat prophylactique pour la désactivation des COP sur la peau avant leur entrée dans le corps (Thorat et al., 2018). L'évaluation *in vitro* de l'hydrolyse d'un OPP puis la mesure de la pénétration *ex vivo* sur cellules de Franz et *in vivo* sur des rats a permis d'envisager l'usage de ce dispositif en préventif de la contamination aux COP. En effet, les rats qui ont le dos enduit de gel avant leur contamination n'ont pas de modification de leur taux d'AChE et ont une diminution des signes cliniques moteurs et neuromusculaires en comparaison avec les rats non traités.

Cette partie bibliographique met en lumière l'utilisation militaire et civile des COP et les risques qui découlent de leur usage. Après un contact cutané, la pénétration du produit par absorption peut mener à l'apparition d'un toxidrome qui doit être médicalement pris en charge au plus tôt afin de limiter les effets au long terme. En parallèle, différentes méthodes de décontamination cutanée sont utilisées, suivant qu'une décontamination de masse soit nécessaire ou non. Dans le cadre de la décontamination individuelle, la décontamination sèche est opposée à la décontamination humide : ces deux méthodes possèdent des bénéfices et des inconvénients selon leur modalité d'usage et le contaminant impliqué. Les argiles possèdent de nombreuses propriétés dont celle de sorption qui explique leur usage pour la décontamination individuelle sèche. Des modifications physiques peuvent augmenter la capacité de sorption de ces minéraux et ainsi l'efficacité de décontamination.

---

# **Présentation du projet de recherche**

---



Le risque de contamination cutanée aux composés chimiques est important et actuel. En effet, bien que la convention sur l'interdiction de la mise au point, de la fabrication, du stockage et de l'emploi des armes chimiques soit en vigueur depuis 1997 ces armes sont retrouvées dans de nombreux conflits tels que la guerre d'Irak (2007) ou la guerre civile syrienne (2013). La contamination de populations civiles lors d'incidents impliquant des chimiques toxiques industriels est à aussi prendre en compte dans l'évaluation de ce risque, comme par exemple lors de l'incendie de l'usine Lubrizol à Rouen le 26 septembre 2019.

Des méthodes de décontamination ont été développées pour limiter les effets néfastes associés à la pénétration transcutanée de ces composés. La décontamination sèche s'oppose à la décontamination humide : elle est réalisée par exemple à l'aide de terre de foulon sous forme de poudre libre ou de gant. Cette argile possède de grandes propriétés d'adsorption mais sa fine granulométrie et sa volatilité entraînent des risques de contamination croisée par inhalation des particules contaminées. La décontamination humide quant à elle peut se faire à l'aide d'eau propulsée à fort débit sur les individus contaminés. Cette méthode est longue à mettre en place et pose des problèmes de gestion des déchets en plus d'être consommatrice de grandes quantités d'eau. Le risque majeur avec l'usage de l'eau est le « wash-in effect » qui correspond à une augmentation de la pénétration cutanée. Enfin la « Reactive Skin Decontamination Lotion » (RSDL) capture les contaminants grâce à sa forme galénique en éponge avant de les désactiver par action des oximes. Cette méthode est chère et difficilement applicable pour la décontamination de masse.

L'objectif de ce travail de thèse est de combiner les avantages de la décontamination sèche et de la décontamination humide à l'aide de formulations aqueuses d'argiles, et d'évaluer leur efficacité de décontamination sur des simulants de chimiques de guerre.

La toxicité des surnageants des suspensions aqueuses d'argile est déterminée selon la méthode colorimétrique d'évaluation de la viabilité cellulaire par réduction du sel de tétrazolium MTT. Pour évaluer la toxicité des suspensions d'argile dans leur globalité, c'est-à-dire en prenant en compte les particules les plus grosses, la réalisation d'essais de toxicité aiguë au stade embryonnaire sur le poisson zèbre est développée d'après la ligne directrice n°236 de l'OCDE. A notre connaissance il s'agit de la première utilisation de ce test pour déterminer la toxicité d'une argile.

L'axe central de ce travail est la mise au point d'une méthodologie selon la norme NF X52-122 « Sécurité et protection du citoyen - NRBC-E – Protocole d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine » : elle décrit la réalisation d'essais de diffusion *ex vivo* sur explants de peau, afin de prédire la diffusion transcutanée de chimiques de guerre. Le dispositif VitroPharma® qui est un analogue des cellules de Franz pour la

diffusion statique est utilisé en faisant varier : i) les contaminants chimiques, ii) le type d'argile utilisée pour la décontamination et iii) la nature de l'explant de peau.

### **1) Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine et humaine**

Le paraoxon est utilisé comme simulant de l'agent neurotoxique VX. Sa diffusion et sa décontamination sont étudiées sur la peau de cochon (oreille) et sur la peau humaine (abdomen) pour valider la peau de cochon comme modèle prédictif pour ce genre d'études. Pour les deux modèles la décontamination est réalisée avec de la terre de foulon sous forme de poudre ou de suspensions aqueuses à différentes concentrations.

### **2) Décontamination du Paraoxon avec l'argile X sur des explants de peau porcine**

Une nouvelle argile est testée pour évaluer son potentiel en tant que décontaminant cutané. Les protocoles de décontamination appliqués ont été les mêmes qu'avec la terre de foulon et son efficacité de décontamination est comparée à celle de la terre de foulon afin de proposer la meilleure argile pour la décontamination cutanée du paraoxon.

### **3) Décontamination du Salicylate de méthyle avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine**

Les suspensions de terre de foulon sont évaluées en tant que décontaminant universel : leur efficacité est déterminée lors d'une contamination cutanée au salicylate de méthyle, un simulant de l'ypérite.

### **4) Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine lésée**

Comme présenté dans l'étude bibliographique, il n'existe pas de méthode de décontamination validée pour les peaux lésées ce qui peut être problématique sur les champs d'opération militaire ou suite à une explosion. Après avoir démontré que les suspensions de terre de foulon possèdent un pouvoir décontaminant plus important que la terre sous forme de poudre sur des peaux saines, ces dernières sont évaluées sur des peaux lésées. Dans un premier temps un modèle reproductible de plaie par brûlure est mis au point et validé par histologie. L'évaluation du pouvoir décontaminant des suspensions a mis en évidence un manque de praticité de la galénique pour assurer le retrait de l'argile hydratée donc de nouvelles formulations à base de polymères avec un pouvoir gélifiant sont développées.

Initialement le dernier objectif de ce travail reposait sur la validation des observations faites *ex vivo* sur des modèles murins *in vivo*. Dans ce cadre une procédure a été rédigée puis évaluée et validée par un comité d'éthique et par le ministère de la recherche sous le nom CECCAPP\_ENS\_2018\_035 « Utilisation de modèles murins de peau lésée pour l'évaluation de formulations innovantes de décontamination cutanée à base d'argile suite à une contamination aux organophosphorés ». Suite au confinement du laboratoire à partir de mi-

mars 2020, seulement des essais préliminaires ont pu être réalisés et la poursuite de cette étude représente une des perspectives de cette thèse.



---

# Résultats

---

**1. Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine et humaine**  
Article soumis à Journal of Hazardous Materials en août 2020 – en révision

**2. Comparaison de deux phyllosilicates pour la décontamination du Paraoxon sur des explants de peau porcine**

**3. Décontamination du salicylate de méthyle avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine**

**4. Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine lésée**



# 1. Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine et humaine

## 1.1. Introduction

La terre de foulon est utilisée pour la décontamination cutanée sous forme de poudre mais Roul et al., 2017 ont démontré une efficacité de décontamination supérieure pour une suspension de 10g de terre de foulon dans 100mL d'eau. Le 4-cyanophénol a été choisi comme contaminant car il est facilement traçable par spectroscopie infrarouge de transformée de Fourier totale atténué de réflexion (ATR-FTIR). L'objet de cette thèse a donc été d'approfondir cette observation par l'usage de simulants reconnus de chimiques de guerre, selon la norme NF X52-122.

Le premier axe de recherche de cette thèse a consisté à rechercher un potentiel effet-dose entre la concentration en argile et l'efficacité de décontamination en utilisant des explants de peau pour des études de diffusion *ex vivo*. Différentes suspensions aqueuses de terre de foulon ont été réalisées avec des concentrations variables : la suspension initiale à 9.1% développée par Roul et al. 2017 a été encadrée par des suspensions à 5% et 15%. Dans un premier temps la toxicité de ces suspensions a été évaluée : *in vitro* sur deux types cellulaires cutanés (kératinocytes et fibroblastes) pour déterminer si la mise en suspension entraîne la libération de particules toxiques emprisonnées dans les agrégats d'argile. La toxicité *in vivo* sur le poisson zèbre *Danio rerio* a ensuite permis d'évaluer la toxicité des agrégats d'argile avant de déterminer l'efficacité de décontamination des différentes suspensions *ex vivo* sur des explants cutanés d'origine porcine et humaine. L'enjeu de cette expérience est multiple : déterminer la plus-value de l'usage des suspensions par rapport à la poudre de terre de foulon pour la décontamination du paraoxon (POX) ; observer un éventuel effet dépendant de la concentration des suspensions ; valider les explants de peau d'oreille de cochon comme modèle prédictif de la peau abdominale humaine pour les essais de décontamination *ex vivo*. L'ensemble des résultats obtenus pour ce chapitre sont décrits dans l'article suivant, soumis à Journal of Hazardous Materials en août 2020, les corrections étant en cours.

## 1.2. Article

# 1 Aqueous suspensions of Fuller's earth potentiate the adsorption capacities of 2 organophosphorus compound and improve skin decontamination properties

3 Alix Danoy<sup>1,\*</sup>, Kardelen Durmaz<sup>1</sup>, Margaux Paoletti<sup>1</sup>, Laetitia Vachez<sup>1</sup>, Annick Roul<sup>1,2</sup> & Bernard Verrier<sup>1</sup>

4 <sup>1</sup>UMR 5305: Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, CNRS / Université Claude Bernard Lyon 1,  
5 Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France.

6 <sup>2</sup>Pôle Santé, Direction Générale de la Sécurité Civile et de la Gestion des Crises, Ministère de l'Intérieur Paris, France

7 \* Correspondence : [alix.danoy@ibcp.fr](mailto:alix.danoy@ibcp.fr)

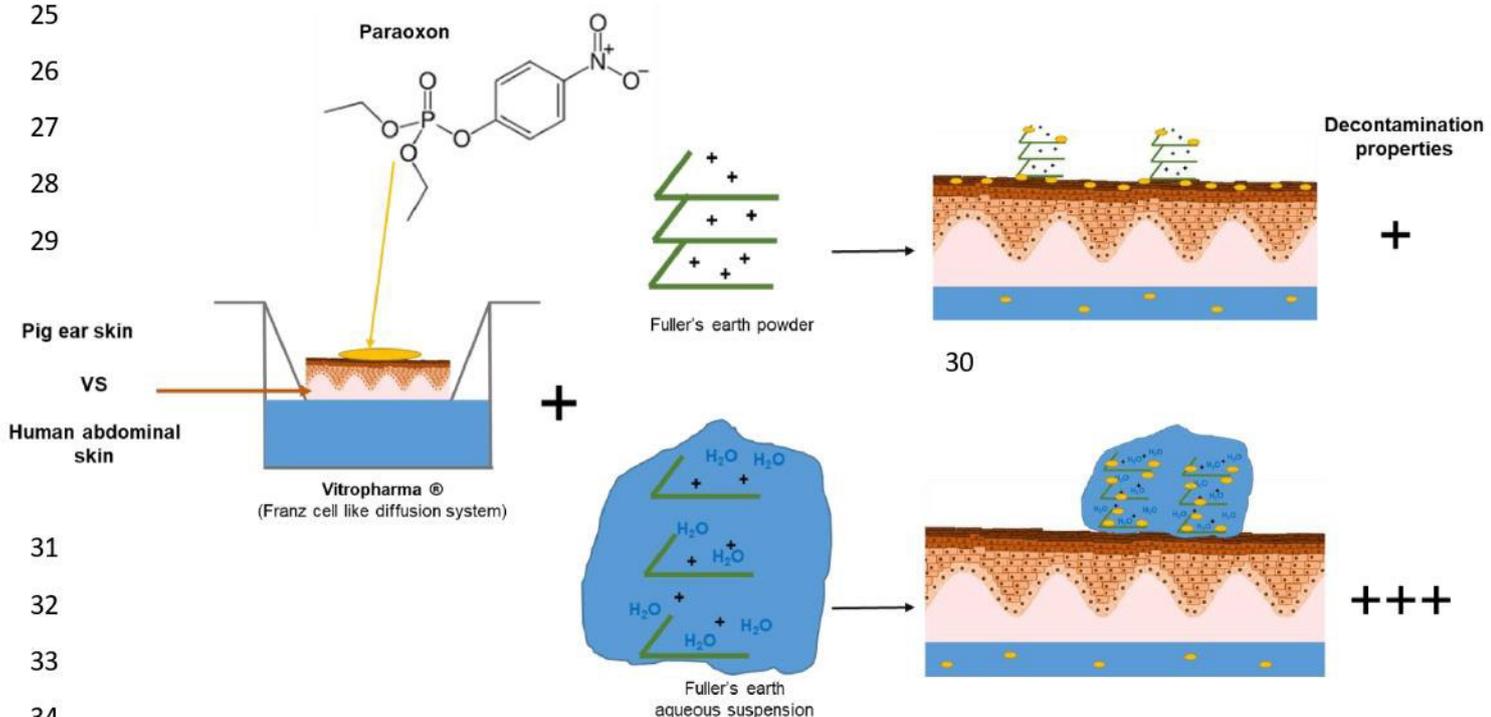
8

9 **Abstract:** Fuller's earth (FE) is a phyllosilicate used as a powder for household or skin decontamination due to its  
10 adsorbent properties. Recent studies have shown that water suspensions exhibit similar adsorbent capacities. FE  
11 is heterogeneous due to its composition of elementary clay aggregates and heavy metal particles. Here, FE  
12 toxicity was assessed *in vitro* on skin cells and *in vivo* on *Danio rerio* embryos. Among the suspensions tested (5%,  
13 9.1% and 15% w/w), only the highest one shows weak toxicity. Suspensions were tested for *ex vivo* dermal  
14 decontamination into pig ear skin and human abdominal skin using diffusion cells and paraoxon as  
15 organophosphorus contaminant. After 24 hours of diffusion, no difference was observed in the paraoxon  
16 concentration in the receptor compartment whether the decontamination was carried out with FE in powder or  
17 in suspension form. In presence of FE suspensions, we observed the disappearance of paraoxon from the *stratum*  
18 *corneum*, the reservoir compartment, independently of the suspensions' concentration. We suggest that water  
19 potentiates the absorbing capacities of FE powder by intercalating between clay lamellas leading to the  
20 appearance of new adsorption zones and swelling. These data support the use of FE aqueous suspensions as a  
21 safe tool for organophosphorus skin decontamination.

22 **Keywords:** smectite; paraoxon; toxicity; skin penetration; decontamination efficiency

23

24 **Graphical abstract :**



## 36 1. Introduction

37 Fuller's earth (FE) is a clay that has been used for hundreds of years for woolen fooling in order to clean wool to  
38 eliminate oils, dirt and impurities (Kherdekar & Adivarekar, 2017). Due to its adsorptive capacities, modern uses  
39 of FE have been extensively developed, ranging from absorbent for cat litter to carrier for fertilizers or active  
40 ingredient in cosmetic products (Rehan et al., 2019). Interestingly, one of its most intriguing use concerns dry  
41 skin decontamination in the military field. Indeed, chemical warfare agent (CWA) still represents a threat, both  
42 for civilian (Ciottone, 2018; Haines & Fox, 2014; Pitschmann, 2014) and military populations. Organophosphorus  
43 compounds (OPC) are among the most detected chemical compounds in the environment due to their use as  
44 pesticides (such as paraoxon (POX)) and nerve agents (tabun, sarin, soman, VX) (Naughton & Terry, 2018).  
45 Because most OPCs have a low volatility, their absorption through the dermal route remains predominant in  
46 comparison with the respiratory one (John et al., 2015; Thors et al., 2016), meaning that any system acting by  
47 adsorption and displacement of the toxic agent from the skin surface could be an efficient decontaminant  
48 product. Thus, FE, which is unexpansive, easy to obtain, and composed of layers with high ion exchange capacities  
49 (Taylor et al., 2006) favoring interaction with OPC, has largely been used for OPC decontamination. As illustrated  
50 by previous *ex vivo* and *in vivo* studies, this phyllosilicate has been shown to be the reference agent applied for  
51 skin decontamination following CWA exposure (Bjarnason et al., 2008; Chilcott et al., 2001; Taysse et al., 2011).

52 FE is a dusty agent that easily induces aerosols, favoring the propagation of contaminated dust and particles  
53 which could be inhaled by surrounding people and thus represents a new threat by cross-contamination (Denet  
54 et al., 2020). One way to bypass this problem could be to use of water suspension of FE as recently described  
55 recently (Roul et al., 2017). Even if most of the OPC materials have low water-solubility (for example POX is  
56 soluble at 2.4g/L), an aqueous suspension of FE could offer a strong added value for decontamination. In their  
57 paper, Roul et al (Roul et al., 2017) have shown that aqueous suspension of FE (10g into 100 mL) limit skin  
58 penetration of 4-cyanophenol. Thus, suspension's decontamination efficacy of this compound was proved to be  
59 better than FE powder or water alones, meaning that the contaminant is better entrapped.

60 In order to further investigate these observations, we decided to analyze the decontaminant properties of  
61 different concentration of FE suspension to highlight a potential dose effect decontamination efficacy. As skin is  
62 the first barrier to protect the body from external assaults, especially with OPC, we have explored the penetration  
63 of an OPC through this semi-permeable barrier to analyze if FE suspensions could diminish it. *Ex vivo* diffusion  
64 assays were done with specific derived Franz-cells (Salmon et al., 2015) (**see figure S1 in supplementary data**)  
65 allowing multiple runs at the same time and ensuring strong reproducibility. These devices consist of a donor  
66 and receiver compartments separated by a membrane make it possible to mimic passive cutaneous diffusion  
67 (Misik et al., 2011). Pig skin is commonly used as predictive model for human skin permeability because of the  
68 histological and pathophysiological similarities between the two species (Godin & Touitou, 2007; Matar et al.,  
69 2014). Although expensive and difficult to obtain, human skin remains the best model for *ex vivo* penetration  
70 study seeing as no interspecies extrapolation is needed (Moore et al., 2014) (Hui et al., 2012).

71 The primary aim of this study was to investigate the toxicity of different FE' suspensions. This analysis is essential  
72 because the water in the suspension could favor the release of toxic compounds, such as heavy metals entrapped  
73 into Fuller's earth aggregates, jeopardizing the use of such decontamination system. The evaluation has been  
74 done *in vitro* on skin cells and *in vivo* on *Danio rerio* embryos. After toxicological validation of the suspensions,  
75 their effectiveness as a decontamination tool has been evaluated *ex vivo* with diffusion assays. POX was used as  
76 simulant agent for VX (Bartelt-Hunt et al., 2008; Sellik et al., 2017) and chose for its lower toxicity and its intrinsic  
77 properties (**see table S1 in supplementary data**). Furthermore, both pig ear and human abdominal skins have  
78 been used as model in order to determine if pig ear skin can be considered as a good predictive model of human  
79 skin for this contaminant.

## 80 2. Materials and Methods

### 81 2.1. Material

82 Fuller's earth (FE) was purchased as a free powder with adsorptive properties available for fire-fighter  
83 decontamination process (NBC-Sys, France).

## 84 2.2. Toxicity

### 85 2.2.1. *In vitro* cell toxicity

86 Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF), passages 9 to 12, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's  
87 Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL). Human  
88 primary keratinocytes (HPK) extracted from foreskin, passage 1 to 4, were cultured in keratinocytes-SFM medium  
89 supplemented with bovine pituitary extract, 1% Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL), Epidermal Growth Factor  
90 and CaCl<sub>2</sub>. Both cell lineages were maintained in a 37 °C incubator (Heracell 150i, Thermo Scientific USA), under  
91 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. All the compounds for the cell media were purchased from Gibco (Thermo Fisher  
92 Scientific, USA). Three FE suspensions were prepared, respectively 5%, 9.1% and 15% w/w, in PBS 1X (Gibco, USA)  
93 and then filtered on 0.22 µm single-use polycarbonate filters (Merck Millipore, USA). The filtered supernatants  
94 were left at room temperature until they were added into cells for 30 minutes of incubation before washing and  
95 cell viability evaluation by the MTT technique. Cytotoxicity assays were done with MTT cytotoxicity assays  
96 reagent from Sigma Aldrich (USA) as described by the protocol.

97 The values for the culture media and tested ones (i.e. PBS 1X, SD 5% and the three supernatants from the three  
98 FE suspensions) were compared and statistically analyzed using a two-way ANOVA coupled with Dunnett multiple  
99 comparison *post hoc* analysis.

### 100 2.2.2. *In vivo* *Danio rerio* toxicity

101 Fish embryo toxicity test (FET) on zebrafish (*Danio rerio*) was made in agreement with OECD 236 guidelines.  
102 Briefly, zebrafish were obtained from Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL) where they were  
103 maintained in closed flow-through system with a temperature of 26°C ± 1°C and a 16h light / 8h dark cycle. After  
104 fertilization, newly fertilized eggs were collected and selected under binocular microscope: embryos with normal  
105 development staging from the zygote stage to the gastrula stage were distributed on a 24-well plate (Thermo  
106 Fisher Scientific, USA), one embryo per well. One condition per plate was tested: 3,4-dichloroaniline (Sigma  
107 Aldrich, France) at 8 µg/mL used as negative control, aquarium water (E3) used as positive control, and FE  
108 suspensions in water aquarium at 5%, 9.1% and 15% w/w. Every well was filled with 2 mL of solution, and  
109 embryos viability was assessed every 24h using microscope and toxicological endpoints as criterions (coagulated  
110 embryo, absence of heartbeat, non-detachment of the tail, absence of somitis formation) for 4 days. Alive fishes  
111 were analyzed to determine if they had any morphological abnormalities before observing their mobility with a  
112 ZebraBox equipped with ZebraLab software (Viewpoint Behavior Technology, France) by 5 minutes' light cycle  
113 exposition before 3 minutes' dark cycle.

114 The values for the aquarium media (E3) and tested ones (i.e. 3,4-dichloroaniline and the three FE aqueous  
115 suspensions) were compared and statistically analyzed using a two-way ANOVA coupled with Dunnett multiple  
116 comparison *post hoc* analysis.

### 117 2.3. *Ex vivo* cell diffusion assays

118 VitroPharma® (patent n° WO2013057401) was used as cell diffusion system (see figure S1 in supplementary  
119 data). Dermatomed skin at 500µm, either from pig ear or human abdomen, with a diffusion-available area of  
120 0.71 cm<sup>2</sup> was mounted in the system with the dermis facing the receptor compartment filled with 5 mL of PBS  
121 1X as receptor media. Heated magnetic stirrer was used to heat receptor fluid to 37 °C ± 1°C, which allowed the  
122 skin to be at 32°C (i.e. the physiological average temperature of human skin surface), and to homogenize it with  
123 a magnetic rod according to the OECD 428.

#### 124 2.3.1. Skin explants

125 Frozen pig ears (Proviskin, France) obtained from a slaughterhouse were thawed, shaved and dermatomed  
126 (Aesculap GA 630 model) at 500 µm. Individual disks of 2 cm<sup>2</sup> were cut off to fit into VitroPharma system.  
127 Abdominal human skin (Proviskin, France) was obtained after approval from women who have had abdominal  
128 plastic surgery and stored as frozen 2cm<sup>2</sup> disks dermatomed at 500 µm. Before the experiment, each skin explant  
129 was controlled with a caliper in order to have a homogeneous thickness of 500 µm ± 50 µm, and skin integrity  
130 was visually assessed by microscopy.

131 2.3.2. Decontamination protocols

132 Contaminated skins were obtained after the deposit of 10 µL/cm<sup>2</sup> of Paraoxon-diethyl (Sigma Aldrich, France)  
133 (paraoxon or POX) as simulant of VX nerve agent. In accordance with the standard NF X52-122, decontamination  
134 was realized after 30 minutes to evaluate decontamination efficiency for delayed decontamination. For dry  
135 decontamination, 0.16 g/cm<sup>2</sup> of Fuller's earth (NBC-Sys, France) were applied. Wet decontamination occurs  
136 through the use of water (Otec®, Aguettant, France) or FE aqueous suspensions prepared at 5%, 9.1% and 15%  
137 w/w using Otec® water (Aguettant, France). In each case 102 µL/cm<sup>2</sup> of liquid were deposited. For both  
138 decontamination protocols, the decontaminant was left on the skin for 2 minutes before being removed and  
139 then the skin was dry by patting with a pad.

140 2.3.3. Collection and treatment of samples

141 To determine POX penetration kinetics, 500 µL of fluid receptor were collected over time (1, 2, 4, 6, 8, 10 and 24  
142 hours of diffusion) and replaced by 500 µL of fresh media. After the set exposure period of 24 hours  
143 VitroPharma® diffusion cells were dismantled and the surface of skin samples was wiped with an absorbent paper  
144 in order to recover the fraction of POX remaining on the skin. Skin layers were separated using the cyanoacrylate  
145 glue method (Salerno et al., 2017) for *stratum corneum* (SC), and immersion into PBS 1X heated at 60 °C for  
146 epidermis and dermis. For each sample, POX was extracted for 24 hours into HPLC grade ethanol before HPLC-  
147 UV quantification.

148 2.3.4. Quantification by HPLC-UV

149 Concentration of POX was determined by liquid chromatography coupled with an UV detector (HPLC 1260 Infinity  
150 II LC systems, Agilent Technologies USA). Mobile phase was composed by 52.25% of methanol (HPLC grade, Carlo  
151 Erba, Italy); 42.75% of milliQ water (ultrapure analytical water with r=18 mΩ/cm, Millipore, USA) and 5% of acetic  
152 acid glacial (HPLC grade, Carlo Erba, Italy), the whole at a flow rate of 0.7 mL/min. 10 µL of sample were brought  
153 to the C18 Clipeus column (5 µm, 100x40 mm) heated at 40°C. POX was identified at 269 nm UV wavelength with  
154 a retention time of 5.9 minutes (Salerno et al., 2017).

155 The value for the kinetic profiles and for the quantification into cell diffusion compartments and skin layers were  
156 compared between them and statistically analyzed using a two-way ANVO coupled with Tuckey multiple  
157 comparison *post hoc* analysis.

158 2.4. Ex vivo evaluation of a skin decontaminant

159 Skin decontamination methods need to be evaluated and compared to each other to determine the most  
160 effective method based on skin penetration data. *Ex vivo* decontamination efficiency have been calculated as  
161 follows to compare skin decontamination methods:

162 
$$DE (\%) = \frac{(Q3T + Q4T) - (Q3 + Q4)}{Q3T + Q4T} \times 100$$

163 Where Q3 = the amount of POX present into skin layers (SC + epidermis + dermis) at the end of the experiment;  
164 Q4 = the amount of POX in the receptor (meaning that it passed through skin) at the end of the experiment; T is  
165 for control samples

166 According to the standard NF X52-122, skin decontamination has an impact on functional prognosis because of  
167 its ability to capture the contaminant on the skin's surface. The improvement of functional prognosis of each  
168 decontamination methods have been calculated as follows:

169 
$$FP = \frac{Q2T + Q3T + Q4T}{Q2 + Q3 + Q4}$$

170 Where Q2 = the amount of POX present on the skin after decontamination; Q3 = the amount of POX present into  
171 skin layers (SC + epidermis + dermis) at the end of the experiment; Q4 = the amount of POX in the receptor  
172 (meaning that it passed through skin) at the end of the experiment; T is for control samples

173 2.5. Statistical analysis

174 Data was statistically analyzed using GraphPad Prism Version 7.0 software (San Diego, CA, USA). All of the data  
175 are presented as the mean  $\pm$  SD, where n=4 for *in vitro* cell toxicity experiments, n=3 for *in vivo Danio rerio*  
176 toxicity experiments and n=6 for *ex vivo* skin decontamination assays. The statistical difference between groups  
177 was analyzed using one-way ANOVA tests followed by specific multiple comparison *post-hoc* tests as mentioned  
178 with each observed parameter individually.

179 3. Results

180 3.1. Toxicity of Fuller's earth suspensions

181 Fuller's earth is a heterogeneous smectite composed of particles sizing from nanometers to millimeters,  
182 corresponding to heavy metals particles and elementary clay aggregates. In order to assess its toxicity, it is  
183 necessary to take into account the presence of these different compounds and to identify appropriate toxicity  
184 tests. First, *in vitro* experiments were performed using 0.22 $\mu$ m filtered FE suspensions, on two different skin cells  
185 to identify ultrafilterable toxicity, such as heavy metal or nanoparticles. In parallel, toxicity of the whole  
186 suspensions was assessed *in vivo* on embryos zebra fish model to determine the potential side effects of clay  
187 aggregates.

188 3.1.1. FE suspensions' supernatant cytotoxicity

189 Toxicity of particles with a size < 0.22 $\mu$ m was evaluated *in vitro* on two types of skin cells: Human Primary  
190 Keratinocytes (HPK) and Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) after 30 minutes of contact (see materials  
191 and methods section 2.2.1.). As keratinocytes compose the top skin layer, which is epidermis, they are the first  
192 ones in contact with the product. Regardless of the concentration of the suspensions, no toxic effect on cell  
193 viability of FE supernatant was observed, in comparison with the two negative controls: cell media and PBS 1X  
194 (Figure1). NHDF, on the other hand, are founded in the dermis under the epidermis: they are in contact with an  
195 external element only in the case of a lesion. A significant effect on cell viability is observed for the supernatant  
196 from the less concentrated suspension and it increases significantly with the most concentrated suspension. PBS  
197 1X in which the suspensions were made also exhibits a significant toxic effect on NHDF (Figure 1).

198

199

200

201

202

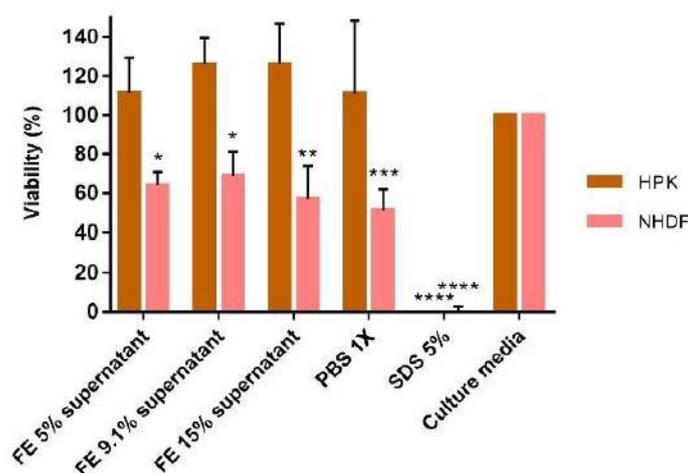
203

204

205

206

207



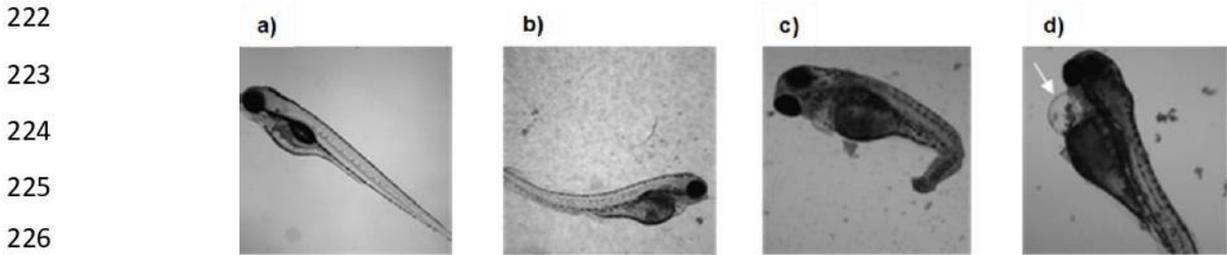
208 **Figure 1.** *In vitro* cell toxicity of FE supernatants filtered (size <0.22  $\mu$ m) from FE PBS 1X suspensions at different concentrations, on Human  
209 Primary Keratinocytes (HPK) and Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) (n=4 for each). Results were statistically analyzed using two-way  
210 ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests using culture medium as control treatment. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*:   
211 p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.005; \*\*\*\*: p<0.0001

212 3.1.2. *In vivo* toxicity of FE suspensions

213 To address a potential cytotoxicity due to the FE suspension concentration, *Danio rerio* fish embryos have been  
214 immersed for 4 days into different amount of FE suspensions, respectively 5, 9.1 and 15% w/w. Their viability  
215 was assessed as described in mat & meth using video microscopy. A selection has been done to differentiate

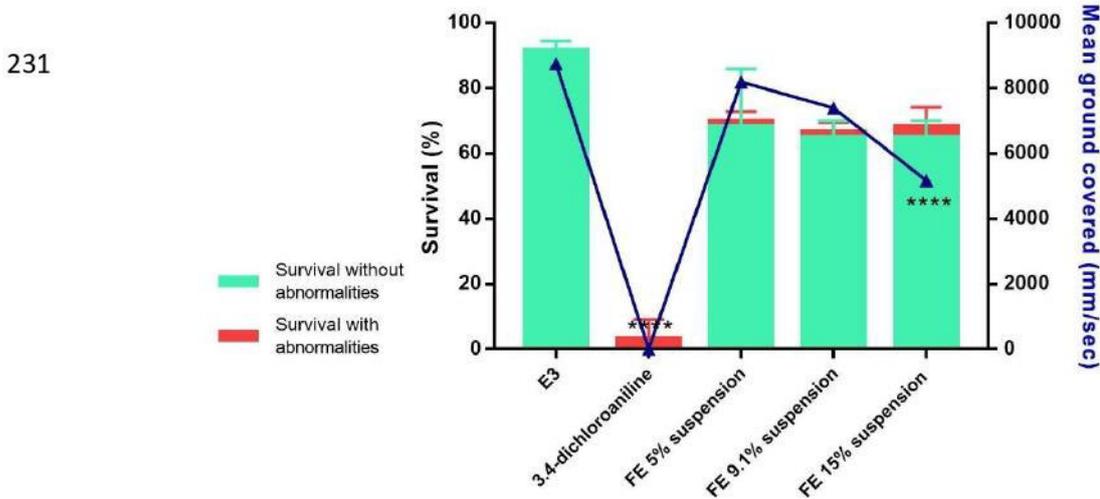
216 embryos without and with morphological abnormalities such as development default, curved tail or cardiac  
217 edema (Figure 2 a), b), c), d) respectively).

218 No significant difference was observed on global survival and the occurrence of anomalies between each  
219 suspension (Figure 3). When analyzing the mean ground covered for 3 minutes of light after 4 days of immersion,  
220 only the 15% suspension significantly impact fish mobility. However, as 15% of FE implies a strong increase in  
221 water viscosity, we could not exclude that these observations are due to physical impairment of fish mobility.



227 **Figure 2:** Morphological observation of 4 days old *Danio rerio*. a) Normal development; b) Global development default; c) Curved tail; d)  
228 Cardiac edema.

229



240 **Figure 3:** Survival rate of *Danio rerio* with and without morphological abnormalities and mean ground covered after 4 days on immersion in  
241 aquarium media (E3), negative control (3,4-dichloroaniline) and three different concentrations of FE aqueous suspensions into E3 (n=3 for  
242 each). Results were statistically analyzed using two-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison tests using E3 medium as control  
243 treatment. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*\*\*\*:  $p < 0.0001$

244

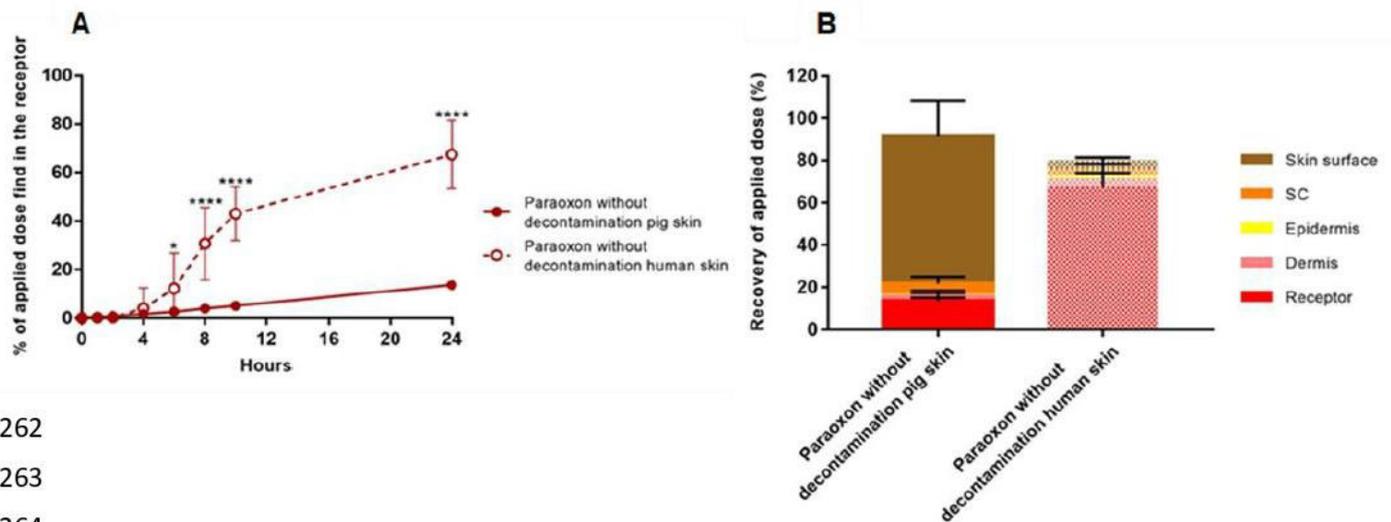
### 245 3.2. Ex vivo decontamination assays

246 Most of the *ex vivo* diffusion experiments are done on pig skin (Godin & Touitou, 2007), which is also true for  
247 skin decontamination studies (Matar et al., 2014; Taysse et al., 2007). This model is widely used as human skin  
248 penetration model due to the respect of physiopathology in relation to human skin (In et al., 2019). Nevertheless,  
249 it is still necessary to compare penetration profile for a given molecule on both skin origins as they differ slightly,  
250 leading to misleading extrapolations on human decontamination efficiency (Jung & Maibach, 2015; Netzlaff et  
251 al., 2005).

#### 252 3.2.1. Differences in paraoxon penetration kinetics through pig ear skin and human abdominal skin

253 *Ex vivo* POX penetration through pig ear skin for 24h is linear over time, reaching the value of  $13.59 \pm 0.78\%$  of  
254 the applied dose find in the receptor compartment (Figure 4A). At the opposite, *ex vivo* diffusion on human  
255 abdominal skin follows a more complex kinetic. Indeed, the penetration seems to take place in several stages: it

256 follows the same pattern as the one for pig ear skin during 4 hours followed by a sharp increase in the amount  
 257 of POX in the receptor. From 6 hours of POX diffusion, significant differences are observed between pig ear skin  
 258 and human abdominal skin profiles. These observations are supported by the quantification of POX into each  
 259 compartment that makes up the diffusion cell, i.e. the skin surface, the skin and the receptor, and each skin layer,  
 260 i.e. *stratum corneum* (SC), epidermis and dermis (**Figure 4B**). Significant differences between both skin origins  
 261 are found in the receptor and the skin surface, whereas there are no differences for the POX remaining into skin.



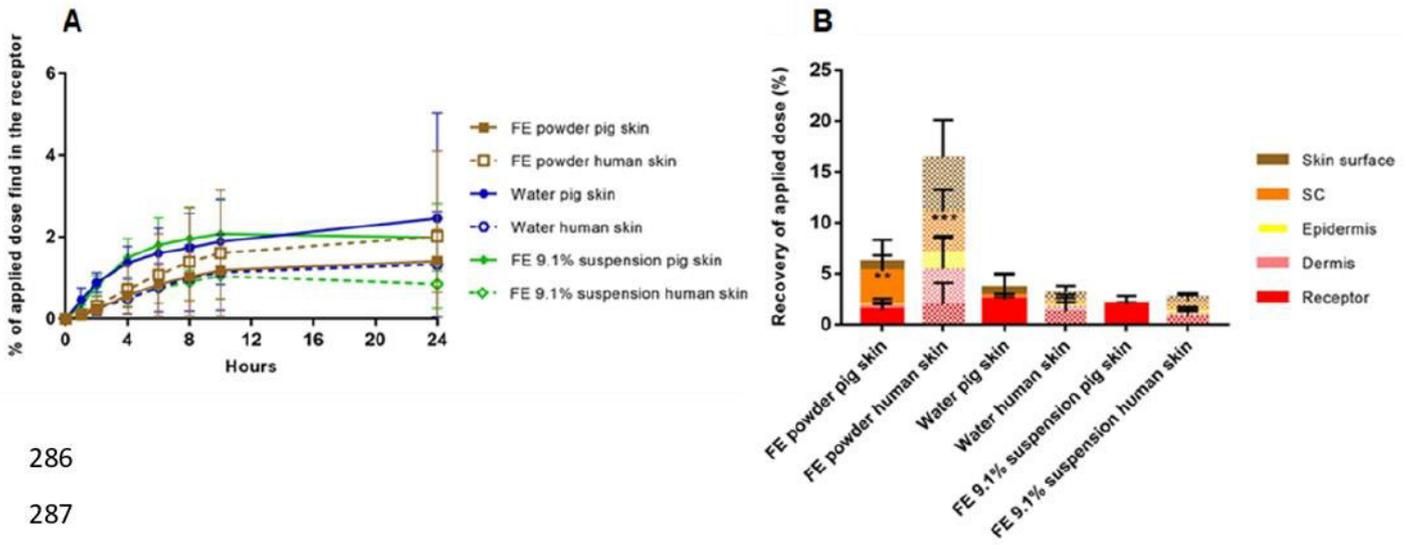
262  
 263  
 264  
 265  
 266 **Figure 4:** *Ex vivo* POX penetration assessment through pig ear skin and human abdominal skin without decontamination. **A)** Kinetic of  
 267 diffusion through skin for 24 hours (n=6 for each time); **B)** Quantification of POX into cell diffusion's compartments and skin layers after 24  
 268 hours of diffusion through skin (n=6 for each). Results were statistically analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple  
 269 comparison tests. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*: p<0.05, \*\*\*\*: p<0.0001

270 **3.2.2. Efficacy of FE suspension compared to FE powder and water**

271 After assessing the POX penetration profiles on both skin origins explants, decontamination efficiencies of FE  
 272 powder, water and FE 9.1% suspension were evaluated into both pig and human skins. This suspension'  
 273 concentration was chosen as it was the one developed by Roul et al., 2017 that has proven to have a better  
 274 decontamination efficiency than FE powder or water alone on 4-cyanophenol skin decontamination.

275 The same decontamination protocol was applied for each decontamination method and the kinetic of POX  
 276 penetration through skin was evaluated for 24 hours (**Figure 5A**). First of all, the appearance of a plateau is  
 277 observable from 8 to 10 hours of penetration meaning that there is no remaining contaminant on the skin  
 278 surface. This observation is made with the 3 types of decontamination on the 2 skin models, although the plateau  
 279 is less pronounced for FE powder and water decontamination. There is not significant difference in the quantity  
 280 of POX found in the receptor after 24 hours of diffusion, depending on the decontamination methods or skin  
 281 origins. At the end of the experiment, POX quantification in each skin layers highlighted between decontaminants  
 282 (**Figure 5B**). Indeed, while the amount of contaminant is not significantly different in the viable epidermis and  
 283 dermis depending on both decontamination method and skin origins, there are significant differences in SC

284 amounts. In the case of FE powder decontamination, there is a significant POX accumulation into the SC, without  
 285 differences between pig and human skin, in comparison with water and FE 9.1% suspension decontaminations.

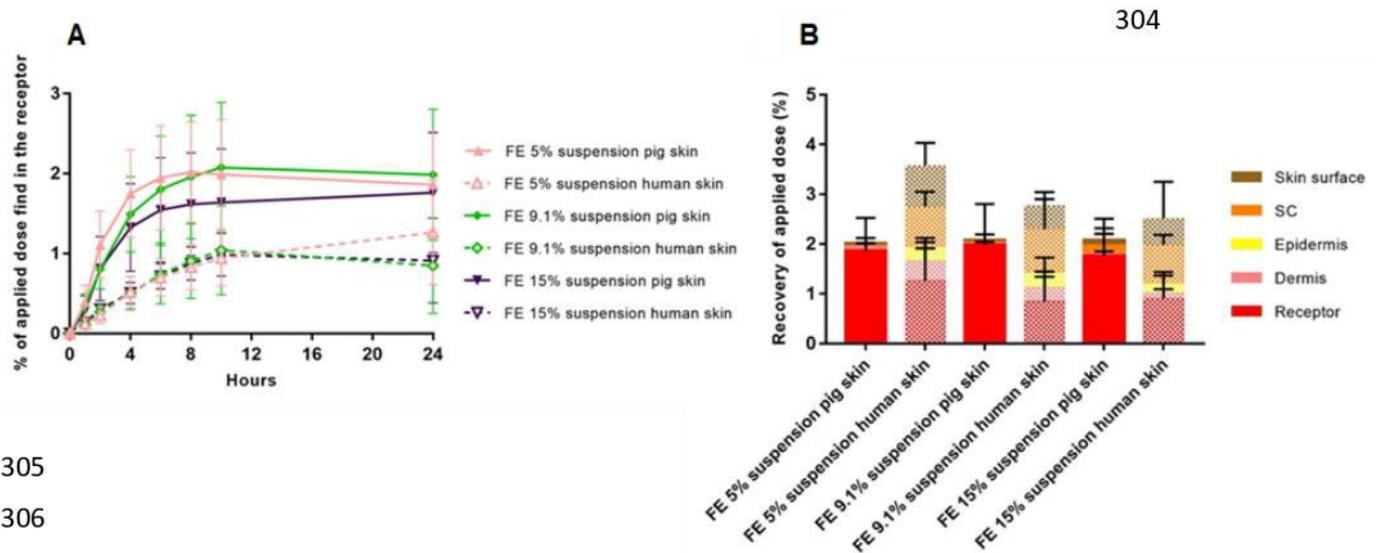


286  
 287  
 288  
 289 **Figure 5:** *Ex vivo* POX penetration assessment through pig ear skin and human abdominal skin with 3 decontamination methods following  
 290 the same protocol: FE powder, water and FE 9.1% aqueous suspension. **A)** Kinetic of diffusion through skin for 24 hours (n=6 for each time);  
 291 **B)** Quantification of POX into cell diffusion's compartments and skin layers after 24 hours of diffusion through skin (n=6 for each). Results  
 292 were statistically analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. Values are presented as mean ± SD. \*\*:   
 293 p<0.01, \*\*\*: p<0.005

294 **3.2.3. Relationship between FE suspensions' concentration and decontamination efficiency**

295 The added value of the FE 9.1% suspension compared to FE powder in terms of POX accumulation in the SC has  
 296 been illustrated by the **figure 5B**. Then, a dose effect of FE concentration has been further investigated using 5%  
 297 and 15% suspensions.

298 For each concentration, a plateau effect in the kinetic profile is observed from 8 hours of POX diffusion onwards,  
 299 as presented in **Figure 6A**. No significant differences are observed in the amount of contaminant in the receptor  
 300 as reported with the quantification in cell diffusion compartments and skin layers (**Figure 6B**). Although there is  
 301 no significant difference in the amount of POX in the SC for a given type of decontamination, a tendency for SC  
 302 accumulation into human skin model is noticed in comparison with the pig skin behavior. This can lead to a  
 303 prolonged release even if the penetration kinetic of the POX shows a plateau from 8 hours in human skin.



305  
 306

307 **Figure 6:** *Ex vivo* POX penetration assessment through pig ear skin and human abdominal skin with FE aqueous suspensions as  
 308 decontaminants with 3 different concentrations: 5%, 9.1% and 15%. **A)** Kinetic of diffusion through skin for 24 hours (n=6 for each time); **B)**  
 309 Quantification of POX into cell diffusion's compartments and skin layers after 24 hours of diffusion through skin (n=6 for each). Results were  
 310 statistically analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. Values are presented as mean  $\pm$  SD.

### 311 3.3. Comparison of each skin decontaminant

312 Decontamination methods were evaluated in comparison with POX skin contamination alone for both pig and  
 313 human skins (**Table 1**). For both skin models, *in vitro* decontamination efficiency of FE powder is the lowest.  
 314 Furthermore, there is no significant difference *per se* with wet decontamination, either with water alone or with  
 315 the FE suspensions. These results are homogeneous between them, and when comparing the two skin types the  
 316 values for human abdominal skin are on average 1.09 (1.06-1.12) times higher. Thus, it appears that pig ear skin  
 317 is a good predictive model for the assessment of the decontamination parameter efficiency. However, when we  
 318 analyzed as a second parameter the functional prognosis improvement factor, defined as the capability of  
 319 capture of the contaminant on the skin's surface by each component, (see materials and methods section 2.4.),  
 320 the table 1 shows less homogeneous results. For each skin type, FE powder is the decontamination method with  
 321 the lowest factor. When water or FE suspensions are used as decontamination methods, there is a 1.7-fold to 3-  
 322 fold increase on pig ear skin and a 4.6-fold to 6.5-fold increase on human abdominal skin, highlighting the added  
 323 value of this new decontamination method. These results are supported by the percentage of POX applied  
 324 recovered in SC for each decontamination method depending on the skin origin. Indeed, in comparison with FE  
 325 powder decontamination this quantity decreases significantly with the use of wet decontamination, and more  
 326 particularly with the use of the suspensions. The more pronounced effect of the suspensions on pig ear skin is  
 327 explained by histological differences with human skin that will be discussed in the next section.

328

Decontamination method	Pig ear skin			Human abdominal skin		
	<i>In vitro</i> decontamination efficiency %	Functional prognosis improvement factor	% of applied POX recovered in the SC	<i>In vitro</i> decontamination efficiency %	Functional prognosis improvement factor	% of applied POX recovered in the SC
Fuller's earth powder	76.04	14.92	3.18 $\pm$ 1.53	85.32	4.86	3.98 $\pm$ 1.05
Water	87.24	25.60	0.21 $\pm$ 0.09	96.55	25.10	0.56 $\pm$ 0.16
FE 5% suspension	91.12	45.70	0.02 $\pm$ 0.03	96.39	22.33	0.83 $\pm$ 0.15
FE 9.1% suspension	90.84	44.31	0.0 $\pm$ 0.0	96.98	28.84	0.48 $\pm$ 0.30
FE 15% suspension	91.10	44.26	0.16 $\pm$ 0.12	97.38	31.6	0.78 $\pm$ 0.10

329 **Table 1:** Evaluation of skin decontamination methods following the *in vitro* decontamination efficiency, the functional prognosis  
 330 improvement factor and the percentage of paraoxon applied recovered in the *stratum corneum* depending on skin origin.

331

## 332 4. Discussion

333 Toxicity of clays in general is not very well documented, and even more surprising when Fuller's earth (FE) is  
 334 concerned, in particular its potential unsafe use regarding skin contact. First of all, when analyzing the toxicity of  
 335 ultrafiltrable compounds released by water suspension of FE, our *in vitro* skin cells toxicity tests on filtered  
 336 supernatant illustrated two information. Keratinocytes, which are cells from the epidermis, are not impacted in  
 337 their viability by the application of neither PBS 1X or various concentrated supernatants of filtered FE  
 338 suspensions. Conversely, dermal fibroblasts from the layer under the epidermis show a significant decrease in  
 339 their viability after incubation with both PBS 1X and FE supernatants filtered. Han et al., previously demonstrated  
 340 that clays suspensions at 1000  $\mu$ g/mL are not toxic on human skin fibroblasts (CCD986sk) whereas Sandri et al.,  
 341 shaded this purpose by the observation of a tendency of decrease in cell viability of NHDF incubated with  
 342 montmorillonite nanocomposites from 150 to 300  $\mu$ g/mL. However, *in vitro* toxicity assessment is highly  
 343 dependent on the clay mineral and its structure in addition of the nature of the cell line (Maisanaba et al., 2015).  
 344 Based on suspensions' effect of raw FE, the results on keratinocytes are in accordance with the ones of Janer et  
 345 al., that recorded low toxicity of FE supernatants. To our knowledge, it is the first study that characterizes FE's  
 346 intrinsic toxicity using *Danio rerio* model. Most of the time this type of experiment allows to determine

347 adsorption properties of clays in order to diminish environmental water contamination (G. S. Gupta et al., 2016;  
348 Kansara et al., 2019). Here, the classical fish embryo toxicity test was coupled with a mobility test: no suspension  
349 has an effect of fish viability, while the more concentrated one has an impact on mobility. These results are in  
350 accordance with the ones of Abdel-Wahhab et al., and Dwyer et al., who gave ingested clays to rats and chickens  
351 in order to detoxify them after toxin ingestion. Neither models showed toxicity leading to the conclusion that  
352 clays are safe to use. Taken together, *in vitro* and *in vivo* toxicity tests suggest that FE suspensions are safe to use  
353 on undamaged and healthy skin in a concentration range from 5 to 9.1% w/w.

354 Furthermore, pig ear skin was studied as a predictive model for *ex vivo* human skin decontamination studies of  
355 organophosphorus compounds. POX penetration through pig ear skin and human abdominal skin has shown  
356 different kinetic profiles with a linear diffusion through pig ear skin opposed to a 5-fold higher diffusion for  
357 human skin (**Figure 4A**). In et al., compared histological and functional anatomical regions of porcine skin,  
358 including the ear, with human abdominal skin. Several significant differences have been identified, in particular  
359 for the SC, the dermo-epidermal interface and the dermis thickness that are larger in the human model. These  
360 variations in layer thickness leads to a significant difference in the epidermal-dermal thickness ratio; 1:19 for  
361 human abdominal skin versus 1:14 for pig ear skin. It means that even if both explants are dermatomed at 500  
362  $\mu\text{m}$ , the pig one has a larger dermal hydrophilic component. With its lipophilic properties the POX accumulates  
363 preferentially in the epidermis which is mainly lipophilic thanks to its upper layer, the SC. In the pig ear skin  
364 model, the drug will pass through epidermis, slightly accumulates into the SC before a difficult diffusion into the  
365 dermis to reach the receiving compartment. The lipophilic layer is way more important into the human skin  
366 model, acting as a larger reservoir, while the hydrophilic dermis is thinner. When the reservoir is saturated with  
367 the lipophilic drug, it allows an easier passage into the receptor compartment, as represented on **Figure 5A** after  
368 4 hours of diffusion. According to the others results presented, no significant differences were observed  
369 depending on the skin origin for a given decontamination method for contaminant quantity into the receptor  
370 chamber and into skin layers (**Figure 5A, 5B, 6A and 6B**). This is explained by the action of the decontaminants,  
371 that limit the quantity of contaminant into the skin, preventing the epidermis saturation in POX leading to a  
372 massive release. There is still a tendency of POX accumulation into the SC in human skin that is not observed for  
373 pig ear skin, due to the difference in thickness. Pig ear skin can still be used as a cheap predictive model for  
374 human skin diffusion and decontamination studies.

375 The improvement of decontamination efficiency for FE aqueous suspensions in comparison to FE powder or  
376 water alone can be explained by the molecular structure of the particles. Clays, more particularly smectites, are  
377 compounds of negatively charged organized units called lamellas, spaced by cations and water molecules, that  
378 are then organized as particles and further as aggregates (Salles et al., 2010). Generally speaking, the adsorption  
379 model for this type of material is based on pore diffusion through and inside aggregates before sorption by intern  
380 particles (van Beinum et al., 2005). This sorption mechanism was validated for pesticides: diffusion occurs  
381 through migration inside aggregates and their pores leading to the adsorption on the solid phase inside the  
382 aggregate before reaching a local equilibrium between the concentration in the pore solution and the locally  
383 absorbed concentration (Villaverde et al., 2009). Although the inter lamellar space is filled with cations, it remains  
384 the privileged area for chemical sorption with aggregates' surface (Shah et al., 2018). The nature of exchangeable  
385 cations and their degree of isomorphic substitution as well as the clay chemical composition are going to be key  
386 factors to understand clays' wettability properties with water (Iannuccelli et al., 2016). Indeed, when clays are  
387 added in aqueous media, aggregates become oriented and ordered (Salles et al., 2010): lamellas are separated  
388 by water molecules layers and an increase in micropore size is observed as the result of the increase of basal  
389 space leading to a bigger BET surface area (the Brunauer, Emmet and Teller method permit to measure the  
390 surface areas) (Bertella & Pergher, 2017). Hydration sequence is well described for smectites clay: firstly, an  
391 external hydration occurs on mesopore with single layers of water before filling of inter lamellar spaces and  
392 osmotic swelling.

393 With the use of FE suspensions, new hidden and non-accessible adsorption territories are released (van Beinum  
394 et al., 2005) which explains the decontamination efficiency improvement of water suspensions in comparison  
395 with dry FE. Nevertheless, this phenomenon is limited because intercalation of molecules into inter lamellar  
396 spaces is controlled by two parameters: attractive forces and cations exchange capacity (Moraes et al., 2017).  
397 This restriction explains the absence of a relationship between the concentration of suspensions and

398 decontamination efficiency or functional prognosis improvement factor. All decontamination methods tested  
399 are significantly effective but depending on the decontaminant, different mechanisms are involved: for dry  
400 decontamination with FE as a powder, there is contaminant adsorption and fixation site saturation leading to  
401 free contaminant available to pass through skin layers. The excess contaminant will accumulate in the SC because  
402 of its lipophilic properties, and create a tank reservoir that allows a delayed release and a later contamination  
403 which is represented by a low Functional Prognosis, in accordance with the one found by Salerno et al., 2017 for  
404 FE powder applied on pig ear skin. To the opposite, wet decontamination with water alone allows only physical  
405 displacement and no adsorption with FE is involved. Thus, aqueous suspensions of FE used as innovative wet  
406 decontamination potentiates FE powder decontamination ability with the emergence of new adsorption sites as  
407 a result of inter lamellar swelling induced by water molecules.

## 408 **5. Conclusion**

409 Fuller's earth (FE) is a smectite clay well known for its adsorbent properties used for household or skin  
410 decontamination. This compound is very heterogeneous in terms of nature and particle size as it is mostly  
411 composed of elementary clay aggregates and few amount of minerals such as heavy metals. Our results clearly  
412 indicate that aqueous suspension of FE, regardless of its concentration, does not promote the release of toxic  
413 compounds from the clay. We have identified a minimal dose of 5% FE suspension in water as an optimal  
414 concentration for *ex vivo* dermal decontamination of paraoxon when loaded on porcine or human skin explants.  
415 Indeed, water suspension increases the decontaminant properties of FE, as noticed by the disappearance of a  
416 *stratum corneum* reservoir of paraoxon. All together these results are in favor of the use of water suspension of  
417 FE as a new tool to organophosphate decontamination.

418

## 419 **CRedit authorship contribution statement**

420 **Alix Danoy**: Conceptualization; Methodology; Formal analysis; Investigation; Writing – Original Draft; Writing –  
421 Review & Editing. **Kardelen Durmaz**: Investigation. **Margaux Paoletti**: Investigation. **Laetitia Vachez**:  
422 Methodology; Investigation. **Annick Roul**: Conceptualization. **Bernard Verrier**: Conceptualization; Resources;  
423 Writing – Review & Editing; Supervision; Funding acquisition.

## 424 **Funding**

425 This research was funded by the Direction Générale de l'Armement DGA who paid Alix Danoy as PhD student,  
426 Laetitia Vachez is a recipient from ANR-16-CE20-0002-01 (FishRNAVax) and most part of this work has been  
427 funded by CNRS grant to Bernard Verrier.

428

## 429 **Acknowledgments**

430 We would like to thank Julien Rouleau for his advices during all the project, the PRECI (IGFL Lyon, SFR Biosciences)  
431 for animal housing and facilities, Damien Salmon for the supply of Vitropharma® device, Damien Ficheux and  
432 Maxime Dzikowski for the help for HPLC-UV method development. We would like to thank Fanny Charriaud for  
433 English language and style corrections.

434

## 435 **References**

436 Abdel-Wahhab, M. A., Nada, S. A., & Amra, H. A. (1999). Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-  
437 induced developmental toxicity in rat. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 19(3), 199-204.  
438 [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-1263\(199905/06\)19:3<199::aid-jat558>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-1263(199905/06)19:3<199::aid-jat558>3.0.co;2-d)  
439 Bartelt-Hunt, S. L., Knappe, D. R. U., & Barlaz, M. A. (2008). A Review of Chemical Warfare Agent Simulants for  
440 the Study of Environmental Behavior. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(2),  
441 112-136. <https://doi.org/10.1080/10643380701643650>

442 Bertella, F., & Pergher, S. B. C. (2017). Scale Up Pillaring : A Study of the Parameters That Influence the Process.  
443 *Materials (Basel, Switzerland)*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/ma10070712>

444 Bjarnason, S., Mikler, J., Hill, I., Tenn, C., Garrett, M., Caddy, N., & Sawyer, T. W. (2008). Comparison of selected  
445 skin decontaminant products and regimens against VX in domestic swine. *Human & Experimental*  
446 *Toxicology*, 27(3), 253-261. <https://doi.org/10.1177/0960327108090269>

447 Chilcott, R. P., Jenner, J., Hotchkiss, S. A., & Rice, P. (2001). In vitro skin absorption and decontamination of  
448 sulphur mustard : Comparison of human and pig-ear skin. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 21(4),  
449 279-283. <https://doi.org/10.1002/jat.755>

450 Ciottone, G. R. (2018). Toxidrome Recognition in Chemical-Weapons Attacks. *The New England Journal of*  
451 *Medicine*, 378(17), 1611-1620. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705224>

452 Denet, E., Espina-Benitez, M. B., Pitault, I., Pollet, T., Blaha, D., Bolzinger, M.-A., Rodriguez-Nava, V., & Briçon,  
453 S. (2020). Metal oxide nanoparticles for the decontamination of toxic chemical and biological  
454 compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 583, 119373.  
455 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119373>

456 Dwyer, M., Kubena, L., Harvey, R., Mayura, K., Sarr, A., Buckley, S., Bailey, R., & Phillips, T. (1997). Effects of  
457 inorganic adsorbents and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poultry Science*, 76(8), 1141-1149.  
458 <https://doi.org/10.1093/ps/76.8.1141>

459 Godin, B., & Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery : Predictions for humans from in vivo, ex vivo and  
460 animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11), 1152-1161.  
461 <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.07.004>

462 Gupta, G. S., Dhawan, A., & Shanker, R. (2016). Montmorillonite clay alters toxicity of silver nanoparticles in  
463 zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo. *Chemosphere*, 163, 242-251.  
464 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.032>

465 Haines, D. D., & Fox, S. C. (2014). Acute and Long-Term Impact of Chemical Weapons : Lessons from the Iran-Iraq  
466 War. *Forensic Science Review*, 26(2), 97-114.

467 Han, H.-K., Lee, Y.-C., Lee, M.-Y., Patil, A. J., & Shin, H.-J. (2011). Magnesium and calcium organophyllosilicates :  
468 Synthesis and in vitro cytotoxicity study. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(7), 2564-2572.  
469 <https://doi.org/10.1021/am200406k>

470 Hui, X., Domoradzki, J. Y., & Maibach, H. C. (2012). In vitro study to determine decontamination of 3,5-dichloro-  
471 2,4,6-trifluoropyridine (DCTFP) from human skin. *Food and Chemical Toxicology: An International*  
472 *Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(7), 2496-2502.  
473 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.069>

474 Iannuccelli, V., Maretti, E., Sacchetti, F., Romagnoli, M., Bellini, A., Truzzi, E., Miselli, P., & Leo, E. (2016).  
475 Characterization of nature clays from Italian deposits with focus on elemental composition and  
476 exchanges estimated by EDX analysis: potential pharmaceutical and cosmetic uses. *Clays and Clay*  
477 *Minerals*, 64(6), 719-731. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2016.064038>

478 In, M. K., Richardson, K. C., Loewa, A., Hedtrich, S., Kaessmeyer, S., & Plendl, J. (2019). Histological and functional  
479 comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anatomia,*  
480 *Histologia, Embryologia*, 48(3), 207-217. <https://doi.org/10.1111/ahe.12425>

481 Janer, G., Fernández-Rosas, E., Molino, E. M. del, González-Gálvez, D., Vilar, G., López-Iglesias, C., Ermini, V., &  
482 Vázquez-Campos, S. (2014). In vitro toxicity of functionalised nanoclays is mainly driven by the presence  
483 of organic modifiers. *Nanotoxicology*, 8(3), 279-294. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.776123>

484 John, H., Balszuweit, F., Kehe, K., Worek, F., & Thiermann, H. (2015). Chapter 56—Toxicokinetic Aspects of Nerve  
485 Agents and Vesicants. In R. C. Gupta (Éd.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second*  
486 *Edition)* (p. 817-856). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00056-7>

487 Jung, E. C., & Maibach, H. I. (2015). Animal models for percutaneous absorption. *Journal of Applied Toxicology:*  
488 *JAT*, 35(1), 1-10. <https://doi.org/10.1002/jat.3004>

489 Kansara, K., Paruthi, A., Misra, S. K., Karakoti, A. S., & Kumar, A. (2019). Montmorillonite clay and humic acid  
490 modulate the behavior of copper oxide nanoparticles in aqueous environment and induces  
491 developmental defects in zebrafish embryo. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 255(Pt 2),  
492 113313. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113313>

493 Kherdekar, G., & Adivarekar, R. V. (2017). Effect of different Wool Scouring Techniques on Physical Properties of  
494 Wool Fiber. *International Journal of Modern Trends in Engineering & Research*, 4(5), 163-167.  
495 <https://doi.org/10.23883/ijrter.2017.3527.ndvmi>

496 Maisanaba, S., Pichardo, S., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Cameán, A. M., & Jos, A. (2015). Toxicological  
497 evaluation of clay minerals and derived nanocomposites : A review. *Environmental Research*, 138,  
498 233-254. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.024>

- 499 Matar, H., Lerner, J., Kansagra, S., Atkinson, K. L., Skamarauskas, J. T., Amlot, R., & Chilcott, R. P. (2014). Design  
500 and characterisation of a novel in vitro skin diffusion cell system for assessing mass casualty  
501 decontamination systems. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with*  
502 *BIBRA*, 28(4), 492-501. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.01.001>
- 503 Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., & Kuca, K. (2011). METHOD OF STATIC DIFFUSION CELLS FOR ASSESSMENT OF  
504 PESTICIDES SKIN PERMEATION. *Military Medical Science Letters*, 80, 46-51.  
505 <https://doi.org/10.31482/mmsl.2011.007>
- 506 Moore, C. A., Wilkinson, S. C., Blain, P. G., Dunn, M., Aust, G. A., & Williams, F. M. (2014). Percutaneous  
507 absorption and distribution of organophosphates (chlorpyrifos and dichlorvos) following dermal  
508 exposure and decontamination scenarios using in vitro human skin model. *Toxicology Letters*, 229(1),  
509 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.008>
- 510 Moraes, J. D. D., Bertolino, S. R. A., Cuffini, S. L., Ducart, D. F., Bretzke, P. E., & Leonardi, G. R. (2017). Clay  
511 minerals : Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw  
512 materials for therapeutic purposes-A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1-2), 213-219.  
513 <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.031>
- 514 Naughton, S. X., & Terry, A. V. (2018). Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure.  
515 *Toxicology*, 408, 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>
- 516 Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P. W., & Schaefer, U. F. (2005). The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic®  
517 and EpiDerm® : An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy,  
518 corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2),  
519 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>
- 520 Pitschmann, V. (2014). Overall view of chemical and biochemical weapons. *Toxins*, 6(6), 1761-1784.  
521 <https://doi.org/10.3390/toxins6061761>
- 522 Rehan, I., Khan, M. Z., Rehan, K., Sultana, S., Rehman, M. U., Muhammad, R., Ikram, M., & Anwar, H. (2019).  
523 Quantitative analysis of Fuller's earth using laser-induced breakdown spectroscopy and inductively  
524 coupled plasma/optical emission spectroscopy. *Applied Optics*, 58(16), 4227-4233.  
525 <https://doi.org/10.1364/AO.58.004227>
- 526 Roul, A., Le, C.-A.-K., Gustin, M.-P., Clavaud, E., Verrier, B., Pirot, F., & Falson, F. (2017). Comparison of four  
527 different fuller's earth formulations in skin decontamination. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 37(12),  
528 1527-1536. <https://doi.org/10.1002/jat.3506>
- 529 Salerno, A., Devers, T., Bolzinger, M.-A., Pelletier, J., Josse, D., & Briançon, S. (2017). In vitro skin decontamination  
530 of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO<sub>2</sub>. *Chemico-Biological*  
531 *Interactions*, 267, 57-66. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.035>
- 532 Salles, F., Bildstein, O., Douillard, J. M., Jullien, M., Raynal, J., & Van Damme, H. (2010). On the Cation Dependence  
533 of Interlamellar and Interparticular Water and Swelling in Smectite Clays. *Langmuir*, 26(7), 5028-5037.  
534 <https://doi.org/10.1021/la1002868>
- 535 Salmon, D., Gilbert, E., Gioia, B., Haftek, M., Pivot, C., Verrier, B., & Pirot, F. (2015). New easy handling and  
536 sampling device for bioavailability screening of topical formulations. *European Journal of Dermatology:*  
537 *EJD*, 25 Suppl 1, 23-29. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2551>
- 538 Sandri, G., Bonferoni, M. C., Ferrari, F., Rossi, S., Aguzzi, C., Mori, M., Grisoli, P., Cerezo, P., Tenci, M., Viseras, C.,  
539 & Caramella, C. (2014). Montmorillonite-chitosan-silver sulfadiazine nanocomposites for topical  
540 treatment of chronic skin lesions : In vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell  
541 motility properties. *Carbohydrate Polymers*, 102, 970-977.  
542 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.029>
- 543 Sellik, A., Pollet, T., Ouvry, L., Briançon, S., Fessi, H., Hartmann, D. J., & Renaud, F. N. R. (2017). Degradation of  
544 paraoxon (VX chemical agent simulant) and bacteria by magnesium oxide depends on the crystalline  
545 structure of magnesium oxide. *Chemico-Biological Interactions*, 267, 67-73.  
546 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.023>
- 547 Shah, K. J., Pan, S.-Y., Shukla, A. D., Shah, D. O., & Chiang, P.-C. (2018). Mechanism of organic pollutants sorption  
548 from aqueous solution by cationic tunable organoclays. *Journal of Colloid and Interface Science*, 529,  
549 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.094>
- 550 Taylor, L., Brown, T., Benham, A., Lusty, P., & Minchin, D. (2006). *World mineral production 2000-04*. British  
551 Geological Survey. <http://www.bgs.ac.uk/mineralsuk/>
- 552 Taysse, L., Daulon, S., Delamanche, S., Bellier, B., & Breton, P. (2007). Skin decontamination of mustards and  
553 organophosphates : Comparative efficiency of RSDL and Fuller's earth in domestic swine. *Human &*  
554 *Experimental Toxicology*, 26(2), 135-141. <https://doi.org/10.1177/0960327107071866>

555 Taysse, L., Dorandeu, F., Daulon, S., Foquin, A., Perrier, N., Lallement, G., & Breton, P. (2011). Cutaneous  
556 challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse (II) : Effects of some currently used  
557 skin decontaminants (RSDL and Fuller's earth) against liquid sulphur mustard and VX exposure. *Human  
558 & Experimental Toxicology*, 30(6), 491-498. <https://doi.org/10.1177/0960327110373616>

559 Thors, L., Koch, B., Koch, M., Hägglund, L., & Bucht, A. (2016). In vitro human skin penetration model for  
560 organophosphorus compounds with different physicochemical properties. *Toxicology in Vitro: An  
561 International Journal Published in Association with BIBRA*, 32, 198-204.  
562 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.003>

563 van Beinum, W., Beulke, S., & Brown, C. D. (2005). Pesticide sorption and diffusion in natural clay loam  
564 aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9146-9154.  
565 <https://doi.org/10.1021/jf050928g>

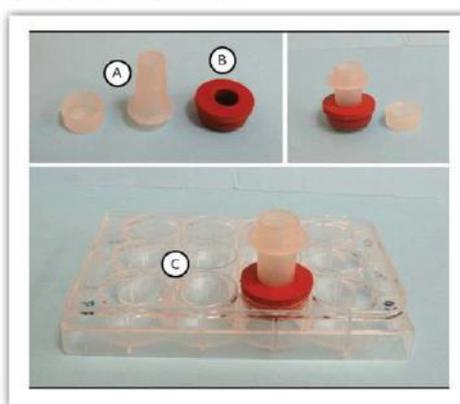
566 Villaverde, J., van Beinum, W., Beulke, S., & Brown, C. D. (2009). The kinetics of sorption by retarded diffusion  
567 into soil aggregate pores. *Environmental Science & Technology*, 43(21), 8227-8232.  
568 <https://doi.org/10.1021/es9015052>

569  
570  
571  
572

1 **Supplementary data**

2 **Vitropharma®: miniaturized Franz cell-like diffusion system**

3 There are various diffusion cells models to predict *in vivo* skin penetration of a product, but the most common  
 4 one is the Franz cells which allow a static diffusion (Misik et al., 2011). It consists of a receptor and a donor  
 5 chambers separated by a skin explant placed with the epidermal skin surface facing the receptor and with the  
 6 dermal surface in direct contact with the receptor fluid heated. Miniaturized serial static diffusion cells were  
 7 patented as Vitropharma (Figure S1) that have demonstrated biopharmaceutical equivalence with Franz cell for  
 8 caffeine penetration through pig ear skin (Salmon et al., 2015).



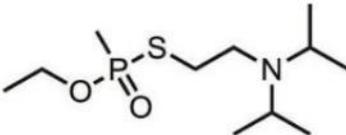
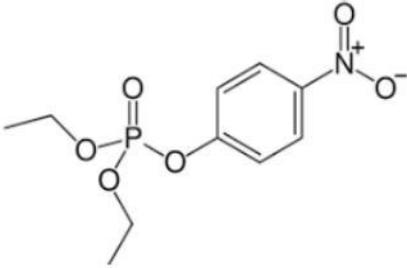
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16 **Figure 21 :** *Cellule VitroPharma*: Prototyps 11bis composé de (A) un compartiment donneur en polypropylène usiné muni d'un couvercle vissable, (B) une bague d'étanchéité en élastomère et (C) un compartiment récepteur sous forme de plaque multi-puits. (Volume du compartiment donneur : 3 mL, volume du compartiment récepteur : 4 mL, surface effective de perméation : 0,71 cm<sup>2</sup>).

17 **Figure S1:** VitroPharma *ex vivo* cell diffusion system with a: the donor chamber, b: the seal for the water tightness and c: the receptor  
 18 chamber

19

20 **Physic and chemical properties of VX nerve agent and Paraoxon as its simulant**

21 Acute toxicity of a chemical compound is assessed by the median lethal dose (LD<sub>50</sub>), i.e. the dose required to kill  
 22 half the members of a tested population. According to the one way of contamination which is percutaneous  
 23 application, LD<sub>50</sub> of organophosphorus compounds were compared on wistar rats: VX = 0.0849 mg.kg<sup>-1</sup>; paraoxon  
 24 (POX) = 4.373 mg.kg<sup>-1</sup>; soman = 9.987 mg.kg<sup>-1</sup> (Misik et al., 2015). POX is the active compound of the parathion,  
 25 an OP pesticide widely consumed in agriculture. One of its specificities is its use in the research field as VX  
 26 simulant (Sellik et al., 2017): both compounds are lipophilics (log K<sub>o/w</sub> ≈ 2) with equivalent molecular weights so  
 27 they display the same transcutaneous penetration kinetics (Table S1).

	VX nerve agent	Paraoxon
<b>Structure</b>		
<b>Molecular Weight (Da)</b>	267.4	275.2
<b>Vapor pressure (mm Hg) at 25°C</b>	7.0x10 <sup>-4</sup>	1.1x10 <sup>-6</sup>
<b>Log K<sub>o/w</sub></b>	2.09	1.98

28 **Table S1:** Comparison of Paraoxon-diethyl and VX nerve agent physic and chemical properties

29

30 **References**

31 Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., & Kuca, K. (2011). METHOD OF STATIC DIFFUSION CELLS FOR ASSESSMENT OF  
32 PESTICIDES SKIN PERMEATION. *Military Medical Science Letters*, 80, 46-51.  
33 <https://doi.org/10.31482/mmsl.2011.007>

34 Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., & Kuca, K. (2015). Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats.  
35 *Drug and Chemical Toxicology*, 38(1), 32-36. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.900070>

36 Salmon, D., Gilbert, E., Gioia, B., Haftek, M., Pivot, C., Verrier, B., & Pirot, F. (2015). New easy handling and  
37 sampling device for bioavailability screening of topical formulations. *European Journal of Dermatology: EJD*, 25  
38 *Suppl 1*, 23-29. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2551>

39 Sellik, A., Pollet, T., Ouvry, L., Briançon, S., Fessi, H., Hartmann, D. J., & Renaud, F. N. R. (2017). Degradation of  
40 paraoxon (VX chemical agent simulant) and bacteria by magnesium oxide depends on the crystalline structure of  
41 magnesium oxide. *Chemico-Biological Interactions*, 267, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.023>

42

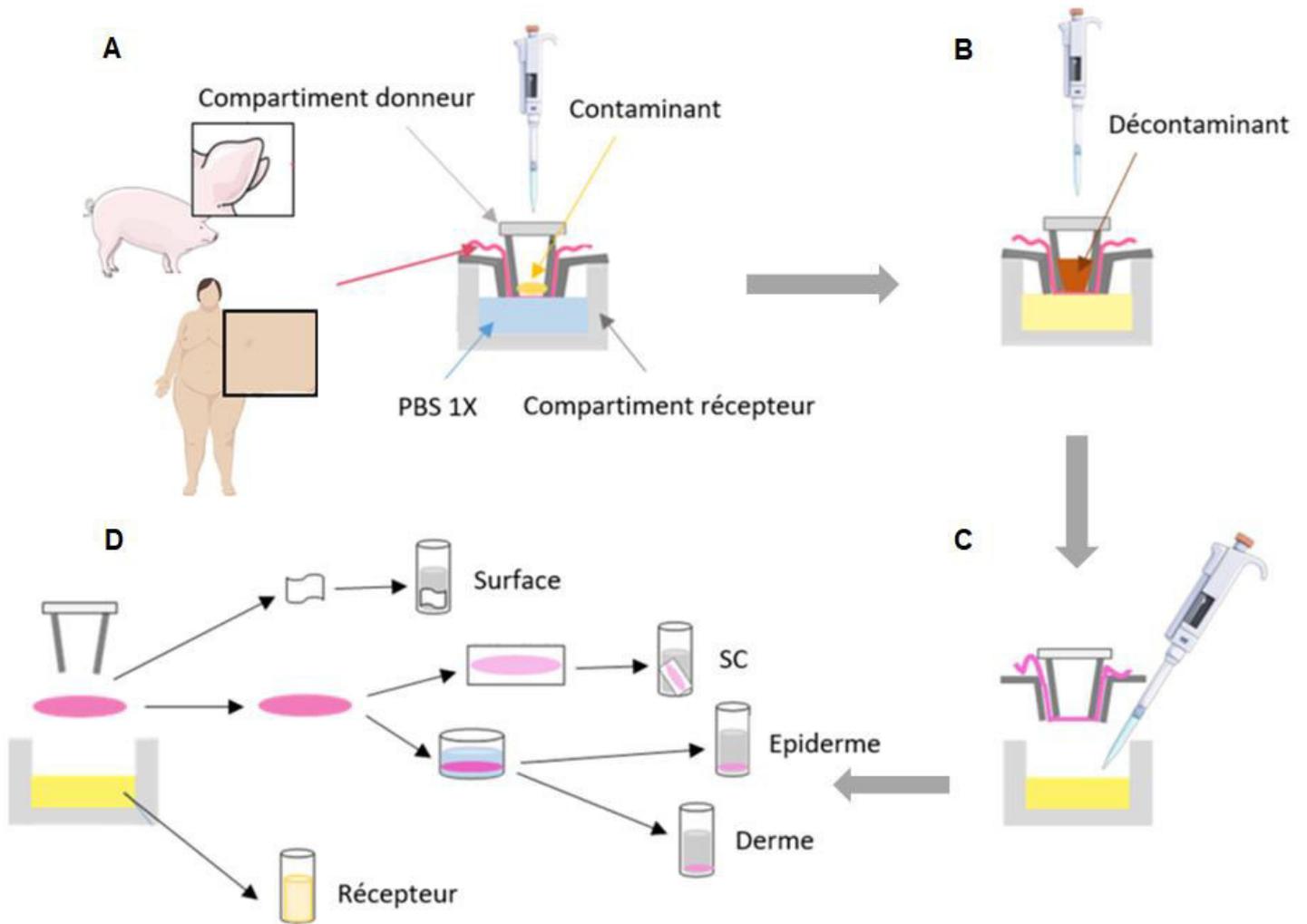
### 1.3. Discussion

Les argiles sont des composés hétérogènes formés de fines particules d'origines variées, et de particules de taille micrométrique. La toxicité des surnageants des suspensions filtrées à 0,22 µm a été évaluée *in vitro* sur deux types cellulaires d'origine cutanée : des kératinocytes et des fibroblastes. Les kératinocytes composent l'épiderme qui est la couche externe de la peau : les particules filtrées ne présentent pas de toxicité sur ce type cellulaire. En effet, d'après Janer et al., 2014, l'exposition de cellules cutanées malignes SK-MEL 28 à des suspensions d'argile impacte très faiblement leur viabilité. A l'inverse la viabilité des fibroblastes du derme est dépendante de la concentration des suspensions, ce qui a déjà été reporté par Sandri et al., 2014, qui ont étudié la toxicité de nanocomposites de montmorillonite sur des fibroblastes du derme. Lors d'une exposition des cellules pendant 3 heures ou 24 heures à des suspensions d'argile à une concentration de 150-300 µg/mL, une tendance à la diminution de la viabilité cellulaire est observée.

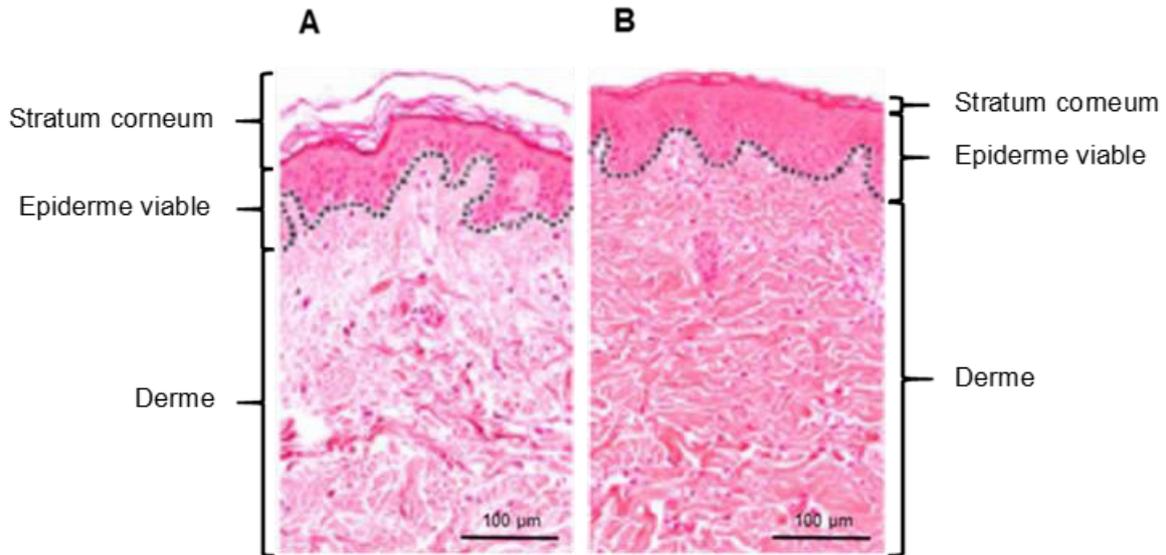
La cytotoxicité d'une argile dépend fortement de la nature de l'argile ainsi que de sa structure au-delà du modèle cellulaire sur lequel est réalisé l'étude (Maisanaba et al., 2015). Afin de déterminer la toxicité de l'ensemble des composants de la terre de foulon, des études *in vivo* sur des embryons de *Danio rerio* ont été faites. Ce modèle est utilisé car il s'agit d'un modèle *in vivo* qui permet l'étude de la toxicité sur un système entier. De plus les poissons sont des animaux vivant naturellement dans des eaux comprenant des sédiments tels que les phyllosilicates. Les agrégats d'argile dans des suspensions de 5% à 15% n'ont pas d'effet sur la viabilité des poissons ou sur l'apparition de malformations morphologiques au cours de leur développement. La suspension de terre de foulon à 15% entraîne une diminution de la mobilité des poissons, ce qui peut être dû à l'augmentation de la viscosité du milieu plus qu'à un effet toxique propre de la terre. Bien que ce soit à notre connaissance la première étude de toxicité d'une argile sur le modèle poisson, les résultats sont en accord avec de précédentes études de toxicité *in vivo*. De par leurs propriétés adsorbantes les argiles peuvent aussi être utilisées pour la détoxification après ingestion : Abdel-Wahhab et al., 1999 et Dwyer et al., 1997 ont respectivement démontré l'absence de toxicité d'argiles après ingestion par des rats et des poulets. De façon générale, la toxicité d'une argile dépend de sa nature, et la terre de foulon fournie par NBC-Sys peut être utilisée sans effet toxique sous forme de suspensions aqueuses de 5% à 9%.

Les études de décontamination *ex vivo* ont été réalisées sur des explants de peau issue d'oreille de cochon et d'abdomen humain comme illustré **Figure 43**. Cette méthode de diffusion statique permet d'étudier la cinétique de pénétration d'un composé chimique à travers une membrane telle que la peau. A la fin de l'expérimentation il est possible de séparer les différentes couches pour en extraire le composé chimique d'intérêt et ainsi en mesurer la

concentration pour évaluer l'accumulation intra cutanée. La peau de cochon est utilisée comme substitut de la peau humaine pour les expériences de diffusion *ex vivo* mais il est nécessaire de s'assurer de la transposition des résultats entre les deux modèles pour un type de molécule donné. En effet, les peaux issues d'oreille de cochon et d'abdomen humain diffèrent dans l'épaisseur de leur SC, de la JDE et du derme. Il y a donc une différence dans le ratio épiderme/derme entre les deux types de peau car pour des explants de même épaisseur la peau humaine présente une composante épidermique plus importante (**Figure 44**) (In et al., 2019). La cinétique de pénétration d'un composé lipophile est différente car après saturation de l'épiderme, le composé va diffuser lentement à travers le derme hydrophile avant d'être retrouvé dans le compartiment récepteur : la pénétration va être ralentie pour la peau de cochon qui contient une partie dermique plus importante. L'application des méthodes de décontamination induit un changement dans la cinétique de pénétration du contaminant puisqu'un plateau apparaît entre 8 et 10 heures post-contamination (Cf figure 5A de l'article). Avec l'utilisation de la terre de foulon sous forme de poudre on observe la formation d'un compartiment réservoir dans le SC qui permet un relargage prolongé du contaminant (Cf figure 5B de l'article). Ce phénomène est dû au fait que l'argile sous forme de poudre décontamine par adsorption et que lorsque la capacité maximale d'adsorption est atteinte par la saturation des sites de fixation, un pourcentage de molécules libres du contaminant reste à la surface de la peau. Ces dernières ayant la capacité de passer à travers la barrière cutanée ne sont pas retenues. La décontamination humide à l'eau entraîne un déplacement physique du contaminant mais le risque de « wash-in effect » est important. Les suspensions aqueuses de terre de foulon présentent un pouvoir de décontamination supérieur aux précédentes méthodes puisqu'il n'y a pas la présence du compartiment réservoir dans le SC (Cf figure 6B de l'article). Lors de l'application de la suspension la décontamination va se réaliser par déplacement physique du contaminant et par son adsorption sur l'argile : l'eau découvre de nouvelles zones pour l'adsorption ce qui limite le phénomène de saturation. L'apparition de nouveaux sites d'adsorption est restreinte par les forces d'attraction et la capacité d'échange des cations de l'argile, ce qui explique que le pouvoir décontaminant ne dépende pas de la concentration en argile de la suspension.



**Figure 43 :** Réalisation des expériences de diffusion cutanée *ex vivo* : **A** = l'explant cutané d'origine porcine ou humaine est placé dans le dispositif VitroPharma® avec la face épidermique du côté du compartiment donneur, le compartiment récepteur est rempli de PBS 1X. Le contaminant est déposé à la surface cutanée ; **B** = après 30 minutes d'exposition, le protocole de décontamination est réalisé avec de l'argile en poudre, de l'eau ou de l'argile en suspension ; **C** = le liquide récepteur est collecté sous forme d'échantillons pendant 24h pour réaliser une cinétique de pénétration du contaminant, puis remplacé par du PBS 1X frais ; **D** = après 24h d'exposition le système est démonté, le contaminant à la surface cutanée est récupéré à l'aide d'un coton. Les différentes couches cutanées sont déparées : le SC par la méthode à la colle cyanoacrylate (Salerno et al., 2017), l'épiderme et le derme par immersion dans du PBS 1X chauffé à 60°C. Le contaminant est extrait de chacune de ces couches par extraction pendant 24h.



**Figure 44 :** Coloration à l'hématoxyline-éosine et observation au microscope optique de coupes de peau **A** = peau abdominale humaine, **B** = peau d'oreille porcine (barre d'échelle = 100 µm pour chaque image). Les pointillés correspondent à la démarcation entre l'épiderme et le derme : pour une même épaisseur d'explant la peau humaine présente une composante épidermique plus importante que la peau de cochon ; adapté de (In et al., 2019).

L'ensemble des études de diffusion *ex vivo* ont été réalisées sur des explants de peau d'origine porcine et humaine. L'absence de différence significative entre les deux modèles permet d'envisager la peau de cochon comme substitut peu onéreux de la peau humaine pour les études de décontamination cutanée.

Cette étude est en faveur de l'utilisation des suspensions aqueuses de terre de foulon comme nouvelle méthode pour la décontamination du POX comme simulant du VX.



## 2. Comparaison de deux phyllosilicates pour la décontamination du Paraoxon sur des explants de peau porcine

### 2.1. Introduction

A l'inverse de l'absorption où un composé pénètre au sein d'une surface absorbante, l'adsorption est un phénomène passif qui correspond à la rétention à la surface d'un solide de molécules de gaz ou d'une substance en solution ou en suspension (**Figure 42**). Cette propriété peut être portée par différents types de matériaux : des végétaux (Mnisi & Ndibewu, 2017), des textiles naturels (S. Cao et al., 2016), des nanoparticules (Ali et al., 2019) ou encore des minéraux. L'adsorption est très utilisée pour les procédés de détoxification et de décontamination : par exemple pour détoxifier les eaux de molécules chimiques néfastes (Chang et al., 2016; Tsai et al., 2016) ou pour décontaminer la peau à l'aide d'argiles lors de l'exposition à des composés chimiques néfastes (Cf partie bibliographique 3.1.3.1.) (Gitari & Mudzielwana, 2018).

L'efficacité de décontamination correspond à la capacité d'un décontaminant à diminuer la pénétration cutanée d'un contaminant grâce à son retrait de la surface cutanée. Pour la terre de foulon, cette capacité décontaminante est augmentée lorsque l'argile est formulée en suspension aqueuse (Roul et al., 2017). En effet, la dispersion des argiles dans l'eau peut entraîner leur gonflement par écartement des feuillets qui composent leur unité élémentaire (Salles et al., 2010). De nouveaux sites d'adsorption sont ainsi découverts, permettant d'augmenter l'efficacité de décontamination de l'argile. De précédentes études ont démontré que ce phénomène n'est pas dépendant de la concentration de la suspension en terre de foulon (Cf partie 1.2) car cette argile est une palygorskite (Cf **Annexe 1**). La structure en ruban de cette dernière fixe les feuillets sous forme de réseau dont la viscosité va augmenter en présence d'eau. Les propriétés de gonflement et d'adsorption d'une argile sont dépendantes de sa structure intrinsèque et de sa composition minérale : il est donc intéressant de d'étudier des argiles de différentes natures pour la décontamination cutanée d'un même composé chimique. La comparaison des pouvoirs adsorbants permettrait de définir la nature d'argile la plus à même de réaliser une décontamination efficace et les possibilités de remplacement en cas de pénurie d'un type d'argile.

Ce chapitre a pour objet l'étude d'une argile, appelée argile X, comme candidat pour la décontamination cutanée. Le nom commercial de cette argile n'est pas révélé car les résultats obtenus permettent d'envisager la rédaction d'un brevet si des expérimentations plus poussées sont réalisées. Ce nouveau composé sera évalué dans les mêmes conditions que

la terre de foulon dans le chapitre 1. La toxicité des particules nanométriques résultant de la mise en suspension sera déterminée sur les deux principales lignées cellulaires de la peau : les kératinocytes et les fibroblastes. Le modèle *Danio rerio* permettra d'évaluer la toxicité des agrégats de particules *in vivo*. Après la validation de l'absence de toxicité de l'argile X, elle sera évaluée pour la décontamination cutanée du paraoxon utilisé comme modèle d'exposition aux composés organophosphorés. La poudre et les suspensions seront testées pour déterminer le potentiel de gonflement de l'argile et son efficacité de décontamination *in vitro*. Ces résultats seront comparés à ceux précédemment obtenus pour la terre de foulon afin de proposer le meilleur dispositif de décontamination cutanée à base d'argile pour le POX comme modèle du VX.

## 2.2. Matériels et méthodes

### 2.2.1. *Matériel*

L'argile X est vendue sous forme de poudre avec des propriétés adsorbantes pour un usage ménager et épurateur.

### 2.2.2. *Etudes de toxicité*

#### 2.2.2.1. *In vitro*

Des fibroblastes normaux issus du derme humain (NHDF), utilisés entre les passages 9 et 12, sont cultivés dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10% de sérum foetal bovin et 1% de mélange pénicilline-streptomycine (5000 U/mL). Des kératinocytes primaires humains (HPK) extraits de prépuces d'enfants, utilisés entre les passages 1 et 4 sont cultivés dans un milieu ker-SFM supplémenté avec de l'extrait pituitaire de bovin, du facteur de croissance épidermique (EGF), du CaCl<sub>2</sub> et 1% de mélange pénicilline-streptomycine (5000 U/mL).

Tous les composants utilisés pour les milieux de culture ont été achetés auprès de Gibco (Thermo Fisher Scientific, USA). Les deux lignées cellulaires sont placées dans un incubateur (Heracell 150i, Thermo Scientific USA) à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. Trois suspensions d'argile X avec une concentration de 5%, 9.1% et 15% sont préparées dans du PBS 1X (Gibco, USA) puis filtrées sur des filtres à usage individuels avec des pores de 0,22 µm (Merck Millipore, USA). Les surnageants sont conservés à température ambiante avant leur utilisation. Après ensemencement des cellules sur des plaques 96 puits (Thermo Fisher Scientific, USA) à une concentration de 1 x 10<sup>4</sup> cellules/puit et un repos de 2 jours on observe la formation d'une monocouche de cellules. Les surnageants filtrés sont ajoutés à la surface des cellules pendant 30 minutes avant leur retrait et l'évaluation de la cytotoxicité à l'aide de la

méthode au MTT. L'expérience est réalisée d'après les recommandations du fournisseur du kit MTT (Sigma Aldrich, USA).

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de viabilité en fonction de la viabilité des cellules exposées seulement au milieu de culture (contrôle positif). L'analyse statistique est réalisée à l'aide d'un ANOVA à deux facteurs couplé avec un test de Dunnett.

### 2.2.2.2. In vivo

Les études *in vivo* sont réalisées sur le *Danio rerio*, autrement appelé poisson zèbre. Des lignées de poisson sauvages AB/TU sont entretenues à l'animalerie du PRECI (Plateau de Recherche Expérimentale en Criblage *In Vivo*; SFR Biosciences, UMS 3444/CNRS) maintenue à  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  avec 16 heures d'éclairage par jour.

En accord avec la ligne directrice n° 236 de l'OCDE décrivant la « ligne directrice pour les essais de produits chimiques – poisson essai de toxicité aigüe au stade embryonnaire » ce modèle est utilisé à un stade embryonnaire pour étudier l'apparition de malformations morphologiques et la viabilité au cours de 4 jours de développement. Après fertilisation, les œufs sont récoltés et sélectionnés à l'aide d'une loupe binoculaire pour ne garder que les embryons avec un développement normal entre les stades zygote et gastrula. Un embryon est déposé dans chaque puit d'une plaque 24 puits (Thermo Fisher Scientific, USA) et une condition est testée par plaque : 3,4 dichloroaniline (Sigma Alrich, USA) à  $8 \mu\text{g}/\text{mL}$  comme contrôle négatif, l'eau E3 de l'aquarium comme contrôle positif et 3 suspensions d'argile X dans du E3 à différentes concentrations (5%, 9.1% et 15%). Dans chaque puit 2mL de solution sont déposés et la viabilité des embryons pendant 4 jours est déterminée tous les jours à l'aide d'un microscope et de critères toxicologiques (coagulation de l'embryon, absence de battement cardiaque, absence de détachement de la queue ou absence de l'apparition des somites). A la fin de l'expérience la mobilité des poissons vivants est étudiée avec une ZebraBox équipée du logiciel zebraLab (Viewpoint Behaviour Technology, France) lors d'une exposition de 5 minutes à la lumière suivie de 3 minutes d'exposition au noir.

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de viabilité des embryons, en présence ou non de malformations morphologiques et de distance moyenne parcourue lors de l'utilisation de la zebraBox. Les résultats sont comparés statistiquement au contrôle positif à l'aide d'un ANOVA à deux facteurs couplé avec un test de Dunnett.

### 2.2.3. Etudes de diffusion cutanée ex vivo

Le dispositif VitroPharma® enregistré sous le brevet n° WO2013057401 a été utilisé comme cellule de diffusion statique miniature. La peau dermatomée à  $500 \mu\text{m}$  d'épaisseur est placée dans le système présentant une surface de diffusion de  $0,71 \text{ cm}^2$ . L'épiderme est du côté du compartiment donneur tandis que le derme est au contact du PBS 1X (Gibco, USA) qui remplit le compartiment récepteur (5 mL). En accord avec la ligne directrice 428 de l'OCDE

« Absorption cutanée : méthodes *in vitro* » (Cf **Annexe 2**) le milieu récepteur est maintenu sous agitation à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ce qui permet à la peau d'être à  $32^{\circ}\text{C}$ , c'est-à-dire la température physiologique moyenne à la surface cutanée.

#### 2.2.3.1. Explants cutanés

Des oreilles de cochon congelées (Proviskin, France) sont obtenues à l'abattoir puis lavées et rasées avant d'être dermatomées (Dermatome modèle Aesculap GA 630) à une épaisseur de  $500\ \mu\text{m}$ . Afin de pouvoir être utilisés dans le dispositif VitroPharma®, des disques de  $2\ \text{cm}^2$  sont découpés. Avant chaque expérience, l'épaisseur des explants est contrôlée avec un pied à coulisse pour s'assurer d'une épaisseur homogène ( $500\ \mu\text{m} \pm 50\ \mu\text{m}$ ) et l'intégrité de la peau est contrôlée visuellement.

#### 2.2.3.2. Protocoles de décontamination

En accord avec la norme NF X52-122 « Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine » les peaux contaminées sont obtenues par le dépôt de  $10\ \mu\text{L}/\text{cm}^2$  de chimique. La décontamination est réalisée 30 minutes après le dépôt de  $7,1\ \mu\text{L}$  de Paraoxon-diéthyl POX (Sigma Aldrich, USA) :  $0,16\ \text{g}/\text{cm}^2$  d'argile X sont utilisés pour la décontamination sèche. La décontamination humide est réalisée à l'aide d'eau OTec® (Aguettant, France) ou de suspensions aqueuses d'argile X à 5%, 9.1% et 15% dans de l'OTec®. Pour ces deux moyens de décontamination,  $102\ \mu\text{L}/\text{cm}^2$  de liquides sont déposés sur la peau. Le décontaminant est laissée sur la peau pendant 2 minutes avant son retrait puis la peau est séchée par tapotement avec une gaze de coton.

#### 2.2.3.3. Echantillons

Afin de déterminer la cinétique de pénétration du contaminant,  $500\ \mu\text{L}$  du liquide récepteur sont collectés à différents temps (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, et 24h) et remplacés par  $500\ \mu\text{L}$  de PBS 1X. A la fin de la période d'exposition de 24h, la cellule de diffusion est démontée pour libérer la peau et la surface est délicatement essuyée avec un coton adsorbant pour déterminer la quantité de produit restant à la surface de la peau. Les couches cutanées sont séparées selon différentes méthodes : le SC avec la méthode à la colle cyanoacrylate (Salerno et al., 2017), l'épiderme et le derme par immersion dans du PBS 1X chauffé à  $60^{\circ}\text{C}$ . Chaque échantillon est déposé dans de l'éthanol de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) pour extraire le POX pendant 24h avant le stockage au congélateur  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'analyse HPLC-UV.

#### 2.2.3.4. Quantification par HPLC-UV

La concentration en POX est déterminée par chromatographie liquide à haute pression couplée avec un détecteur UV (HPLC 1260 Infinity II LC Systems, Agilent Technologies, USA). La phase mobile isocratique est composée de 52,25% de méthanol de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) ; 42,75% d'eau milliQ (qualité ultrapure avec  $r=18\ \text{m}\Omega/\text{cm}$ ) ; 5% d'acide acétique

glacial de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) ; le tout à un débit de 0,7 mL/min. 10µL de l'échantillon sont prélevés et amenés à la colonne de rétention Clipeus C18 (5µm, 100x40 mm) chauffée à 40°C. Le composé est détecté à une longueur d'onde de 269 nm avec un temps de rétention de 5,9 minutes.

#### 2.2.4. Evaluation ex vivo d'un décontaminant

Il est nécessaire d'avoir des outils pour évaluer et comparer les différentes méthodes de décontamination entre elles, sur des données préliminaires obtenues *ex vivo*.

##### 2.2.4.1. Efficacité de décontamination (ED) *ex vivo*

Elle est décrite par une équation et permet de comparer les méthodes de décontamination *ex vivo* :

$$ED (\%) = \frac{(Q3T + Q4T) - (Q3 + Q4)}{Q3T + Q4T} \times 100$$

Avec Q3 = quantité de contaminant dans les couches cutanées à la fin de l'exposition (SC + épiderme + derme) ; Q4 = quantité de contaminant dans le récepteur à la fin de l'exposition ; T = contrôle donc absence de décontamination

##### 2.2.4.2. Amélioration du pronostic fonctionnel

D'après la norme NF X52-122, la décontamination cutanée a un impact sur le pronostic fonctionnel d'une personne car elle permet de retirer le contaminant de la surface cutanée. L'amélioration du pronostic fonctionnel (PF) est calculée suivant l'équation suivante :

$$PF = \frac{Q2T + Q3T + Q4T}{Q2 + Q3 + Q4}$$

Avec Q2= quantité de contaminant présent à la surface cutanée après la décontamination ; Q3, Q4 et T identiques à la description dans le paragraphe 2.2.4.1.

#### 2.2.5. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide de la version 7.0 du logiciel GraphPad Prism (San Diego, USA). Toutes les données sont représentées par les moyennes ± les écarts types où n=4 pour la cytotoxicité, n=2 pour la toxicité *in vivo* et n=6 pour les études de diffusion *ex vivo*. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un ANOVA à 1 facteur suivi par des tests de comparaison, comme mentionné pour chaque observation.

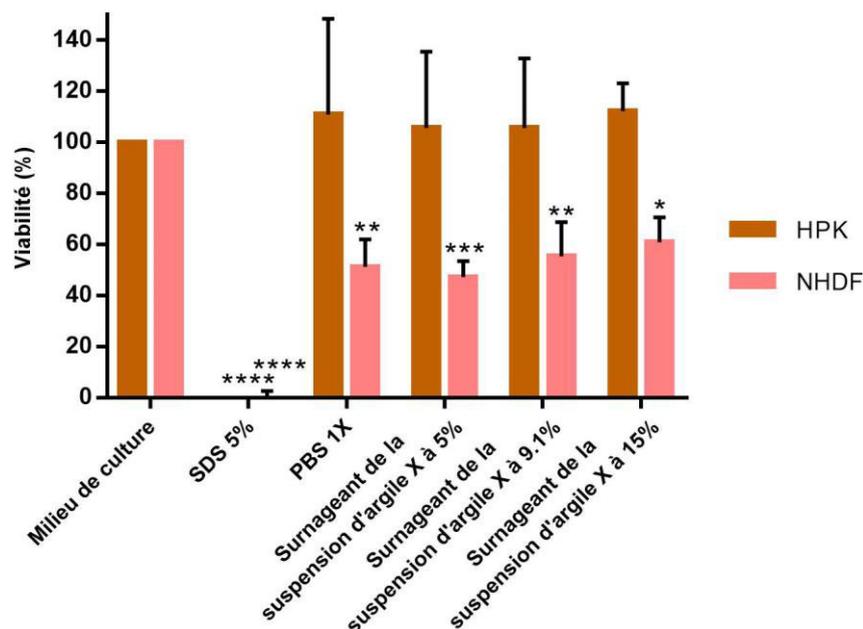
## 2.3. Résultats

### 2.3.1. Etudes de toxicité

Les argiles sont des composés très hétérogènes, formés par des particules de taille nanométrique à micrométrique. La structure et la composition de l'argile X ne sont pas connues, il est donc nécessaire d'évaluer la toxicité des différentes entités avec diverses méthodes. La toxicité des fines particules avec une taille inférieure à 0,22 µm est évaluée sur les deux types cellulaires majoritairement retrouvés dans la peau. La toxicité des grosses particules en suspension est déterminée *in vivo* sur des embryons de *Danio rerio* d'après la ligne directrice 236 de l'OCDE afin de détecter de potentiels effets secondaires dus aux agrégats d'argile.

#### 2.3.1.1. Toxicité des fines particules *in vitro*

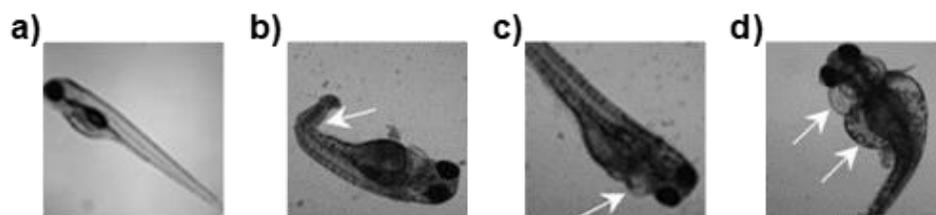
La toxicité des particules avec une taille inférieure à 0,22 µm est évaluée sur deux lignées cellulaires issues de la peau humaine : les kératinocytes (HPK) et les fibroblastes (NHDF). La filtration à 0,22 µm a un double objectif : l'étude de la toxicité des fines particules contenues dans l'argile et l'obtention d'un filtrat stérile compatible avec la culture cellulaire. Les tests de viabilité sont réalisés 30 minutes après le dépôt des suspensions filtrées. Les kératinocytes de l'épiderme sont les premiers en contact avec un élément étranger déposé sur la peau. Indépendamment de la concentration des suspensions, aucune toxicité des surnageants n'est observée sur ce type cellulaire. Les fibroblastes dermiques ne sont pas directement exposés aux agressions par les éléments extérieurs, sauf lorsque la peau est lésée. Les surnageants des suspensions d'argile X ont un effet significatif sur la viabilité des fibroblastes. La toxicité n'est pas imputable aux particules d'argile elles même, mais au PBS 1X qui sert de véhicule. En effet, il possède une toxicité significative sur les fibroblastes et il n'y a pas de différence significative de la viabilité des cellules lorsqu'elles sont exposées au PBS 1X seul ou sous forme de surnageant des suspensions (**Figure 45**).



**Figure 45:** Toxicité *in vitro* des surnageants de suspension d'argile X réalisées dans du PBS 1X et passées sur des filtres à 0,22 µm : évaluation de des kératinocytes humains primaires (HPK) et des fibroblastes normaux dermiques humains (NHDF) (n=4). Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Dunnett en utilisant le milieu de culture (DMEM) comme contrôle. Les valeurs sont représentées par la moyenne ± l'écart type. \*: p<0,05 ; \*\* : p<0,01 ; \*\*\* : p<0,005 ; \*\*\*\* : p<0,0001.

### 2.3.1.2. Toxicité des suspensions *in vivo*

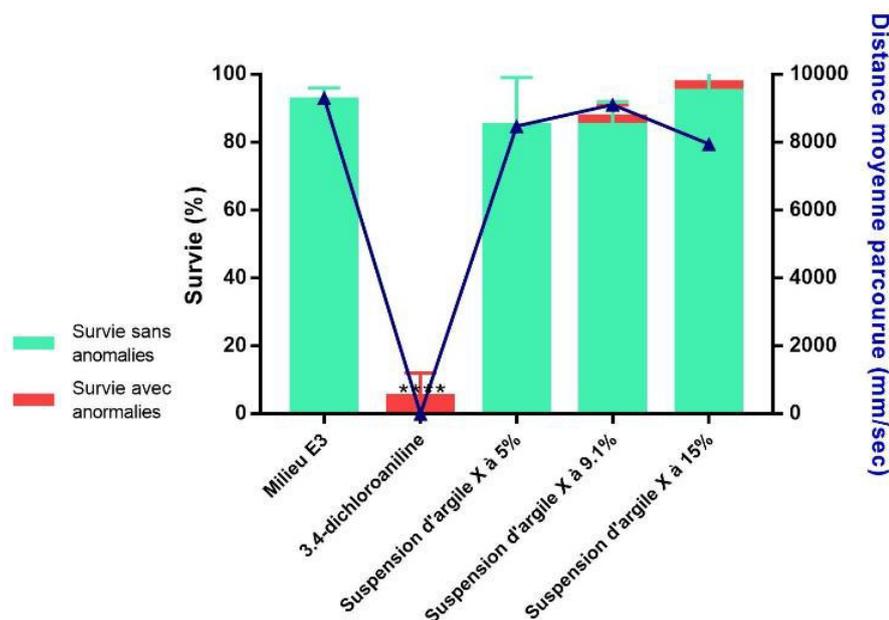
La toxicité de l'ensemble des particules constituant l'argile X est déterminée sur des embryons de *Danio rerio* immergés pendant 4 jours dans des suspensions aqueuses d'argile X à 5%, 9,1% et 15%. Comme précédemment décrit dans la partie 2.2.2.2. de la section matériels et méthodes, leur viabilité et l'apparition d'anomalies morphologiques (**Figure 46**) sont suivies par observations microscopiques.



**Figure 46:** Observations au microscope de la morphologie de *Danio rerio* à 4 jours a) développement normal ; b) queue courbée ; c) œdème péricardique ; d) gonflement.

Les suspensions d'argile X n'ont pas d'effet significatif sur la survie des poissons immergés pendant 4 jours, quelle que soit la concentration des particules. De plus l'augmentation de la concentration en argile X n'induit pas significativement l'apparition d'anomalies morphologiques lors du développement des embryons. L'analyse de la distance parcourue en

réponse à un stimulus lumineux après 4 jours d'immersion dans les suspensions d'argile X ne démontre aucun impact de la quantité d'argile sur la mobilité des poissons. (**Figure 47**)



**Figure 47:** Taux de survie des *Danio rerio* avec l'apparition ou non d'anomalies morphologiques et distance moyenne parcourue suite à un stimulus lumineux après 4 jours d'immersion dans l'eau de l'aquarium (milieu E3), le contrôle négatif (3,4-dichloroaniline à 8 µg/mL), et trois suspensions d'argile X dans le milieu E3 à des concentrations de 5%, 9,1% et 15%. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Dunnett en utilisant le milieu E3 comme contrôle. Les valeurs sont représentées par la moyenne ± l'écart type.

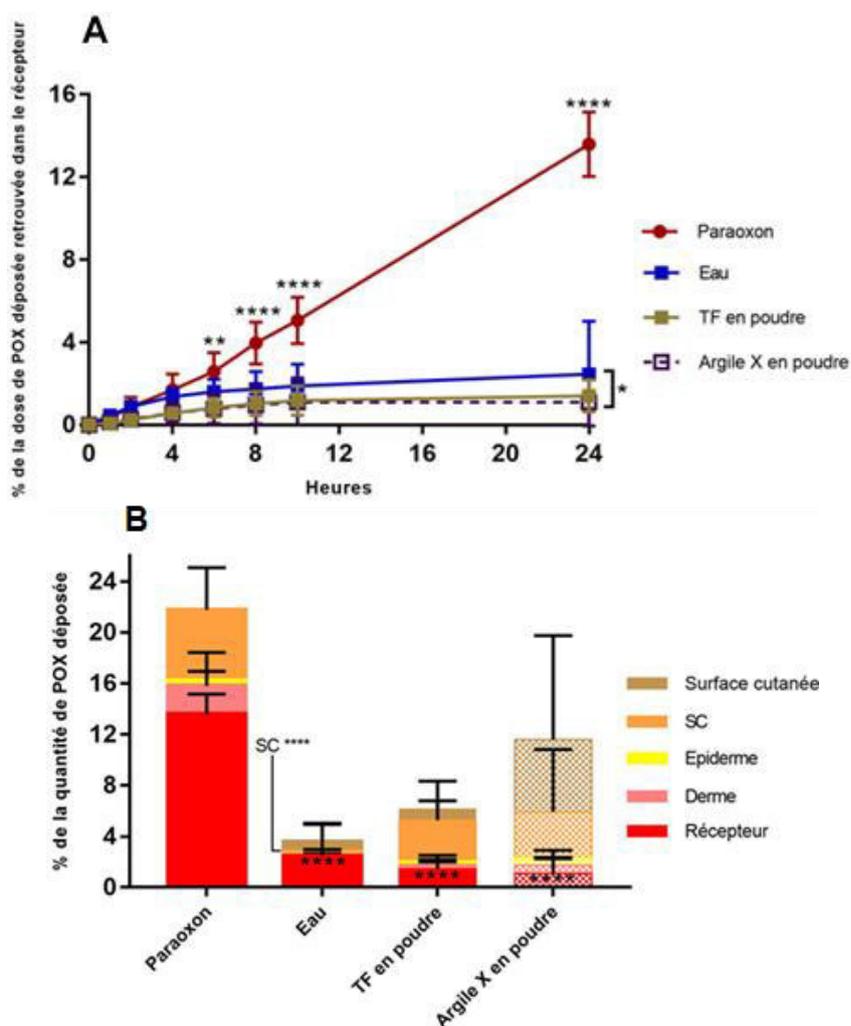
### 2.3.2. Essais *ex vivo* de décontamination cutanée

La terre de foulon est utilisée sous forme de poudre pour la décontamination cutanée aux chimiques de guerre. L'article présenté en 1.2 démontre que son efficacité de décontamination peut être augmentée par sa formulation en suspension aqueuse. L'argile X va donc être évaluée en tant que candidat pour la décontamination, et comparée à la terre de foulon (TF) en utilisant les mêmes protocoles et critères.

#### 2.3.2.1. Décontamination avec les argiles sous forme de poudre

La décontamination *ex vivo* des oreilles de cochon 30 minutes après l'exposition au POX est efficace avec les 2 argiles sous forme de poudre, ainsi qu'avec l'eau. En effet, la cinétique de pénétration du contaminant seul est linéaire au cours des 24h d'exposition tandis qu'avec la mise en place de la décontamination, on observe une diminution significative de la quantité de POX dans le compartiment récepteur à partir de 6 heures d'exposition (**Figure 48 A**). Les différentes méthodes de décontamination induisent l'apparition d'un plateau dans la cinétique de pénétration ce qui signifie qu'il n'y a plus de contaminant qui pénètre à travers la peau. L'argile X sous forme de poudre est significativement plus efficace que l'eau lorsqu'on compare

la quantité de contaminant dans le compartiment récepteur après 24 heures d'exposition. Ces observations sont complétées par la quantification du POX dans chaque couche cutanée à la fin de l'expérience (**Figure 48 B**). La décontamination humide permet de réduire significativement l'accumulation de contaminant dans le SC contrairement aux 2 argiles sous forme de poudre (**Tableau 17**).



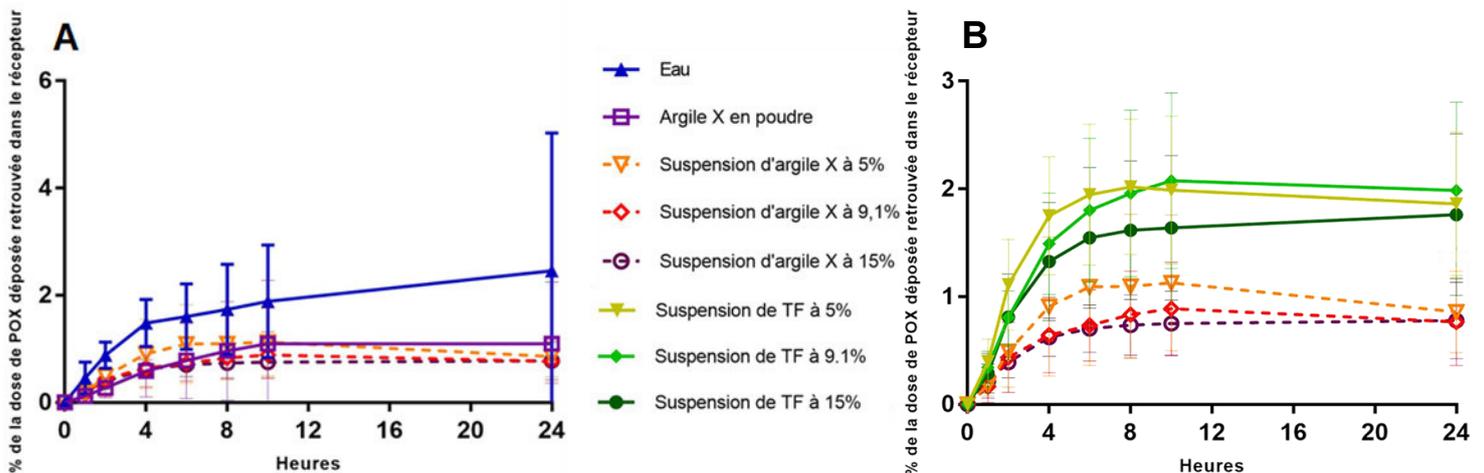
**Figure 48 :** Pénétration ex vivo du POX à travers une peau de cochon pendant 24h, sans décontamination et avec une décontamination à l'eau ou avec des argiles en poudre après 30 minutes d'exposition. **A** = Cinétique de pénétration du POX à travers la peau pendant 24h (n=6). Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Tuckey. **B** = Quantification du POX dans les compartiments de la cellule de diffusion et les couches cutanées après 24h de diffusion (n=6). La quantité retrouvée à la surface cutanée pour le POX dans décontamination a volontairement été retirée pour faciliter la lecture du graphique. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 1 facteur complété par un test de Dunnett en utilisant le POX sans décontamination comme contrôle. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

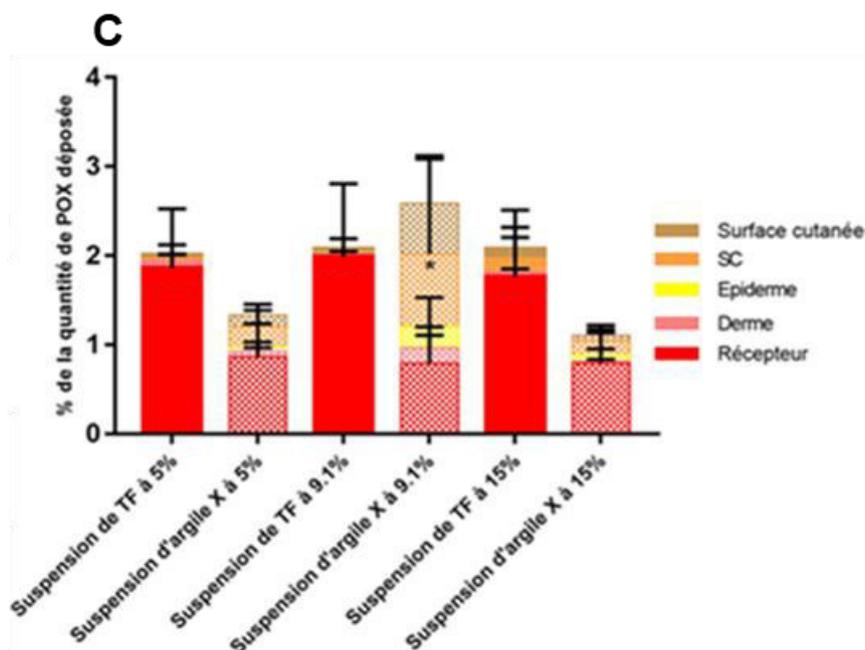
Compartiment	Paraoxon	Eau	TF en poudre	Argile X en poudre
Surface cutanée	69,84% ± 8,41%	0,78% ± 0,37%****	0,89% ± 0,32%****	5,64% ± 4,09%****
SC	5,55% ± 1,66	0,21% ± 0,09%****	3,18% ± 1,53%	4,11% ± 2,39%
Récepteur	13,59% ± 0,78%	2,45% ± 1,29%****	1,43% ± 0,37%****	1,10% ± 0,58%****

**Tableau 17 :** Pourcentage de la dose de paraoxon déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé à la surface cutanée, dans le stratum corneum et dans le compartiment récepteur en fonction de la méthode de décontamination. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Dunnett en utilisant le POX sans décontamination comme contrôle. Les valeurs sont représentées par la moyenne ± l'écart type. \*\*\*\* : p<0,0001.

### 2.3.2.2. Décontamination avec les argiles sous forme de suspensions aqueuses

L'utilisation de suspensions aqueuses de terre de foulon a déjà démontré une meilleure efficacité de décontamination cutanée que l'argile sous forme de poudre ou que l'eau (Cf partie 1 des résultats). En effet, elles permettent d'obtenir un profil de pénétration du POX en plateau à partir de 8 à 10 heures et une disparition du compartiment réservoir dans le SC, ce qui démontre une décontamination efficace. Les suspensions d'argile X sont plus efficaces que les suspensions de terre de foulon (**Figure 49 B**). La variation de la concentration en argile des suspensions n'a pas d'effet sur la quantité de contaminant retrouvée dans le compartiment récepteur, seule la nature de l'argile a une influence (**Tableau 18**). De plus grâce à la quantification du contaminant dans les couches cutanées, on observe la disparition du compartiment réservoir dans le SC avec l'usage des suspensions (**Figure 49 C**). La décontamination avec la suspension d'argile X à 9,1% induit tout de même une accumulation significative dans le SC : ce résultat est dû à une valeur exceptionnellement élevée dans le groupe (n=6). L'usage des suspensions d'argile X par rapport aux suspensions de terre de foulon permet donc de diminuer la quantité de contaminant dans le compartiment récepteur, sans avoir d'effet sur la quantité retrouvée au sein des couches cutanées.





**Figure 49** : Pénétration ex vivo du POX à travers une peau de cochon pendant 24h avec une décontamination sèche sous forme de poudre ou humide avec de l'eau et des suspensions d'argile X (5%, 9,1% et 15%) 30 minutes après l'exposition. **A**= Cinétique de pénétration du POX à travers la peau avec des méthodes de décontamination classiques (n=6) ; **B** = Cinétique de pénétration du POX à travers la peau pendant 24h (n=6) ; **C** = Quantification du POX dans les compartiments de la cellule de diffusion et les couches cutanées après 24h de diffusion (n=6). Les récepteurs des suspensions de terre de foulon sont comparés aux récepteurs des suspensions d'argile X à la même concentration. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 1 facteur complété par un test de Tuckey. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

Compartiment	TF à 5%	TF à 9,1%	TF à 15%	Argile X à 5%	Argile X à 9.1%	Argile X à 15%
SC	0,02% $\pm$ 0,03%	0,00% $\pm$ 0,00%	0,16% $\pm$ 0,12%	0,22% $\pm$ 0,09%	0,82% $\pm$ 0,53%****	0,16% $\pm$ 0,09%
Récepteur	1,86% $\pm$ 0,33%	1,99% $\pm$ 0,41%	1,76% $\pm$ 0,37%	0,86% $\pm$ 0,19%	0,79% $\pm$ 0,21%	0,79% $\pm$ 0,19%

**Tableau 18** : Pourcentage de la dose de paraoxon déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé dans le compartiment récepteur et le SC en fonction de la nature de l'argile et de la concentration de la suspension utilisée pour la décontamination. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Tuckey en comparant les deux types d'argiles pour une concentration de suspension donnée. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### 2.3.3. Evaluation des méthodes de décontamination

Les deux argiles et leurs différentes formulations sont évaluées comme méthode de décontamination face au POX comme simulant du VX sur de la peau de cochon (**Tableau 19**). L'efficacité de décontamination *in vitro* est plus faible lorsque les argiles sont utilisées sous forme de poudre. Lors de la décontamination humide avec les suspensions de terre de foulon, l'efficacité de décontamination *in vitro* est homogène quelle que soit la concentration des suspensions. A l'inverse l'argile X sous forme de suspension à 9,1 % présente une efficacité de décontamination inférieure aux concentrations à 5% et 15%. Comme précisé dans la partie

2.3.2.2. cet effet est dû à l'obtention d'une valeur exceptionnellement élevée pour la concentration en contaminant dans le SC lors d'une expérience. Si on ne tient pas compte de cette suspension, l'efficacité de décontamination *in vitro* avec l'argile X est 1,04 à 1,05 fois plus importante par rapport à des formulations à base de terre de foulon pour des suspensions à 5% et 15%, ce qui n'est pas significatif. La valeur ajoutée de la mise en suspension de la terre est mise en évidence par l'augmentation de l'efficacité de décontamination de la terre sous forme de poudre d'un facteur 1,2 pour la terre de foulon et 1,3 pour l'argile X. Les propriétés de décontamination de cette dernière semblent être très fortement impactées par sa mise en suspension aqueuse. Cette observation est renforcée par le calcul du facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel qui correspond à la capacité du décontaminant à capturer le contaminant à la surface de la peau (Cf partie 2.2.4.1. pour le calcul). En effet, ce facteur est augmenté de façon significative lorsque la décontamination est assurée par les suspensions de terre de foulon par rapport à l'usage de la poudre. L'argile et l'eau agissent de façon synergique, indépendamment de la concentration en argile des suspensions, pour augmenter le facteur d'amélioration du pronostic. Cette augmentation est plus marquée avec l'usage de l'argile X : en effet, en plus d'avoir des valeurs 1,52 (5%) à 1,87 (15%) fois plus importantes, un effet de la concentration en argile est observé. Les phénomènes physiques impliqués dans l'adsorption du contaminant semblent donc être différents entre les 2 argiles.

Méthode de décontamination	Terre de Foulon			Argile X		
	Efficacité de décontamination <i>in vitro</i> %	Facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel	% de la dose de POX déposée retrouvée dans le SC	Efficacité de décontamination <i>in vitro</i> %	Facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel	% de la dose de POX déposée retrouvée dans le SC
Argile en poudre	76.04	14.92	3.18 ± 1.53	70.73	7.6	4.11 ± 2.39
Eau	87.24	25.60	0.21 ± 0.09	87.24	25.6	0.21 ± 0.32
Suspension à 5%	91.12	45.70	0.02 ± 0.03	94.56	69.58	0.22 ± 0.09
Suspension à 9,1%	90.84	44.31	0.0 ± 0.0	90.83	35.55	0.82 ± 0.53
Suspension à 15%	91.10	44.26	0.16 ± 0.12	95.23	82.87	0.16 ± 0.09

**Tableau 19 :** Evaluation de la terre de foulon et de l'argile X comme argiles pour la décontamination, d'après l'efficacité de décontamination *in vitro*, le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel et le pourcentage de POX retrouvé dans le SC après 24h d'exposition.

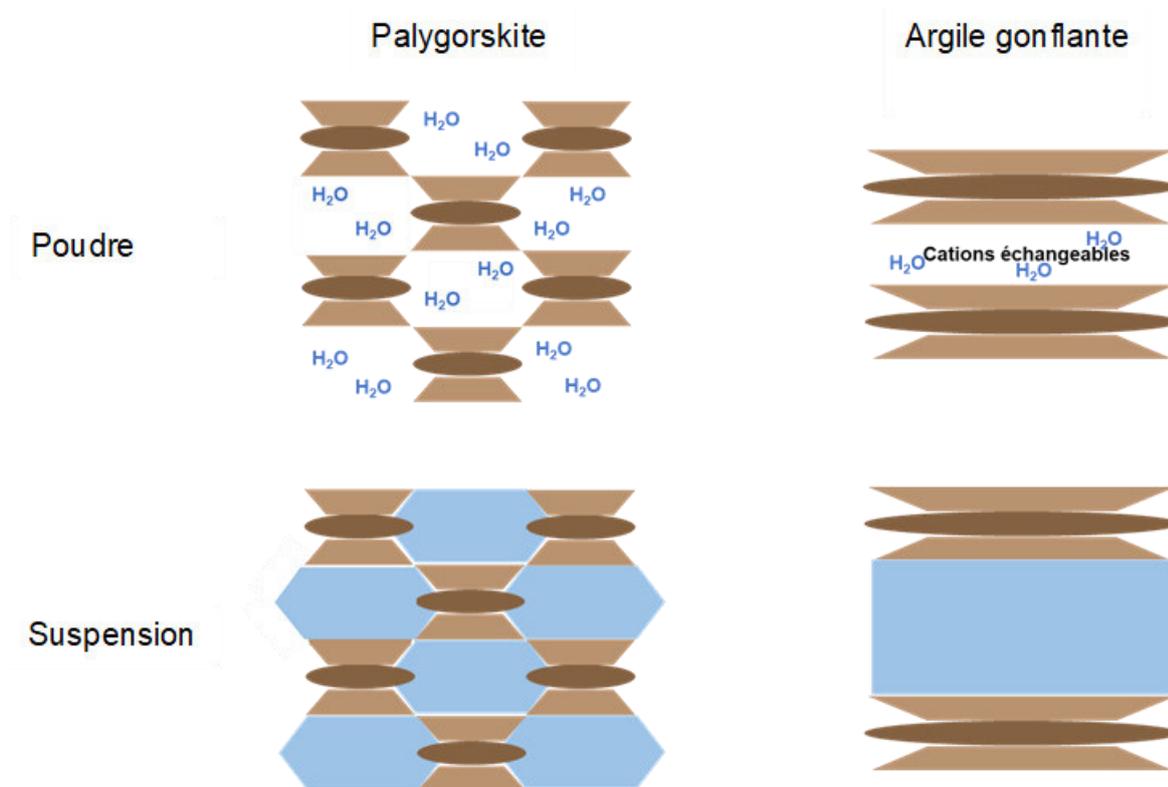
## 2.4. Discussion

L'argile X est présentée sous forme de poudre dont l'utilisation ménagère est recommandée en raison de ses grandes propriétés d'adsorption. Sa toxicité pour un usage cutané n'est pas documentée puisque c'est un nouveau domaine d'application de cette argile. L'analyse de la cytotoxicité sur des cellules de la peau est réalisée avec les surnageants de suspensions filtrées à 0,22  $\mu\text{m}$ . Les kératinocytes sont les cellules majoritairement retrouvées dans l'épiderme qui constitue la couche externe cutanée : aucune toxicité n'est observée sur ce type cellulaire. A l'inverse, la viabilité des fibroblastes du derme est significativement impactée par l'utilisation des suspensions et du PBS 1X. Ces résultats sont en accord avec les observations précédentes faites lors des études de cytotoxicité de la terre de foulon (Cf partie 1.2.) et les études de Han et al., 2011 et Sandri et al., 2014 qui démontrent une absence de toxicité des particules d'argiles sur les kératinocytes et une toxicité dépendant de la concentration sur les fibroblastes du derme. L'étude de la toxicité *in vivo* des suspensions d'argile X sur le modèle *Danio rerio* ne révèle aucune toxicité. De plus l'exposition des embryons à l'argile n'entraîne pas la formation d'anomalies morphologiques au cours du développement et n'a pas d'impact sur la mobilité des poissons. L'argile X, tout comme la terre de foulon, formulée en suspensions aqueuses de 5 à 15% ne présente pas de toxicité, ce qui permet d'envisager son usage pour des protocoles de décontamination cutanée.

La décontamination avec les deux types d'argiles sous forme de poudre induit le même profil de pénétration du contaminant à travers la peau et la quantification dans les couches cutanées est similaire. Les poudres ne permettent pas de faire disparaître, ou du moins de significativement diminuer, le réservoir de contaminant formé dans le SC. De plus, bien que la quantité de contaminant présent dans le compartiment récepteur soit semblable dans les deux cas, l'argile X sous forme de poudre présente une moins bonne capacité d'adsorption que la terre de foulon car après son application une plus grande quantité de contaminant reste à la surface cutanée. La terre de foulon fournie par NBC-Sys a été caractérisée comme étant une palygorskite (Cf **Annexe 1**). Cette argile fibreuse avec la forme d'un ruban présente une structure rigide qui comprend des canaux (Galan, 1996) dans lesquels le POX peut facilement se fixer. La plus faible capacité d'adsorption de l'argile X sous forme de poudre résulte de sa structure qui doit être en feuillets « fermés » où les sites d'adsorption sont seulement disponibles à la surface et sur les bords des couches (Jlassi et al., 2018).

L'utilisation des suspensions d'argile X entraîne des résultats significativement différents de ceux obtenus avec les suspensions de terre de foulon (**Figure 49**). En effet, les suspensions d'argile X vont diminuer le passage transcutané du contaminant sans effet de la concentration des suspensions (**Tableau 18**). L'accumulation de POX dans les couches cutanées va elle aussi être diminuée : l'augmentation de la concentration en argile X va s'accompagner d'une diminution de l'accumulation du contaminant ce qui induit une augmentation du facteur

d'amélioration du pronostic fonctionnel. Les argiles fibreuses telle que la palygorskite ne gonflent pas en présence d'eau (Chemeda et al., 2014) mais leur viscosité augmente. Cette propriété est illustrée par l'augmentation du pouvoir décontaminant des suspensions de terre de foulon et par l'absence de relation avec la concentration en terre. A l'inverse les argiles sous forme de feuillets ont une grande capacité d'adsorption de l'eau (Jlassi et al., 2018). Leur gonflement va se traduire par l'augmentation de la distance entre les feuillets et entre les particules ce qui va libérer des sites spécifiques d'adsorption (**Figure 50**) (Salles et al., 2010). Cette capacité de gonflement est en lien direct avec les caractéristiques structurales des argiles telles que la composition des couches, la nature des cations interchangeables entre les couches et la densité de l'argile (Chemeda et al., 2014; Pusch, 2006). L'efficacité de décontamination d'une argile dépendra donc de sa nature.



**Figure 50** : Représentation schématique de la palygorskite et d'une argile gonflante sous forme de poudre et en suspension. . La palygorskite forme un réseau en ruban où des molécules d'eau sont retrouvées quand elle est sous forme sèche. La dispersion d'une palygorskite dans l'eau ne va pas changer sa structure intrinsèque, et les espaces vont se remplir d'eau. A l'inverse une argile sous forme de feuillets va avoir des cations échangeables hydratés entre ses feuillets lorsqu'elle est sous forme de poudre, et l'espace entre les feuillets va augmenter lors de l'ajout d'eau. Ce gonflement de l'argile dépend de la nature de l'argile et de celle des cations échangeables.

## 2.5. Conclusion

Depuis plusieurs décennies la terre de foulon sous forme de poudre est utilisée de façon empirique pour la décontamination cutanée. Il a été précédemment démontré que lors de son utilisation après une exposition au POX comme simulant du VX, l'efficacité de décontamination

de cette argile peut être augmentée par la formation de suspensions. Cependant sa structure empêche le gonflement des feuillets ce qui limite l'apparition de nouveaux sites d'adsorption. Une nouvelle argile connue pour des grandes propriétés d'adsorption a donc été évaluée comme candidat pour la décontamination cutanée. La mise en suspension de cette argile n'entraîne pas la libération de particules toxiques pour les cellules cutanées *in vitro* ou sur des poissons zèbres *in vivo*. La décontamination *ex vivo* d'explants cutanés exposés au POX est plus efficace avec des suspensions de cette nouvelle argile par rapport aux suspensions de terre de foulon (**Tableau 20**). En effet, le gonflement de la nouvelle argile testée est plus important ce qui augmente l'adsorption du contaminant. Il est donc nécessaire de caractériser la nature de cette nouvelle argile à l'aide de méthodes cristallographiques afin d'établir un corrélat de décontamination entre un contaminant donné et une famille d'argile.

	Terre de foulon	Argile X
<b>Famille de l'argile</b>	Palygorskite	Inconnue
<b>Gonflement à l'eau</b>	Non	Oui
<b>Pouvoir décontaminant</b>		
<b>Poudre</b>	++ (réservoir dans le SC)	+ (réservoir dans le SC)
<b>Suspensions</b>	+++	++++ à ++++++ (dépend de la concentration)

**Tableau 20 :** Présentation des principales différences entre la terre de foulon et l'argile X dans le cadre de la décontamination cutanée lors d'une exposition au paraoxon (les + impliquent une relation de proportionnalité entre les différents types d'argiles testés, sous forme de poudre et de suspensions).



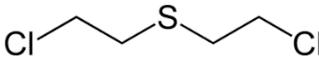
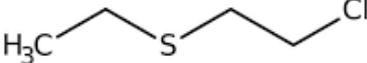
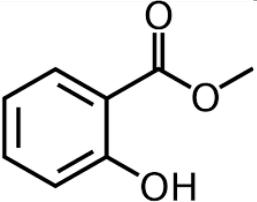
### 3. Décontamination du salicylate de méthyle avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine

#### 3.1. Introduction

L'ypérite est le premier composé chimique de guerre à être utilisé par une force militaire pour provoquer une contamination de masse. En effet, lors de la bataille d'Ypres au cours de la Première Guerre Mondiale, les militaires allemands ont déployé cet agent sur les troupes Britanniques. Bien que lors des guerres suivantes cet agent a été délaissé au profit des composés organophosphorés, de récents usages de l'ypérite ont été reportés : en 2015 et 2016 des populations civiles ont été exposées en Syrie et en Irak (Sezigen & Kenar, 2020). L'ypérite est un agent vésicant alkylant, qui agit majoritairement par voie cutanée ou respiratoire, pour entraîner la destruction des tissus. Aucun antidote n'est connu pour le moment, ce qui implique une prise en charge seulement symptomatique lors d'une contamination. Il est donc nécessaire de développer des méthodes de décontamination cutanée efficaces pour limiter la quantité de produit disponible à la surface de la peau et ainsi diminuer la diffusion percutanée du contaminant.

Pour réaliser les études de diffusion cutanée, des simulants sont appliqués sur la peau car en raison de sa toxicité, l'ypérite ne peut pas être utilisé en laboratoires conventionnels. Ces simulants doivent avoir des propriétés physiques et chimiques semblables à l'agent chimique (Bartelt-Hunt et al., 2008). La réactivité chimique de l'ypérite peut être mimée par le 2-chloroethyl ethyl sulfide (2-CEES) grâce à son groupe sulfure oxydable (Salter et al., 2011) ce qui induit une forte toxicité de ce composé. A l'inverse le salicylate de méthyle possède des propriétés physicochimiques similaires à l'ypérite et une faible toxicité (Feldman, 2010; James et al., 2019) (**Tableau 21**). Ce composé ne présente pas la même réactivité chimique que l'ypérite et peut être utilisé pour des essais de décontamination *in vivo* chez l'Homme (James et al., 2018; Matar et al., 2016; Riviere et al., 2001). Le salicylate de méthyle est donc choisi comme simulant de l'ypérite car les deux composés possèdent les mêmes capacités de pénétration transcutanée ainsi qu'une solubilité dans l'eau et une tension de surface semblables, ce qui est l'élément le plus important dans les études de décontamination cutanée (Spiandore et al., 2014).

Ce chapitre a pour objet l'étude de la pénétration cutanée du salicylate de méthyle comme simulant de l'ypérite, sur des explants cutanés issus d'oreilles de cochon. Ces études de diffusion statiques *ex vivo* permettront d'évaluer le pouvoir décontaminant de la terre de foulon en poudre et des suspensions aqueuses précédemment formulées. Le but est de déterminer si la terre de foulon peut être utilisée pour la décontamination de l'ypérite afin de limiter sa pénétration cutanée.

	Ypérite	2-CEES	Salicylate de méthyle
Structure			
Poids moléculaire (g/mol)	159,07	124,63	152,15
Log P	2,1	1,8	2,3
Solubilité dans l'eau (mg/L)	609 (25°C)		700 (20°C)
Tension de surface à 25°C (N/m)	42,5 x 10 <sup>-3</sup>		39,8 x 10 <sup>-3</sup>

**Tableau 21 :** Propriétés physicochimiques de l'ypérite et de deux de ses simulants : le 2-chloroethyl ethyl sulfide (2-CEES) et le salicylate de méthyle.

## 3.2. Matériels et méthodes

### 3.2.1. *Matériel*

La terre de foulon est vendue sous forme de poudre avec des propriétés adsorbantes pour un usage par la protection civile pour la décontamination (NBC-Sys, France).

### 3.2.2. *Etudes de diffusion cutanée ex vivo*

Le dispositif VitroPharma® enregistré sous le brevet n° WO2013057401 a été utilisé comme cellule de diffusion statique miniature. La peau dermatomée à 500 µm d'épaisseur est placée dans le système présentant une surface de diffusion de 0,71 cm<sup>2</sup>. L'épiderme est du côté du compartiment donneur tandis que le derme est au contact du PBS 1X (Gibco, USA) qui remplit le compartiment récepteur (5 mL). En accord avec la ligne directrice 428 de l'OCDE « Absorption cutanée : méthodes *in vitro* » (Cf **Annexe 2**) le milieu récepteur est maintenu sous agitation à 37°C ± 1°C ce qui permet à la peau d'être à 32°C, c'est-à-dire la température physiologique moyenne à la surface cutanée.

#### 3.2.2.1. Explants cutanés

Des oreilles de cochon congelées (Proviskin, France) sont obtenues à l'abattoir puis lavées et rasées avant d'être dermatomées (Dermatome modèle Aesculap GA 630) à une épaisseur de 500 µm. Afin de pouvoir être utilisés dans le dispositif VitroPharma®, des disques de 2 cm<sup>2</sup> sont découpés. Avant chaque expérience, l'épaisseur des explants est contrôlée avec un pied à coulisse pour s'assurer d'une épaisseur homogène (500 µm ± 50 µm) et l'intégrité de la peau est contrôlée visuellement.

### 3.2.2.2. Protocoles de décontamination

En accord avec la norme NF X52-122 « Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine » les peaux contaminées sont obtenues par le dépôt de 10  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  de chimique. La décontamination est réalisée 30 minutes après le dépôt de 7,1  $\mu\text{L}$  de Salicylate de méthyle MeS (Sigma Aldrich, USA) : 0,16  $\text{g}/\text{cm}^2$  de terre de foulon sont utilisés pour la décontamination sèche. La décontamination humide est réalisée à l'aide d'eau OTec® (Aguettant, France) ou de suspensions aqueuses de terre de foulon à 5%, 9.1% et 15% m/m dans de l'OTec®. Pour ces deux moyens de décontamination, 102  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  de liquides sont déposés sur la peau. Le décontaminant est laissée sur la peau pendant 2 minutes avant son retrait puis la peau est séchée par tapotement avec une gaze de coton.

### 3.2.2.3. Echantillons

Afin de déterminer la cinétique de pénétration du contaminant, 500  $\mu\text{L}$  du liquide récepteur sont collectés à différents temps (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, et 24h) et remplacés par 500  $\mu\text{L}$  de PBS 1X. A la fin de la période d'exposition de 24h, la cellule de diffusion est démontée pour libérer la peau et la surface est délicatement essuyée avec un coton adsorbant pour déterminer la quantité de produit restant à la surface de la peau. Les couches cutanées sont séparées selon différentes méthodes : le SC avec la méthode à la colle cyanoacrylate (Salerno et al., 2017), l'épiderme et le derme par immersion dans du PBS 1X chauffé à 60°C. Chaque échantillon est déposé dans du dichlorométhane de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) pour extraire le POX pendant 24h avant le stockage au congélateur -20°C jusqu'à l'analyse HPLC-UV.

### 3.2.2.4. Quantification par HPLC-UV

La concentration en MeS est déterminée par chromatographie liquide à haute pression couplée avec un détecteur UV (HPLC 1260 Infinity II LC Systems, Agilent Technologies, USA). La phase mobile isocratique est composée de 42% de méthanol de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) et 58% d'eau milliQ (qualité ultrapure avec  $r=18\text{ m}\Omega/\text{cm}$ ) avec 0.1% d'acide phosphorique (Sigma Aldrich, USA) ; le tout à un débit de 1,9  $\text{mL}/\text{min}$ . 10 $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont prélevés et amenés à la colonne de rétention Clipeus C18 (5 $\mu\text{m}$ , 100x40 mm) chauffée à 35°C. Le composé est détecté à une longueur d'onde de 238 nm avec un temps de rétention de 6,9 minutes.

### 3.2.3. *Evaluation ex vivo d'un décontaminant*

Il est nécessaire d'avoir des outils pour évaluer et comparer les différentes méthodes de décontamination entre elles, sur des données préliminaires obtenues *ex vivo*.

### 3.2.3.1. Efficacité de décontamination (ED) *ex vivo*

Elle est décrite par une équation et permet de comparer les méthodes de décontamination *ex vivo* :

$$ED (\%) = \frac{(Q3T + Q4T) - (Q3 + Q4)}{Q3T + Q4T} \times 100$$

Avec Q3 = quantité de contaminant dans les couches cutanées à la fin de l'exposition (SC + épiderme + derme) ; Q4 = quantité de contaminant dans le récepteur à la fin de l'exposition ; T = contrôle donc absence de décontamination

### 3.2.3.2. Amélioration du pronostic fonctionnel

D'après la norme NF X52-122, la décontamination cutanée a un impact sur le pronostic fonctionnel d'une personne car elle permet de retirer le contaminant de la surface cutanée. L'amélioration du pronostic fonctionnel (PF) est calculée suivant l'équation suivante :

$$PF = \frac{Q2T + Q3T + Q4T}{Q2 + Q3 + Q4}$$

Avec Q2= quantité de contaminant présent à la surface cutanée après la décontamination ; Q3, Q4 et T identiques à la description dans le paragraphe 3.2.3.1.

### 3.2.4. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide de la version 7.0 du logiciel GraphPad Prism (San Diego, USA). Toutes les données sont représentées par les moyennes ± les écarts types où et n=5. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un ANOVA à 1 facteur suivi par des tests de comparaison, comme mentionné pour chaque observation.

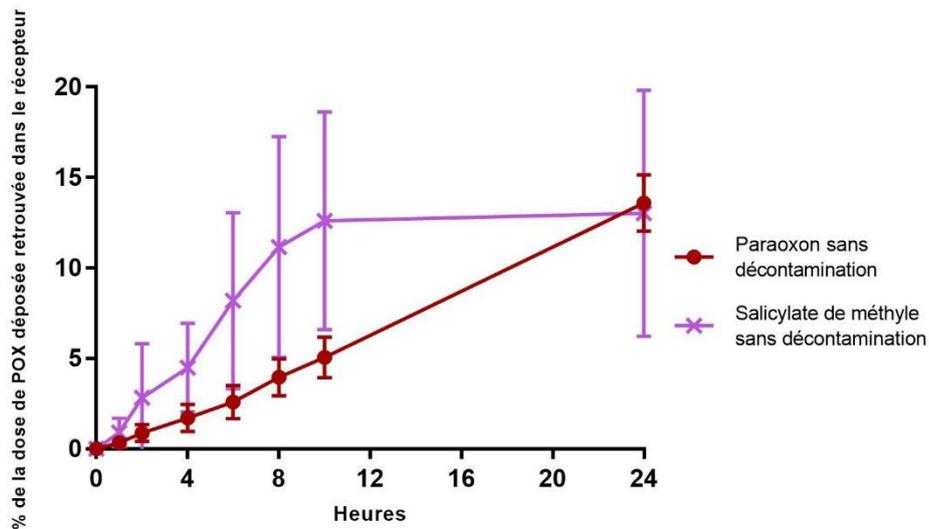
## 3.3. Résultats

La capacité de décontamination cutanée de la terre de foulon sous forme de poudre et de suspensions a été évaluée pour limiter la diffusion du salicylate de méthyle, en appliquant les mêmes protocoles qu'avec le paraoxon (Cf partie 1 des résultats).

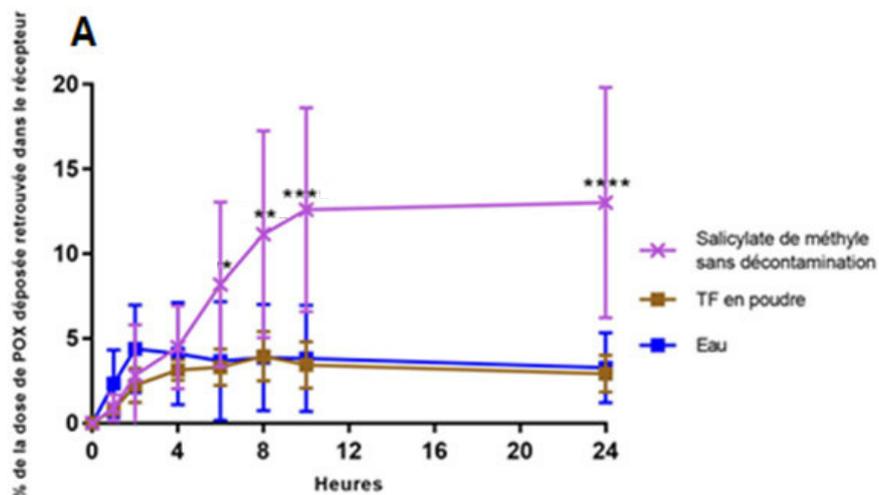
### 3.3.1. Diffusion cutanée du salicylate de méthyle et décontamination avec la terre de foulon en poudre et l'eau

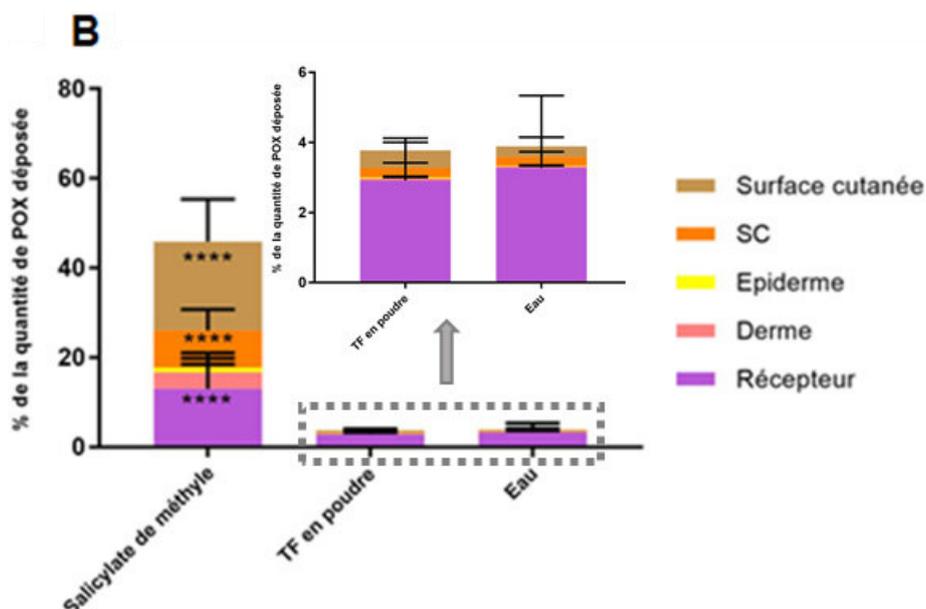
Le profil de pénétration cutanée du salicylate de méthyle pendant 24h est différent de celui observé avec le paraoxon (Cf chapitre 1 des résultats et **Figure 51**). En effet, la quantité retrouvée dans le compartiment récepteur augmente linéairement pendant 10h avant de former un plateau. Lors de l'application d'une méthode de décontamination sèche ou humide après 30 minutes d'exposition, la cinétique de pénétration du contaminant démontre elle aussi un profil en plateau (**Figure 52 A**). Ce dernier apparaît 2h après la contamination pour la décontamination à l'eau contre 4 à 6 heures lors d'une décontamination avec la terre de foulon

(TF) en poudre (**Figure 53 A**). Il y a une différence significative dans la quantité de contaminant qui diffuse à travers la peau avec et sans décontamination 4 heures après le début de l'exposition et jusqu'à la fin de l'expérience. En l'absence de décontamination, une accumulation significative de salicylate de méthyle est observée au sein du SC (**Figure 52 B**). L'application des décontaminants fait disparaître ce compartiment réservoir, de même que l'accumulation de contaminant à la surface cutanée (**Tableau 22**). Les deux méthodes de décontamination sont donc efficaces pour retirer le décontaminant de la surface cutanée et ainsi réduire son accumulation cutanée et sa diffusion.



**Figure 51** : Comparaison des profils cinétiques de la pénétration ex vivo du paraoxon (n=6) et du salicylate de méthyle (n=5) à travers une peau de cochon pendant 24h.





**Figure 52** : Pénétration *ex vivo* du salicylate de méthyle à travers une peau de cochon pendant 24h, sans décontamination et avec une décontamination à l'eau ou avec de la terre de foulon en poudre après 30 minutes d'exposition. **A** = Cinétique de pénétration du salicylate de méthyle à travers la peau pendant 24h (n=5). **B** = Quantification du méthyle salicylate dans les compartiments de la cellule de diffusion et les couches cutanées après 24h de diffusion (n=5). Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 1 facteur complété par un test de Dunnett en utilisant le salicylate de méthyle sans décontamination comme contrôle. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \*\*:  $p < 0,01$  ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

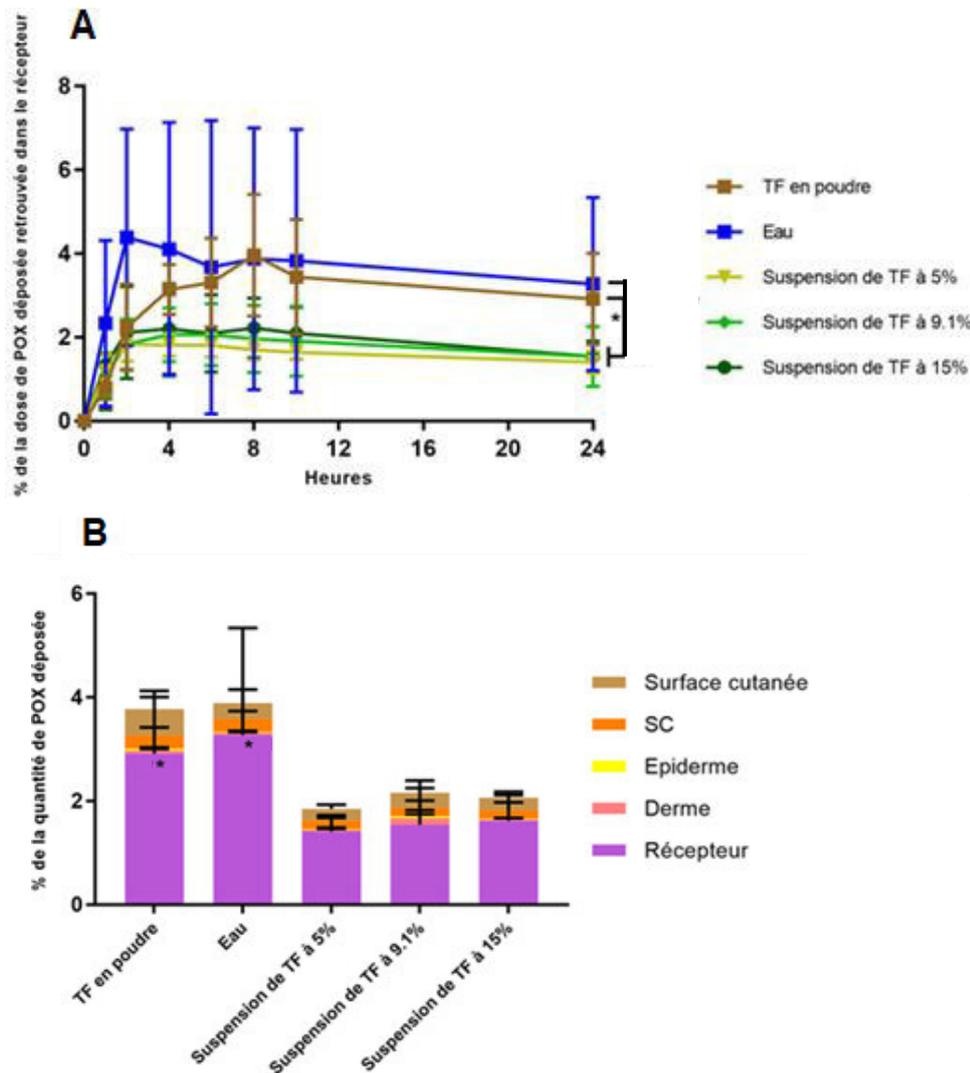
Compartiment	Pas de décontamination	TF en poudre	Eau
Surface cutanée	19,75% $\pm$ 4,76%	0,50% $\pm$ 0,18%****	0,31% $\pm$ 0,13%****
SC	8,38% $\pm$ 2,32%	0,26% $\pm$ 0,07%****	0,20% $\pm$ 0,08%****
Récepteur	13,02% $\pm$ 3,41%	2,92% $\pm$ 0,55%****	3,28% $\pm$ 1,03%****

**Tableau 22** : Pourcentage de la dose de salicylate de méthyle déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé à la surface cutanée, dans le stratum corneum et dans le compartiment récepteur, en fonction du type de décontamination. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Dunnett en utilisant le salicylate de méthyle sans décontamination comme contrôle. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

### 3.3.2. Décontamination avec les argiles sous forme de suspensions aqueuses

L'utilisation de suspensions de terre de foulon pour la décontamination cutanée permet d'obtenir un profil de pénétration du salicylate de méthyle semblable à ceux observés pour une décontamination avec l'eau ou la terre de foulon en poudre (**Figure 53 A**). A la fin de l'étude après 24h de diffusion, les suspensions de terre de foulon ont permis de diminuer significativement la quantité de contaminant retrouvée dans le compartiment récepteur par rapport aux deux autres méthodes de décontamination. Il n'y a pas de différence entre les 3 suspensions de terre de foulon ce qui permet de dire que l'adsorption du contaminant par les

suspensions n'est pas dépendante de leur concentration. L'étude de l'accumulation du salicylate de méthyle dans les couches de la peau et à la surface cutanée ne montre pas de différences significatives entre les différentes méthodes de décontamination (**Figure 53 B**). Les larges barres d'erreur représentent la forte variabilité au cours des 5 expérimentations : l'évaporation du produit rend l'interprétation des résultats compliquée et entraîne une disparité dans le pourcentage de la dose déposée retrouvé après quantification dans chacun des compartiments, autrement appelé pourcentage de la dose déposée récupéré. (**Tableau 23**).



**Figure 53** : Pénétration ex vivo du salicylate de méthyle à travers une peau de cochon pendant 24h avec une décontamination à l'eau ou avec de la terre de foulon sous forme de poudre ou de suspensions (5%, 9.1% et 15%) après 30 minutes d'exposition. **A** = Cinétique de pénétration du salicylate de méthyle à travers la peau pendant 24h (n=5). **B** = Quantification du méthyle salicylate dans les compartiments de la cellule de diffusion et les couches cutanées après 24h de diffusion (n=5). Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 1 facteur complété par un test de Tuckey. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

	Pas de décontamination	TF en poudre	Eau	Suspension de TF à 5%	Suspension de TF à 9.1%	Suspension de TF à 15%
<b>Compartiment récepteur</b>	13,02% ± 3,41%	2,92% ± 0,55%	3,28% ± 1,03%	1,41% ± 0,33%	1,54% ± 0,36%	1,62% ± 0,25%
<b>Pourcentage de la dose déposée récupéré</b>	45,87% ± 6,56%	83,85% ± 11,07%	75,47% ± 3,88%	96,11% ± 12,20%	77,12% ± 6,59%	66,86% ± 5,11%

**Tableau 23** : Pourcentage de la dose de salicylate de méthyle déposé pour la contamination cutanée après 24h de diffusion passive retrouvé dans le compartiment récepteur et au total, en fonction du type de décontamination.

### 3.3.3. Evaluation ex vivo des méthodes de décontamination

La terre de foulon sous forme de poudre et de suspensions aqueuses a été évaluée comme méthode de décontamination sur le salicylate de méthyle en tant que simulant de l'ypérite (**Tableau 24**). L'efficacité de décontamination *in vitro* de l'argile sous forme de poudre est plus faible que celle observée avec les suspensions. Il en est de même pour la décontamination humide à l'eau : l'argile et l'eau agissent donc en synergie pour la décontamination cutanée du salicylate de méthyle. La concentration en argile n'a pas d'impact sur l'efficacité de décontamination des suspensions de terre de foulon. Les résultats sont plus hétérogènes pour le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel qui prend en compte la quantité de contaminant qui reste à la surface de la peau suite à la décontamination (Cf partie 3.2.3.2. pour le calcul). La décontamination avec la terre de foulon sous forme de poudre et l'eau induisent des valeurs identiques : comme présenté dans la partie 3.3.2. des résultats, lorsqu'on compare les deux méthodes il n'y a pas de différence significative en terme de passage transcutané de la molécule ou d'accumulation dans les couches de la peau. Le facteur est en moyenne multiplié par 1,95 lorsque la décontamination est réalisée avec les suspensions de terre de foulon. Ce résultat est la traduction de la diminution significative de la quantité de salicylate de méthyle qui passe à travers la peau au cours des 24h de diffusion.

Méthode de décontamination	Salicylate de méthyle	
	Efficacité de décontamination <i>in vitro</i> %	Facteur d'amélioration du pronostic
Argile en poudre	87,49	12,16
Eau	86,47	11,93
Suspension de TF à 5%	93,76	24,72
Suspension de TF à 9,1%	93,10	21,95
Suspension de TF à 15%	92,99	22,14

**Tableau 24** : Evaluation de la terre de foulon pour la décontamination du salicylate de méthyle, d'après l'efficacité de décontamination *in vitro* et le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel après 24h d'exposition.

## 3.4. Discussion

Le salicylate de méthyle est utilisé comme simulant de l'ypérite pour les études de diffusion cutanée en raison de la similitude de leurs paramètres physicochimiques tels que le log P et la masse moléculaire, qui régissent le passage transcutané des molécules ; ainsi que la

solubilité dans l'eau et la tension de surface dont dépend l'étalement du contaminant à la surface de la peau. La cinétique de pénétration du salicylate de méthyle est linéaire pendant les 10 premières heures de diffusion avant un point d'inflexion qui se poursuit par une cinétique de pénétration moins importante. Cette observation s'accompagne du fait que seulement  $19,8\% \pm 4,8\%$  de la dose déposée est retrouvée à la surface de la peau après les 24 heures de diffusion ; et du fait que le pourcentage de la dose déposée récupéré est de seulement  $45,9\% \pm 6,6\%$ . Tout comme l'ypérite, le salicylate de méthyle possède une forte pression de vapeur (0,11 mmHg et 0,04 mmHg respectivement) ce qui fait d'eux des agents très volatils (Spiandore et al., 2014). A la fin d'une étude de pénétration il reste donc une faible quantité de la dose initialement déposée à la surface de la peau, ce qui rend l'interprétation des résultats d'efficacité de décontamination complexes (James et al., 2019). L'absorption percutanée des deux composés reste tout de même comparable puisque qu'on observe dans les deux cas une cinétique prolongée plane (Riviere et al., 2001).

Les décontaminations avec la terre de foulon sous forme de poudre et l'eau sont significativement efficaces car on observe la disparition du compartiment réservoir dans le SC et la diminution significative de la quantité de contaminant restant à la surface cutanée. La décontamination avec les suspensions d'argile est plus efficace, car comme expliqué précédemment (Cf chapitre 1 des résultats), la mise en suspension de l'argile va permettre de découvrir de nouveaux sites d'adsorption à sa surface. Ce système de décontamination agira donc par deux mécanismes : adsorption et retrait physique du contaminant.

### 3.5. Conclusion

La décontamination est une étape cruciale pour diminuer les effets secondaires et la mortalité associés à l'exposition à des chimiques de guerre. L'ypérite est un agent alkylant et vésicant qui n'a pas d'antidote connu, ce qui en fait une arme chimique redoutable. Les propriétés physicochimiques de ce produit lipophile lui permettent de passer aisément les premières couches de la barrière cutanée avant de diffuser jusqu'à la circulation systémique. Bien que cet agent soit volatil il est nécessaire d'en retirer un maximum pour limiter l'exposition et ce le plus tôt possible après l'exposition. La terre de foulon, qui est un agent décontaminant actuellement utilisé sous forme de poudre, a démontré une augmentation de son pouvoir de décontamination lors de sa formulation en suspensions aqueuses. Ces dernières ont donc été évaluées sur un simulant de l'ypérite afin de les proposer comme outil de décontamination cutanée. Les suspensions vont entraîner une amélioration de la décontamination cutanée, indépendamment de leur concentration en argile. Ce nouveau système peut donc être proposé comme outil innovant de décontamination cutanée dans la prise en charge d'une contamination à l'ypérite.



## 4. Décontamination du Paraoxon avec la terre de foulon sur des explants de peau porcine lésée

### 4.1. Introduction

De par sa nature et sa localisation, la peau exerce différentes fonctions barrières dont celle de barrière physique pour la protection contre les agressions par les éléments extérieurs (Godin & Touitou, 2007). Sa structure multicouche, et notamment l'organisation du SC, est responsable de cette fonction (Phuong & Maibach, 2016). En effet, les lipides du SC forment une structure dense avec leurs chaînes aliphatiques, pour limiter le passage trans-cellulaire de composés exogènes (Boncheva et al., 2008; Bouwstra & Ponc, 2006). L'utilisation de solvants organiques peut perturber la barrière cutanée par des phénomènes de délipidation : le laurylsulfate de sodium est utilisé dans certaines formulations cosmétiques et pharmaceutiques pour permettre une augmentation du passage transcutané d'un actif (Gattu & Maibach, 2010). La barrière cutanée peut aussi être altérée par l'utilisation d'autres produits tels que les biocides contenant des ammoniums quaternaires qui induisent la séparation de l'épiderme et du derme. Enfin la dermatite atopique et le psoriasis qui sont des maladies cutanées auto-immunes vont entraîner la formation de squames suite à une hyper prolifération du SC, et donc une altération de la barrière physique cutanée. Il en est de même pour les agressions physiques entraînant la perte d'une couche cutanée ou la formation de plaies.

L'ensemble de ces phénomènes modifient la cinétique de pénétration cutanée des composés chimiques déposés à la surface cutanée : il est donc nécessaire de développer des modèles d'études de peau lésée pour prédire ces changements. La méthode du « tape stripping » à l'aide d'une bande adhésive déposée puis retirée de la peau est la plus développée : la répétition du geste permet de retirer tour à tour des couches du SC. Cette technique est très difficile à réaliser car elle est influencée par le site anatomique, la pression appliquée sur la bande adhésive et sa durée, ainsi que la nature de l'adhésif (Schlupp et al., 2014). De plus le retrait des couches du SC n'est pas réalisé de façon homogène car le réseau élastique sous-jacent interfère avec l'action de la bande adhésive. Il faut développer une méthode reproductible et validée pour réaliser une lésion cutanée *ex vivo* afin de réaliser des études de diffusion cutanée.

Actuellement, aucune méthode de décontamination des peaux lésées n'est validée. En effet, les décontaminants ordinaires tels que la terre de foulon en poudre ou le RSDL ne peuvent pas être appliqués lorsque l'intégrité cutanée est altérée. Les recommandations préconisent la décontamination des plaies par rinçage abondant à l'eau claire (Mannis & Brandl, 2015). De nombreuses recherches sont effectuées dans ce domaine pour améliorer la prise en charge

des personnes touchées. Par exemple, le Woundstat™ est une smectite hémostatique qui a été étudiée pour la décontamination des plaies : les contaminants sont adsorbés mais il est nécessaire de réaliser une étape de lavage cruciale pour retirer tout l'agent car il peut engendrer une inflammation et des douleurs (Dalton et al., 2015a; Gerlach et al., 2010; Lydon et al., 2018; Lydon et al., 2017). Pour s'abstenir du lavage, Grives et al., 2015 ont développé des nano-émulsions huile/eau de calixarène pour la décontamination de l'uranium dans des plaies superficielles. Ce type de formulation en plus d'être non irritante permet de significativement diminuer la pénétration du contaminant à travers une peau lésée.

Les travaux décrits dans ce chapitre ont pour objet l'évaluation des suspensions de terre de foulon pour la décontamination de peaux lésées. Dans un premier temps, une lésion de type brûlure du second degré est développée sur un modèle de peau de cochon. La caractérisation et la validation de la lésion sont réalisées à l'aide de méthodes histologiques et d'étude de diffusion cutanée en comparaison à un modèle de peau sain. Enfin, le pouvoir décontaminant des suspensions est déterminé sur la peau lésée afin de proposer une méthode de décontamination utilisable sur une peau altérée. L'utilisation de ces formulations a mis en évidence une problématique sur la forme galénique qui limite le retrait total de l'argile : des études préliminaires ont donc été menées pour le développement d'un hydrogel facilitant le retrait.

## 4.2. Matériels et méthodes

### 4.2.1. *Matériel*

La terre de foulon est vendue sous forme de poudre avec des propriétés adsorbantes pour un usage par la protection civile pour la décontamination (NBC-Sys, France).

### 4.2.2. *Explants cutanés*

Des oreilles de cochon congelées (Proviskin, France) sont obtenues à l'abattoir puis lavées et rasées avant d'être dermatomées (Dermatome modèle Aesculap GA 630) à une épaisseur de 500 µm. Afin de pouvoir être utilisés dans le dispositif Vitropharma®, des disques de 2 cm<sup>2</sup> sont découpés.

#### 4.2.2.1. Réalisation de la lésion cutanée

Des plots métalliques avec une surface de 0,5 cm<sup>2</sup> sont placés dans un bain marie sec à billes DryTemp (Lab Armor, Thermo Fisher Scientific, USA) et chauffés à 60°C, 70°C et 80°C. Chaque plot est déposé au centre d'un disque cutané de 2 cm<sup>2</sup>, sous l'effet de son propre poids, pendant 20 ou 60 secondes pour créer une brûlure. Après retrait du plot, si l'épiderme se détache sous forme d'une bulle, une pince est utilisée pour le retirer.

#### 4.2.2.2. Analyse histologique de l'explant cutané

L'explant cutané avec la lésion est fixé pendant 24h dans du paraformaldéhyde 4% v/v (Electron Microscopy Sciences, USA) dilué dans du PBS 1X (Gibco, USA) avant la mise en paraffine. Des coupes de 5µm sont réalisées avec un microtome (Modèle 1212, Leica, Allemagne) et déposées sur des lames pour les étapes de déparaffinage. La coloration hématoxyline-éosine est réalisée selon la procédure standard avant l'observation au microscope (Microscope inversé Eclipse Ti-E, Nikon, Japon).

#### 4.2.3. Etudes de diffusion cutanée ex vivo

Le dispositif Vitropharma® enregistré sous le brevet n° WO2013057401 a été utilisé comme cellule de diffusion statique miniature. La peau dermatomée à 500 µm d'épaisseur est placée dans le système présentant une surface de diffusion de 0,71 cm<sup>2</sup>. L'épiderme est du côté du compartiment donneur tandis que le derme est au contact du PBS 1X (Gibco, USA) qui remplit le compartiment récepteur (5 mL). En accord avec la ligne directrice 428 de l'OCDE « Absorption cutanée : méthodes *in vitro* » (Cf **Annexe 2**) le milieu récepteur est maintenu sous agitation à 37°C ± 1°C ce qui permet à la peau d'être à 32°C, c'est-à-dire la température physiologique moyenne à la surface cutanée.

##### 4.2.3.1. Protocoles de décontamination

En accord avec la norme NF X52-122 « Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine » les peaux contaminées sont obtenues par le dépôt de 10 µL/ cm<sup>2</sup> de chimique. La décontamination est réalisée 30 minutes après le dépôt de 7,1 µL de Paraoxon-diethyl POX (Sigma Aldrich, USA) : 0,16 g/cm<sup>2</sup> de terre de foulon sont utilisés pour la décontamination sèche. La décontamination humide est réalisée à l'aide d'eau OTec® (Aguettant, France) ou de suspensions aqueuses de terre de foulon à 5%, 9.1% et 15% dans de l'OTec®. Pour ces deux moyens de décontamination, 102 µL/cm<sup>2</sup> de liquides sont déposés sur la peau. Le décontaminant est laissée sur la peau pendant 2 minutes avant son retrait puis la peau est séchée par tapotement avec une gaze de coton.

##### 4.2.3.2. Echantillons

Afin de déterminer la cinétique de pénétration du contaminant, 500 µL du liquide récepteur sont collectés à différents temps (1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, et 24h) et remplacés par 500 µL de PBS 1X. A la fin de la période d'exposition de 24h, la cellule de diffusion est démontée pour libérer la peau et la surface est délicatement essuyée avec un coton adsorbant pour déterminer la quantité de produit restant à la surface de la peau. Les couches cutanées sont séparées selon différentes méthodes : le SC avec la méthode à la colle cyanoacrylate (Salerno et al., 2017), l'épiderme et le derme par immersion dans du PBS 1X chauffé à 60°C. Chaque

échantillon est déposé dans de l'éthanol de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) pour extraire le POX pendant 24h avant le stockage au congélateur -20°C jusqu'à l'analyse HPLC-UV.

#### 4.2.3.3. Quantification par HPLC-UV

La concentration en POX est déterminée par chromatographie liquide à haute pression couplée avec un détecteur UV (HPLC 1260 Infinity II LC Systems, Agilent Technologies, USA). La phase mobile isocratique est composée de 52,25% de méthanol de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) ; 42,75% d'eau milliQ (qualité ultrapure avec  $r=18$  mΩ/cm) ; 5% d'acide acétique glacial de grade HPLC (Carlo Erba, Italie) ; le tout à un débit de 0,7 mL/min. 10µL de l'échantillon sont prélevés et amenés à la colonne de rétention Clipeus C18 (5µm, 100x40 mm) chauffée à 40°C. Le composé est détecté à une longueur d'onde de 269 nm avec un temps de rétention de 5,9 minutes.

#### 4.2.4. Evaluation ex vivo d'un décontaminant

Il est nécessaire d'avoir des outils pour évaluer et comparer les différentes méthodes de décontamination entre elles, sur des données préliminaires obtenues *ex vivo*.

##### 4.2.4.1. Efficacité de décontamination (ED) *ex vivo*

Elle est décrite par une équation et permet de comparer les méthodes de décontamination *ex vivo* :

$$ED (\%) = \frac{(Q3T + Q4T) - (Q3 + Q4)}{Q3T + Q4T} \times 100$$

Avec Q3 = quantité de contaminant dans les couches cutanées à la fin de l'exposition (SC + épiderme + derme) ; Q4 = quantité de contaminant dans le récepteur à la fin de l'exposition ; T = contrôle donc absence de décontamination

##### 4.2.4.2. Amélioration du pronostic fonctionnel

D'après la norme NF X52-122, la décontamination cutanée a un impact sur le pronostic fonctionnel d'une personne car elle permet de retirer le contaminant de la surface cutanée. L'amélioration du pronostic fonctionnel (PF) est calculée suivant l'équation suivante :

$$PF = \frac{Q2T + Q3T + Q4T}{Q2 + Q3 + Q4}$$

Avec Q2= quantité de contaminant présent à la surface cutanée après la décontamination ; Q3, Q4 et T identiques à la description dans le paragraphe 4.2.4.1.

#### 4.2.5. Développement d'hydrogels pour favoriser l'application sur les peaux lésées

##### 4.2.5.1. Formulation des hydrogels

Des hydrogels à base de poloxamères sont réalisés par la méthode de formulation dite « à froid » : 2,5% à 10% de Kolliphor® P407 (BASF, Allemagne) est dissout dans du PBS 1X (Gibco, USA) maintenu à 4°C avant que les hydrogels soient stockés au réfrigérateur. A

l'inverse les hydrogels d'alcool polyvinylique (masse moléculaire moyenne 31 000-50 000, 87-89% hydrolysé ; Sigma Aldrich, USA) de 10% à 25% sont préparés dans du PBS 1X chauffé à 80°C : lorsqu'ils sont formés leur stockage est assuré à température ambiante. Des hydrogels binaires composés de poloxamère 407 (P407) et d'alcool polyvinylique (PVA) à différentes concentrations ont été formulés à 80°C pour étudier l'impact des polymères sur les propriétés des hydrogels.

### 4.2.5.2. Etudes de cytotoxicité

Des fibroblastes normaux issus du derme humain (NHDF), utilisés entre les passages 9 et 12, sont cultivés dans un milieu DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin et 1% de mélange pénicilline-streptomycine (5000 U/mL). Tous les composants utilisés pour le milieu de culture ont été achetés auprès de Gibco (Thermo Fisher Scientific, USA). Les cellules sont placées dans un incubateur (Heracell 150i, Thermo Scientific USA) à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité. Après ensemencement des cellules des plaques 96 puits (Thermo Fisher Scientific, USA) à une concentration de 1 x 10<sup>4</sup> cellule/puit et un repos de 2 jours on observe la formation d'une monocouche de cellules. Les différents hydrogels sont ajoutés à la surface des cellules à l'aide d'une pipette à déplacement positif en raison de leur grande viscosité. Leur retrait par aspiration est effectué après 2h d'exposition et l'évaluation de la cytotoxicité est réalisée à l'aide de la méthode au MTT d'après les recommandations du fournisseur du kit MTT (Sigma Aldrich, USA).

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de viabilité en fonction de la viabilité des cellules exposées seulement au milieu de culture (contrôle positif). L'analyse statistique est réalisée à l'aide d'un ANOVA à deux facteurs couplé avec un test de Dunnett.

### 4.2.6. Analyses statistiques

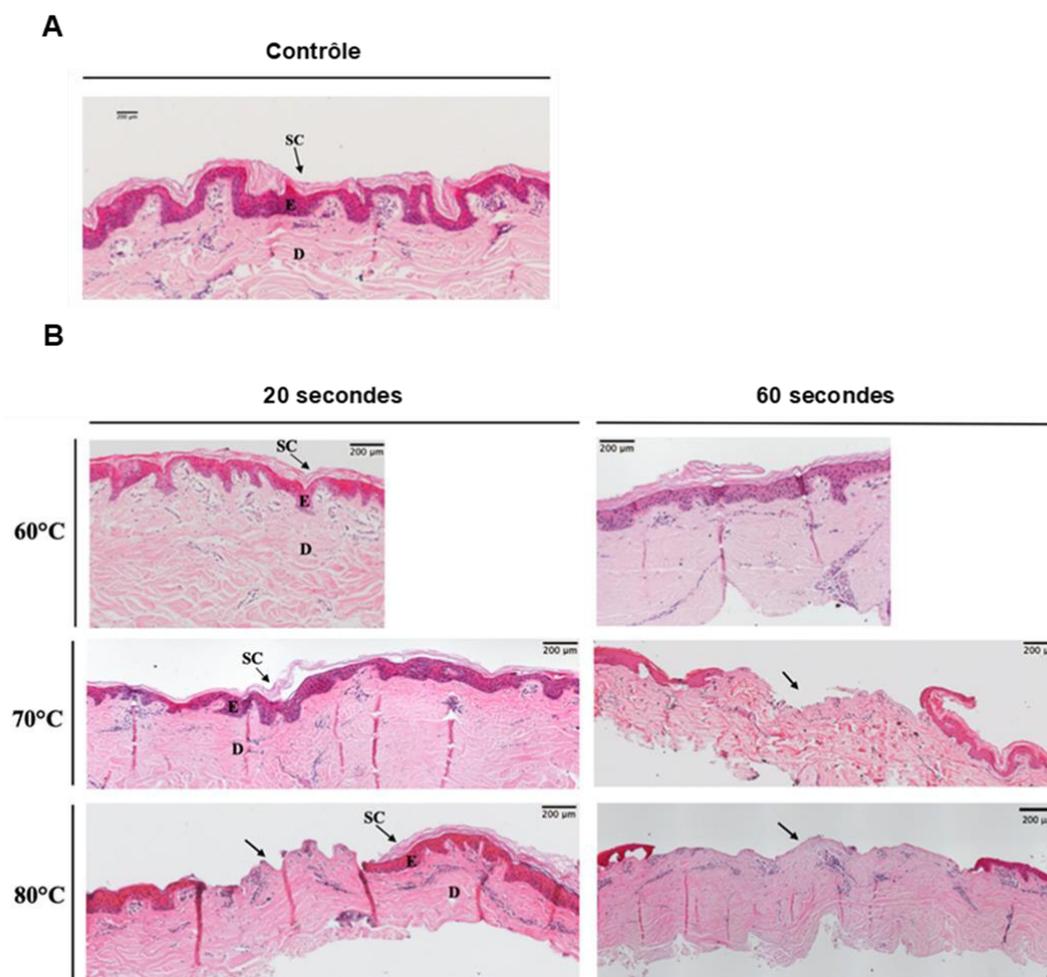
Les données ont été analysées à l'aide de la version 7.0 du logiciel GraphPad Prism (San Diego, USA). Toutes les données sont représentées par les moyennes ± les écarts types où n=6 pour les études de diffusion *ex vivo* sur peau saine, n=4 pour les études de diffusion *ex vivo* sur peau lésée et n=6 pour la cytotoxicité. Les différences statistiques entre les groupes ont été évaluées à l'aide d'un ANOVA à 1 facteur suivi par des tests de comparaison, comme mentionné pour chaque observation.

## 4.3. Résultats

### 4.3.1. Réalisation de la lésion cutanée

De par leur nature et leur sévérité, il existe différents types de lésions cutanées réalisables à la paillasse. Il est donc nécessaire de développer une méthode reproductible et de s'assurer de la perte d'intégrité de la barrière cutanée. Les explants d'oreilles de cochon précédemment

dermatomés et découpés ont été utilisés pour réaliser une brûlure du second degré. Un plot chauffé à différentes températures est appliqué au centre de l'explant pendant différentes durées, puis une coloration à l'hématoxyline-éosine est réalisée pour contrôler l'intégrité cutanée. Le contrôle (**Figure 54 A**) présente les 3 couches cutanées différenciées : le SC, l'épiderme viable et le derme. Lors de l'application du plot chauffé à 60°C pendant 20 ou 60 secondes on n'observe aucune altération du SC qui constitue la couche cutanée la plus externe (**Figure 54 B**). L'augmentation de la température du plot à 70°C entraîne un changement cutané lorsqu'il est appliqué pendant 60 secondes : une bulle se forme sur la zone brûlée. D'après les observations histologiques cette bulle correspond à l'épiderme (SC + épiderme viable) qui se détache du derme : on obtient donc une peau lésée avec une brûlure du second degré qui expose le derme aux éléments extérieurs. La perte de l'épiderme est aussi observée lorsque le plot est chauffé à 80°C, peu importe son temps d'application. Pour la suite des expériences sur les peaux lésées, la condition conservée est celle où la brûlure est réalisée par le plot chauffé à 70°C et appliqué sous la force de son propre poids pendant 60 secondes sur la peau : la bulle épidermique qui se forme est retirée à l'aide d'une pince. Les conditions à 80°C ne sont pas retenues car une température trop importante peut altérer le derme et donc créer une brûlure du troisième degré ou dénaturer les protéines et compliquer la réalisation de brûlures reproductibles.



**Figure 54 :** Observations au microscope d'explants de peau de cochons colorés à l'hématoxyline-éosine (barre d'échelle = 200 µm pour chaque image). **A** = Contrôle sans lésion ; **B** = Observation des lésions cutanées par l'application d'un plot chauffé à 60°C, 70°C ou 80°C pendant 20 secondes ou 60 secondes. Les flèches présentent la lésion cutanée par absence de l'épiderme. SC : *stratum corneum* ; E : épiderme ; D : derme.

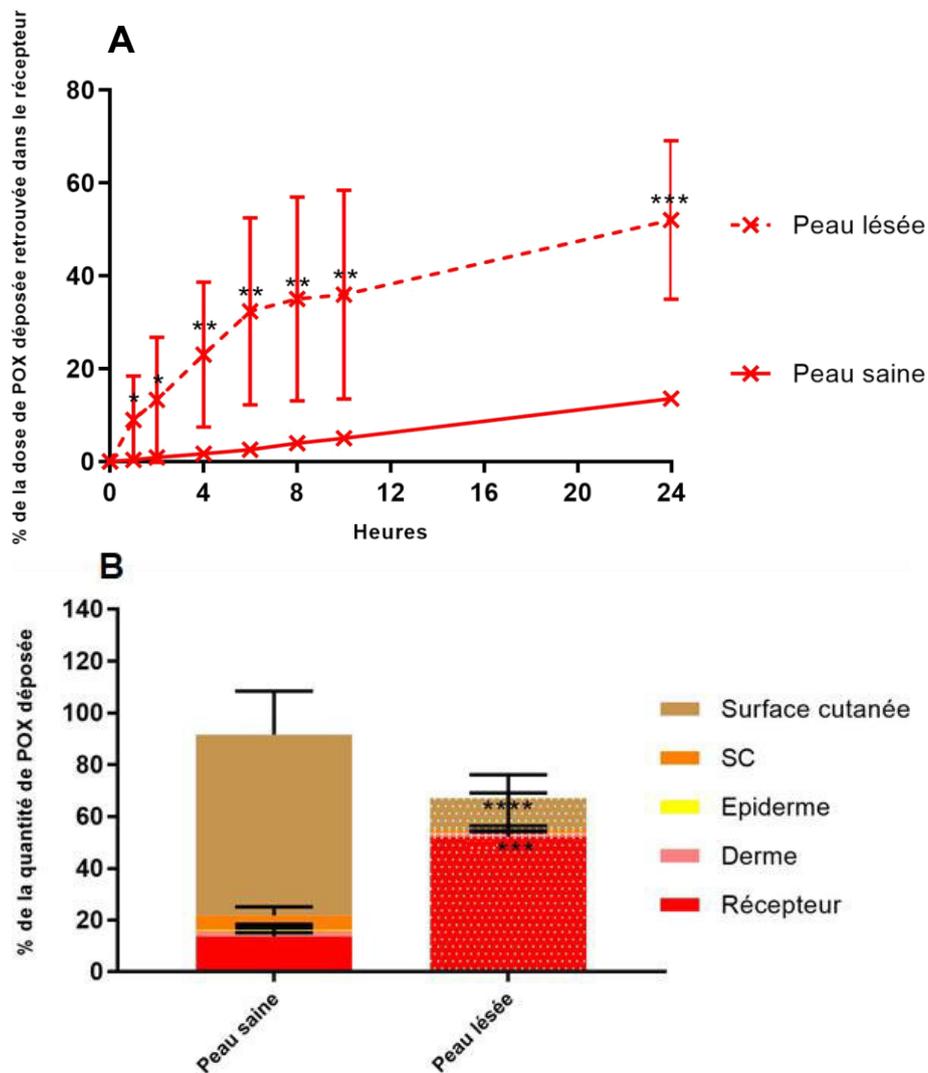
#### 4.3.2. Etudes de diffusion cutanée ex vivo

Le modèle de peau lésée développé et présenté dans la partie 4.3.1. va servir de modèle pour l'étude de la cinétique de pénétration du contaminant *ex vivo* afin de prédire la contamination cutanée *in vivo* lors d'une brûlure du second degré. Les suspensions aqueuses de terre de foulon seront évaluées comme dispositif de décontamination cutanée innovant pour les peaux lésées. Les résultats obtenus sur la peau lésée sont comparés aux études de pénétration cutanée du POX précédemment réalisées (Cf Chapitre 1 des résultats).

##### 4.3.2.1. Pénétration du contaminant dans la peau lésée

Il est nécessaire d'évaluer le profil de pénétration cutanée du contaminant seul à travers le modèle de peau lésée développé pour valider le modèle de lésion et obtenir un référentiel pour évaluer les méthodes de décontamination. La pénétration du POX à travers la peau de cochon saine est linéaire pendant 24 heures jusqu'à ce que 13,59% ± 0,78% de la quantité déposée

soit retrouvée dans le compartiment récepteur (**Figure 55 A**). Lorsque la même expérience est réalisée sur la peau lésée telle que présentée dans la partie 4.3.1. la quantité de contaminant qui diffuse à travers la peau est augmentée d'un facteur 4. En effet, après 24 heures de diffusion,  $52,03\% \pm 8,54\%$  de POX est retrouvé dans le compartiment récepteur. La cinétique de pénétration du contaminant à travers la peau lésée est significativement différente de celle de la peau saine à partir de 4 heures d'exposition. Ce résultat est appuyé par la quantification du POX dans les différents compartiments cutanés à la fin de l'exposition : la quantité de contaminant restant à la surface cutanée est significativement supérieure sur la peau saine (**Figure 55 B**). Le modèle de peau lésée développé par ablation de l'épiderme suite à la brûlure du second degré est un modèle valide puisqu'on observe une cinétique de pénétration linéaire du contaminant, significativement supérieure à celle de la peau saine. De plus, il n'y a pas d'accumulation du produit dans le SC lipophile, car cette couche cutanée est absente du fait de la lésion.

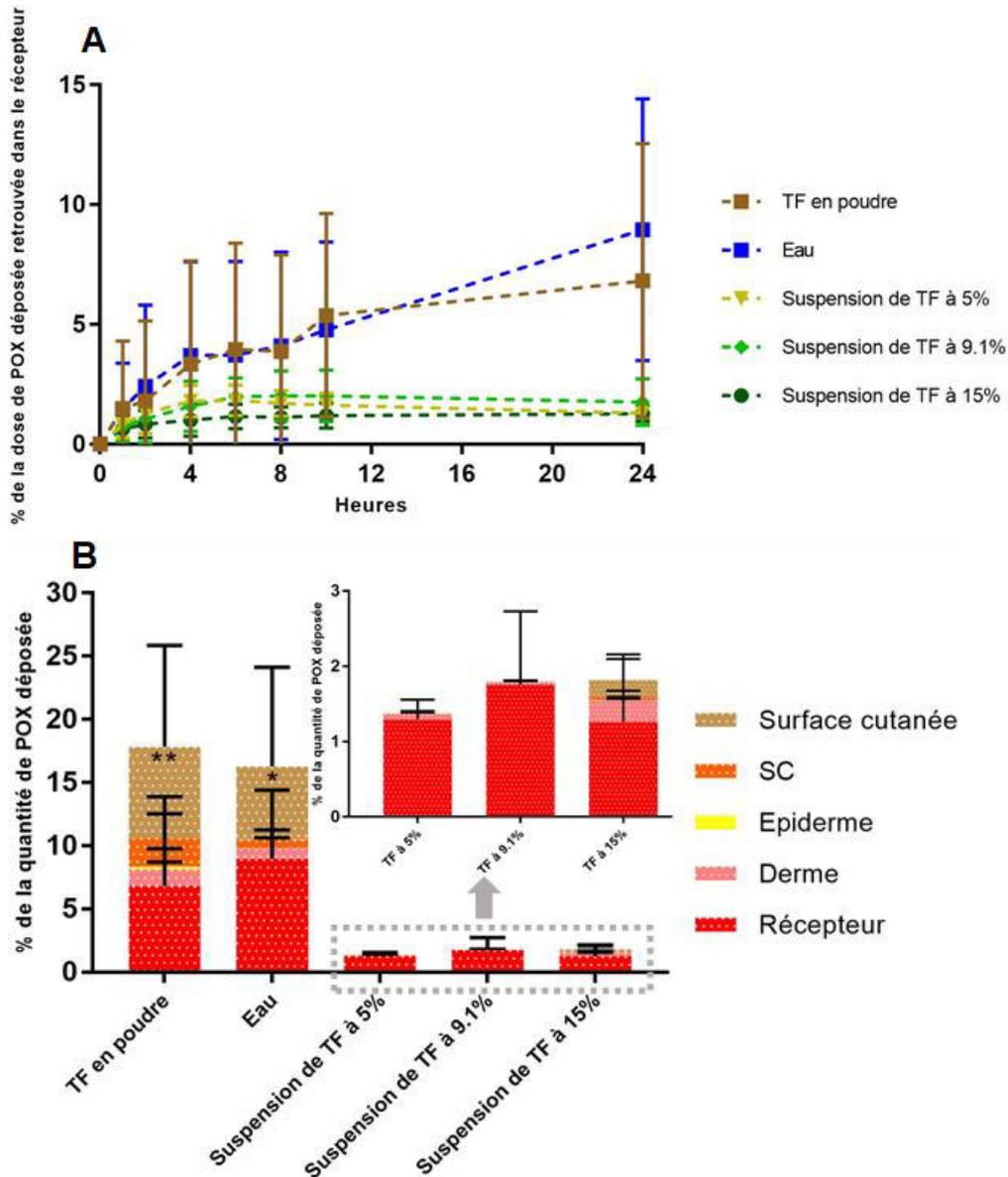


**Figure 55 :** Pénétration *ex vivo* du POX sans décontamination pendant 24h à travers une peau de cochon saine et une peau lésée par brûlure. **A** = Cinétique de pénétration du POX à travers la peau saine (n=6) et la peau lésée (n=4) pendant 24h. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 1 facteur complété par un test

de Tuckey. **B** = Quantification du POX dans les compartiments de la cellule de diffusion et les couches cutanées après 24h de diffusion sur de la peau de cochon saine (n=6) et lésée (n=4). Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Tuckey. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### 4.3.2.2. Décontamination de la peau lésée

L'utilisation de méthodes de décontamination 30 minutes après le début de l'exposition modifie significativement la cinétique de pénétration cutanée du POX (**Figure 56 A**). Grâce à la décontamination humide à l'eau,  $8,95\% \pm 2,73\%$  de la dose de POX initialement déposée à la surface cutanée est retrouvée dans le compartiment récepteur. La décontamination est significativement efficace et le profil de pénétration du contaminant est linéaire. A l'inverse, lorsque la terre de foulon est utilisée sous forme de poudre, la cinétique de pénétration est différente puisqu'un point d'inflexion est observé dans la courbe après 10h de diffusion. En effet, bien que la quantité retrouvée dans le compartiment récepteur à 24h ( $6,81\% \pm 2,86\%$ ) ne soit pas significativement différente de celle avec la décontamination à l'eau, une diminution de la pénétration est observée. Enfin, la décontamination avec les suspensions de terre de foulon induit un profil de décontamination différent de ceux précédemment présentés. L'augmentation de la quantité de contaminant dans le compartiment récepteur est linéaire jusqu'à 4 à 6 heures de diffusion puis un plateau est observé. La variation de la concentration en terre de foulon n'a pas d'effet sur la quantité de contaminant qui a diffusé à travers la peau. La quantification du POX dans les différentes couches cutanées ne montre pas de différence significative entre les différents types de décontamination (**Figure 56 B**). La terre de foulon en poudre et l'eau entraînent une accumulation significative de décontaminant à la surface cutanée. Bien qu'il ait été précédemment démontré que la lésion cutanée entraîne une perte du SC, une accumulation de POX dans le SC est observable avec les décontaminations à la terre de foulon en poudre et à l'eau. Ce résultat s'explique par le fait que la surface de la lésion est plus petite ( $0,5 \text{ cm}^2$ ) que la surface exposée au contaminant pour la diffusion ( $0,71 \text{ cm}^2$ ) du fait de la taille du plot.



**Figure 56 :** Pénétration *ex vivo* du POX à travers une peau de cochon (lésée par une brûlure du second degré) pendant 24h avec une décontamination avec de la terre de foulon sous forme de poudre, de l'eau ou des suspensions de terre de foulon (5%, 9,1% et 15%) 30 minutes après l'exposition. **A** = Cinétique de pénétration du POX à travers la peau lésée pendant 24h (n=4). Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test de Tuckey. **B** = Quantification du POX dans les compartiments de la cellule de diffusion et les couches cutanées après 24h de diffusion sur de la peau de cochon lésée (n=4). Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 1 facteur complété par un test de Tuckey. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

#### 4.3.2.3. Evaluation *ex vivo* des méthodes de décontamination

Les différentes méthodes de décontamination sont évaluées pour la décontamination de la peau lésée par une brûlure du second degré, lors d'une contamination cutanée au POX comme simulant du VX (**Tableau 25**). L'efficacité de décontamination *in vitro* de la terre de foulon en poudre et de l'eau sont équivalentes. Lorsque la terre de foulon est formulée en suspensions, l'efficacité de décontamination augmente d'un facteur 1,2 en moyenne, peu

importe la concentration de la suspension. L'analyse du facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel permet de nuancer ces observations. En effet, les valeurs sont ici aussi équivalentes pour les décontaminations avec l'argile en poudre et l'eau, mais des différences apparaissent en fonction de la concentration des suspensions. La suspension à 5%, qui est la moins concentrée, possède à priori le meilleur facteur d'amélioration du pronostic car la quantité de POX retrouvée dans le compartiment récepteur est faible et elle est quasi nulle dans les couches de la peau. A l'inverse lorsque la concentration en argile augmente, même si elle n'est pas significative, il y a une tendance à l'accumulation dans les couches de la peau et à la surface cutanée. Ce phénomène peut être dû au changement de texture des formulations qui deviennent plus épaisses et visqueuses avec l'augmentation de la concentration en terre de foulon. Le retrait du décontaminant de la plaie devient alors plus complexe et entraîne la persistance de particules d'argiles contaminées au sein de la plaie. Il est donc nécessaire de développer une formulation qui faciliterait le retrait de l'argile et donc du contaminant.

Méthode de décontamination	Peau lésée	
	Efficacité de décontamination <i>in vitro</i> %	Facteur d'amélioration du pronostic
Terre de foulon en poudre	80,64	3,77
Eau	80,89	4,13
Suspension à 5%	97,49	48,84
Suspension à 9,1%	96,73	37,27
Suspension à 15%	97,09	37,01

**Tableau 25 :** Evaluation de l'eau et de la terre de foulon sous différentes formes pour la décontamination de la peau lésée, d'après l'efficacité de décontamination *in vitro* et le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel après 24h d'exposition.

#### 4.3.3. Développement d'hydrogels pour faciliter le retrait de l'argile

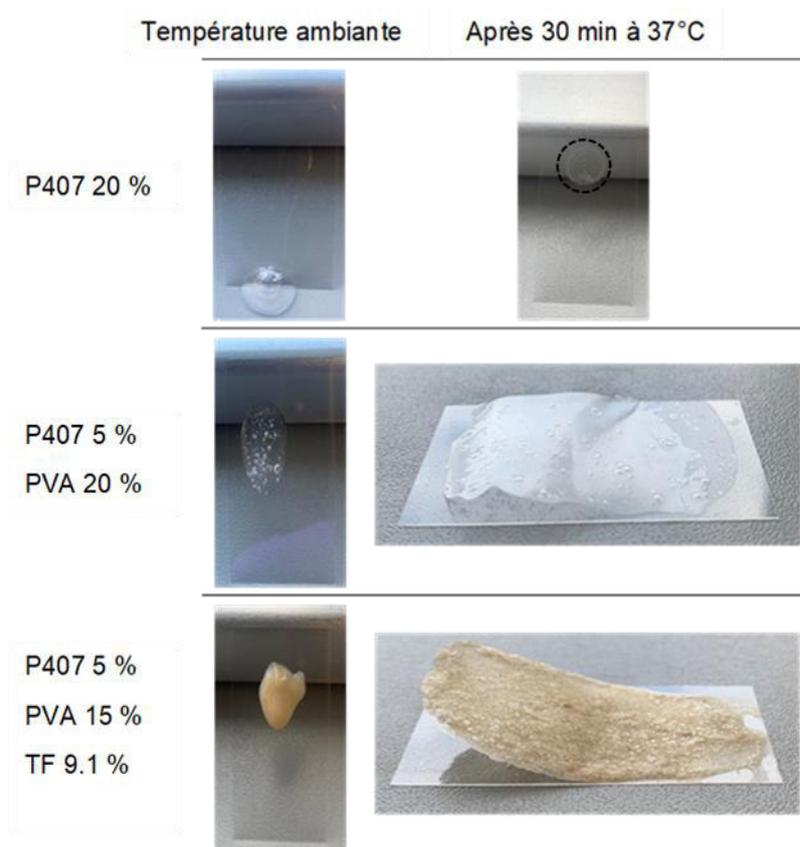
Les suspensions ne permettent pas d'assurer un retrait total de l'argile, donc la forme galénique a été modifiée en modifiant la viscosité pour former un hydrogel. Le développement de cet hydrogel a été fait par étapes pour trouver la texture la plus adéquate avant d'évaluer la cytotoxicité des polymères utilisés.

##### 4.3.3.1. Mise au point de la forme galénique

Le poloxamère 407 (P407) est un hydrogel thermosensible dont l'état physique dépend de la concentration et de la température. Lorsqu'il est formulé à 20% dans du PBS 1X et maintenu à température ambiante (20°C) l'hydrogel est liquide : quand il est placé sur une surface inclinée il coule le long de cette surface. Une incubation de 30 minutes dans une enceinte régulée à 37°C entraîne la gélification de l'hydrogel qui forme une sphère au niveau de la zone de dépôt (**Figure 57**). L'alcool polyvinylique (PVA) est un polymère de structure qui polymérise

avec l'augmentation de sa concentration. L'ajout de P407 à 5% dans une formulation de PVA à 20% forme un hydrogel visqueux à température ambiante qui va se transformer en film après incubation à 37°C pendant 30 minutes. Ce film se retire de la surface par arrachage, en un seul morceau, et paraît élastique. L'ajout de la terre de foulon dans l'hydrogel binaire se fait en diminuant la quantité de PVA à 15% pour conserver une quantité de solvant nécessaire à la dissolution des polymères. Cet hydrogel est visqueux à 20°C et peut être appliqué par étalage : l'augmentation de la température induit la polymérisation du PVA et permet un retrait par arrachage du film.

L'hydrogel composé de 5% de P407, 15% de PVA et 9,1% de TF semble être un bon candidat pour optimiser le retrait de l'argile des plaies dans le cadre de la décontamination cutanée car il forme un film qui s'arrache facilement en un seul morceau.



**Figure 57** : Aspect des différentes formulations d'hydrogels à température ambiante (20°C) et après incubation 30 minutes à 37°C.

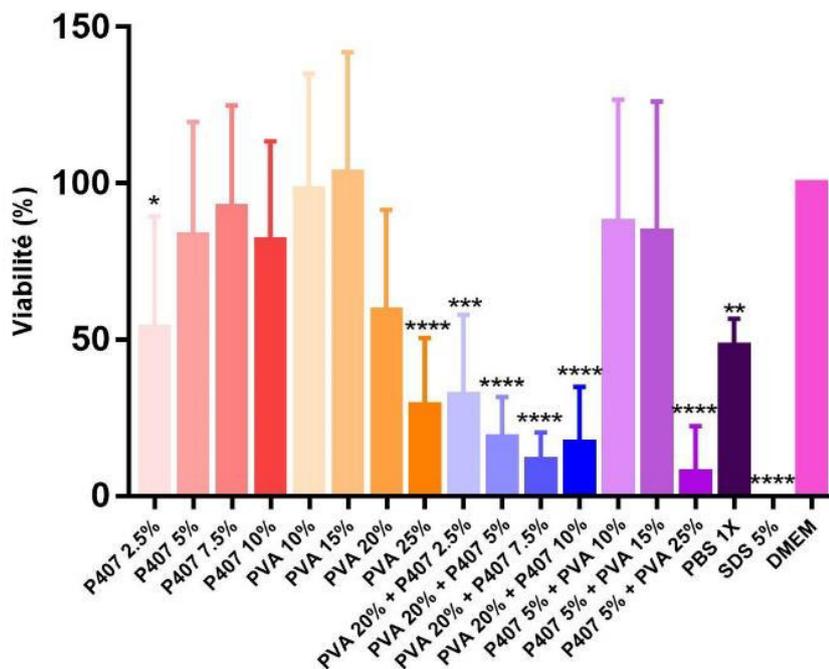
#### 4.3.3.2. Toxicité des polymères

Des hydrogels binaires à base de polymères sont réalisés pour proposer un dispositif de décontamination cutanée innovant sur le plan galénique. La toxicité des deux polymères est étudiée, ainsi qu'un potentiel effet lié à leur concentration ou à leur utilisation synergique après 2h d'exposition (Cf matériels et méthodes 4.2.5.2.). Les fibroblastes normaux du derme

humain (NHDF) sont utilisés comme modèle cellulaire car la plaie entraîne la disparition de l'épiderme (Cf partie 4.3.1.), ce qui place le derme en première ligne pour interagir avec les éléments extérieurs.

Le P407 présente une toxicité sur les NHDF lorsqu'il est formulé à 2,5% dans le PBS (**Figure 58**). L'augmentation de sa concentration jusqu'à 10% n'induit pas l'apparition d'une toxicité. Le PVA n'a pas d'effet significatif sur la viabilité des cellules lorsqu'il est formulé à une concentration inférieure ou égale à 20% mais sa toxicité est significative pour une concentration de 25%.

Afin d'étudier un potentiel effet toxique synergique des deux polymères, des hydrogels ont été formulés en fixant la concentration non toxique d'un polymère et en faisant varier la concentration de l'autre polymère. Lorsque les hydrogels binaires sont réalisés avec 20% de PVA un effet cytotoxique est observé quelle que soit la concentration en P407 dans un intervalle 2,5%-10%. A l'inverse les hydrogels binaires à 5% de P407 présentent une toxicité envers les NHDF qui est dépendante de la concentration en PVA. En effet, une diminution significative de la viabilité des cellules est observée pour des hydrogels composés de 5% de P407 et 20% de PVA ; ce phénomène est augmenté lorsque la concentration en PVA atteint 25%. Il y a donc un effet toxique synergique entre les deux polymères quand le PVA se retrouve à concentration supérieure à 15% : pour le futur développement d'un hydrogel binaire il faut envisager de travailler avec un mélange ne comportant pas plus de 15% de PVA pour limiter sa toxicité.



**Figure 58** : Evaluation de la toxicité *in vitro* des polymères pour la formulation des hydrogels sur des fibroblastes normaux dermiques (NHDF) (n=6). Etude de la variation de la concentration en P407 et en PVA dans des hydrogels simples et binaires. Les résultats sont statistiquement analysés avec un ANOVA à 2 facteurs complété par un test

de Dunnett en utilisant le milieu de culture (DMEM) comme contrôle. Les valeurs sont représentées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

### 4.4. Discussion

La pénétration transcutanée de composés exogènes est modifiée lorsque l'intégrité de la peau est altérée. Afin de prédire ces changements des méthodes de lésion de la peau *ex vivo* sont développées pour obtenir un modèle reproductible et fiable. Différents modèles de lésion sont décrits dans la littérature : lésion superficielle du SC par tape stripping (Schlupp et al., 2014) ou par irradiation avec un laser excimère à fluorure d'argon pulsé (Fujiwara et al., 2005) ou lésion profonde par application d'aiguilles hypodermiques dans différentes directions (Grives et al., 2015; Mauro et al., 2019) ou par utilisation du dermatome pour retirer les couches supérieures de la peau (Lydon et al., 2018). Ces lésions ne sont pas de bons modèles pour prédire le passage transcutané de chimiques de guerre sur une peau lésée au cours d'une intervention militaire. En effet, d'après Leclerc et al., 2015 les brûlures de guerre liées au combat représentent une forte proportion des lésions observées sur le terrain. Le modèle présenté dans ce chapitre repose donc sur la réalisation d'une brûlure du second degré avec un protocole simple et facilement reproductible entre les opérateurs et les laboratoires. Cette lésion est conséquente au retrait de la bulle épidermique qui se forme lors du chauffage de la peau : la reproductibilité de la méthode a été déterminée par histologie. Ce modèle de peau lésée a donc été utilisé pour évaluer le potentiel de décontamination de suspensions aqueuses de terre de foulon ayant déjà démontré une efficacité pour la décontamination du POX sur une peau saine (Cf chapitre 1 des résultats).

La création de la lésion au sein de l'explant cutané entraîne une modification de la quantité de contaminant qui diffuse par rapport à une peau saine. Cette observation est en accord avec Lydon et al., 2017 qui ont étudié la pénétration cutanée du VX sur une peau de cochon dont les 100  $\mu\text{m}$  les plus externes ont été retirés. La décontamination humide à l'eau ne présente pas un profil de diffusion du contaminant avec un plateau car l'eau va entraîner le contaminant à travers le derme hydrophile par un effet de « wash-in » (Moody & Maibach, 2006). De plus, cette méthode de décontamination ne permet pas un retrait total du contaminant de la surface cutanée ce qui induit une diffusion prolongée. La décontamination avec la terre de foulon sous forme de poudre entraîne le même profil de pénétration du contaminant et présente une efficacité de décontamination semblable à celle réalisée à l'eau. La persistance de contaminant à la surface cutanée est en accord avec les résultats observés sur peau saine (Cf Chapitre 1) car les sites de fixation de l'argile sont saturés par le contaminant. Cette forte proportion peut aussi s'expliquer par la présence de particules d'argiles contaminées qui restent à la surface de la peau car le retrait est compliqué. Tout comme la décontamination de la peau saine, les suspensions de terre de foulon démontrent un grand intérêt pour diminuer

la quantité de décontaminant qui diffuse à travers la peau. L'apparition de nouveaux sites d'adsorption au sein de l'argile est permise par la mise en suspension et cette formulation permet un retrait facilité par rapport à l'usage de poudres. Il faut tout de même noter que la suspension la moins concentrée possède le plus grand facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel : l'augmentation de la viscosité des suspensions va compliquer leur retrait et entraîner un dépôt à la surface cutanée qui limite le retrait du contaminant. Ces méthodes de décontamination sont donc efficaces mais il est nécessaire de faire évoluer la formulation pour obtenir un produit qui se retire facilement et complètement de la plaie.

Les hydrogels binaires de P407 et de PVA semblent être une bonne association pour le développement d'un hydrogel possédant une formulation innovante adaptée à la problématique des lésions cutanées d'après les résultats obtenus et les données de la littérature. Le P407 est un polymère amphiphile utilisé dans de nombreuses applications biomédicales et cosmétiques (Choi et al., 2018). Ce composé est formé par un bloc hydrophobe de polypropylène glycol encadré par deux blocs hydrophiles de polyéthylène glycol, respectivement répétés 56 et 101 fois. De par la nature de ces blocs l'ensemble forme un surfactant non ionique amphiphile qui a la capacité de former un gel thermoréversible lors de sa mise en suspension : lorsque la température et la concentration en poloxamère augmentent des micelles apparaissent (Ur-Rehman et al., 2010). L'hydrogel présente des propriétés thermoréversibles car sa gélification dépend de la température : on est en présence d'un liquide à température ambiante qui se solidifie à 37°C (Choi et al., 2018; Leyva-Gómez et al., 2017). Ce polymère a la particularité d'être biocompatible et de présenter une faible toxicité envers les fibroblastes du derme ce qui en fait un bon candidat pour l'injection sous cutanée et la délivrance contrôlée de molécules actives (Mendonça dos Santos et al., 2015; Ur-Rehman et al., 2010). De plus des études ont démontré que la composition intrinsèque des poloxamères est en faveur de l'augmentation de la cicatrisation, ce qui est une propriété très intéressante dans le cadre du développement d'un hydrogel décontaminant pour les plaies cutanées (Kim et al., 2007; Leyva-Gómez et al., 2017). Le PVA quant à lui présente de grandes propriétés mécaniques ce qui permet son usage en tant que support pour d'autres polymères et/ou pour des molécules actives (Kamarul et al., 2014; Mohseni et al., 2019; Sequeira et al., 2019; Sun et al., 2019). En effet, ce polymère hydrosoluble, non toxique et biocompatible forme des fibres qui vont s'assembler en réseau poreux pour créer des implants ou des films pour un usage médical et cosmétique (Niranjan et al., 2019). Lors de l'étude de la toxicité du PVA polymérisé sur des fibroblastes dermiques murins aucun effet néfaste n'a été reporté, en plus de l'absence de sensibilisation cutanée (Sun et al., 2019). Ce type de polymère est déjà utilisé comme support pour la délivrance de molécules actives favorisant la cicatrisation de plaies cutanées (Mohseni et al., 2019; Niranjan et al., 2019; Sequeira et al., 2019). L'association des deux polymères permet d'envisager un hydrogel sous la forme d'un

réseau solide et rigide qui se réticule à température cutanée grâce au P407, dans lequel des particules de phyllosilicates permettraient la décontamination de plaies.

L'utilisation des hydrogels pour la décontamination cutanée de plaies est un sujet d'intérêt grandissant. Des molécules pro cicatrisantes peuvent être ajoutées à une formulation décontaminante pour limiter la formation de plaies conséquentes à l'utilisation de l'ypérite ou favoriser la cicatrisation de plaies pré existantes. Lomash & Pant, 2014 ont couplé l'aloé vera à la N,N'-dichloro-bis[2,4,6-trichlorophenyl]urée pour la décontamination et la protection de la peau lors de l'utilisation de l'ypérite. Le blanc d'œuf riche en albumine pro-cicatrisante peut être ajouté dans un hydrogel décontaminant à base de PVA et montmorillonite (Sirousazar et al., 2016). L'ajout de molécules actives au sein d'hydrogels de ce type implique une réflexion au niveau réglementaire puisque le produit acquière alors le statut de médicament.

Pour la décontamination des plaies cutanées, il est important que la formulation utilisée soit duale : l'activité décontaminante doit être complétée par une activité cicatrisante qui peut être imputable à la formulation galénique elle-même ou à l'ajout de molécules cicatrisantes.

#### 4.5. Conclusion

La décontamination de la peau saine est réalisée à l'aide de méthodes de décontamination dites sèches ou humides. Lorsque la barrière cutanée est altérée, aucune de ces méthodes de décontamination ne peut être utilisée. Des suspensions de terre de foulon ont démontré leur plus-value dans pour la décontamination, il est donc nécessaire de développer un modèle de peau lésée pour les évaluer pour cette nouvelle utilisation. La lésion cutanée réalisée *ex vivo* doit correspondre au type de plaies retrouvées *in vivo* : ici la brûlure de second degré. Le pouvoir adsorbant de la terre de foulon est augmenté lorsqu'elle est formulée sous forme de suspensions aqueuses pour la décontamination de ce type de peau lésée. Le facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel diminue avec l'augmentation de la concentration des suspensions car le retrait de la plaie n'est pas optimal du fait de leur texture. Il est donc nécessaire de développer un nouvel outil sous forme d'hydrogel qui permettrait de véhiculer la terre de foulon et qui faciliterait son retrait. Un assemblage de polymère biocompatibles et non toxiques, présentant des propriétés de thermo-sensibilité et une fonction de texture en association à l'argile semble être une approche à développer.

---

# **Discussion générale et perspectives**

---



## 1. Discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer des méthodes de décontamination cutanée innovantes à base d'argiles. Pour cela, une méthodologie fiable a été développée pour établir la cinétique de pénétration cutanée d'un contaminant chimique ainsi que sa quantification. Après la validation de la peau porcine comme substitut de la peau humaine pour ces essais de diffusion *ex vivo* et la réalisation d'une lésion cutanée, l'étude de la pénétration cutanée de simulants de chimiques de guerre et leur décontamination avec des argiles sous forme de poudres et de suspensions aqueuses a été réalisée. Le développement de ces formulations innovantes sous forme de suspensions et d'hydrogels a permis d'augmenter les capacités de décontamination des argiles et d'étendre leur champ d'utilisation.

### 1.1. Méthodologie pour l'étude de la diffusion *ex vivo*

L'étude de la pénétration cutanée est réalisée avec des cellules de Franz miniaturisées : il s'agit du dispositif breveté Vitropharma® pour lequel la similitude de la diffusion a été démontrée par rapport aux cellules de Franz. L'exposition est réalisée pendant 24 heures pour limiter le dessèchement de la peau présente à l'interface des compartiments récepteur et donneur, ce qui causerait un biais dans l'interprétation des résultats. La séparation des différentes couches cutanées à la fin de l'expérience permet l'extraction de la molécule d'intérêt avant sa quantification par la méthode à l'HPLC-UV (**Figure 42**) (Salerno et al., 2017). L'efficacité de décontamination des argiles sur des agents chimiques de guerre et des toxiques industriels ne peut être évaluée en laboratoire conventionnel en raison de la grande toxicité de ces composés. L'usage de simulants possédant les mêmes propriétés physicochimiques et/ou la même réactivité chimique est nécessaire (Bartelt-Hunt et al., 2008). Les composés organophosphorés possèdent tous la même réactivité envers l'acétylcholinestérase (Pope, 1999) mais avec une toxicité variable : les pesticides sont moins toxiques que les chimiques de guerre, et il existe aussi une hiérarchie entre les composés de chaque famille. Les pesticides les moins toxiques peuvent donc être utilisés comme simulants de chimiques de guerre s'ils possèdent une masse moléculaire, un log P et une volatilité similaires. Le paraoxon peut par exemple être utilisé comme simulant du VX lors des études de décontamination *in vitro* et *in vivo* (Misik et al., 2015; Sellik et al., 2017). Pour l'ypérite, deux simulants peuvent être utilisés en fonction de l'enjeu de l'expérimentation : le salicylate de méthyle possède une masse moléculaire et un log P similaires au composé chimique de guerre et leur absorption percutanée est comparable (Riviere et al., 2001). Cependant, la réactivité chimique du salicylate de méthyle est totalement différente de celle de l'ypérite, contrairement au 2-chloroethyl ethyl sulfide (2-CEES) qui est très toxique avec son groupe sulfure oxydable (**Tableau 21**) (Salter et al., 2011). Pour de simples études de diffusion le salicylate de méthyle

sera donc le simulant de choix, tandis que le 2-CEES sera choisi pour étudier l'évolution des variables biologiques.

## 1.2. Intérêt de la peau de cochon

La peau est le plus grand organe du corps humain et sa surface représente une zone privilégiée pour l'absorption percutanée de composés exogènes. Ce phénomène doit être quantifié dans le cadre du dépôt d'une molécule active à la surface de la peau pour connaître son pourcentage disponible dans la peau et dans la circulation systémique. La réalisation d'études *in vivo* sur des personnes volontaires n'est pas toujours possible en raison de la toxicité des molécules : il est donc nécessaire de passer par des études de diffusion *ex vivo*.

La peau d'origine humaine est préférentiellement utilisée car elle ne nécessite pas d'extrapolation inter-espèces pour l'interprétation des résultats (Hui et al., 2012; Moore et al., 2014) mais elle est chère et difficile à obtenir pour des raisons éthiques (Zhang et al., 2019). La peau de cochon est utilisée comme modèle prédictif de la pénétration cutanée car elle possède de grandes similitudes avec la peau humaine. En effet ces deux types de peaux ont une histologie et des propriétés physiopathologiques similaires (Godin & Touitou, 2007; H. Matar et al., 2014). Leur caractérisation chimique par spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier a permis de confirmer la proximité entre les deux espèces, en plus de la faible variabilité entre des explants porcins issus de différents individus (Kong & Bhargava, 2011). La nature des glandes exocrines constitue une des majeures différences : elle sont eccrines chez l'Homme et apocrines chez le cochon (Tazart et al., 2017). De plus des différences dans la fonction barrière de la peau peuvent apparaître en fonction du mode de conservation : la congélation des explants altère la structure des lipides retrouvés au sein du SC. Bien que d'après l'OCDE, la peau de cochon soit définie comme modèle représentatif de la peau humaine pour les études de diffusion cutanée (Sekkat et al., 2002; Tazart et al., 2017), il est nécessaire de caractériser cette similitude de résultats pour un composé chimique donné.

Au cours de cette étude la pénétration cutanée du paraoxon (POX) a été déterminée sur des explants porcins et humains. Les profils cinétiques diffèrent significativement à partir de 6 heures de diffusion : la quantité de POX pénétrée à travers la peau humaine est significativement supérieure (**Figure 4** de l'article de la partie 1 des résultats). L'interprétation de ces résultats est possible grâce aux travaux de In et al., 2019 : bien que les deux espèces possèdent de nombreuses similitudes au niveau de l'histologie de la peau et de sa composition, des différences dans l'épaisseur de certaines couches cutanées sont observables. En effet, la peau humaine possède un SC et une jonction dermo-épidermique plus épais que dans la peau de cochon, ce qui modifie le ratio épiderme : derme pour deux échantillons de même épaisseur (**Figure 43**). La peau d'origine humaine présente une composante lipophile plus importante ce qui facilite la diffusion des molécules avec un log

P positif, avant le passage dans le derme hydrophile plus fin augmentant ainsi la quantité de produit retrouvée dans le compartiment récepteur. Cette observation est en accord avec les résultats décrits dans la littérature où la peau de cochon est présentée comme un bon modèle prédictif de la peau humaine pour les études de diffusion pour des composés avec un log P compris entre -3,1 et 5,1 (Benech-Kieffer et al., 2000; Jacobi et al., 2007). Dans le cadre de cette étude la peau de cochon représente donc un bon modèle prédictif peu cher de la peau humaine, sans risque de surestimation de l'exposition.

La pénétration transcutanée des composés exogènes peut être modifiée en cas d'altération de la barrière cutanée. Dans le cadre militaire, les brûlures de guerre liées aux combats ont une fréquence d'apparition élevée (Leclerc et al., 2015). Elles sont spécifiques par rapport à celles observées dans la population civile, puisqu'elle se situent majoritairement sur les mains et la face, le reste du corps étant protégé par l'équipement. De plus, des atteintes lésionnelles sont souvent associées, induites le plus souvent par des résidus de charges explosives. Il est donc nécessaire de développer des modèles de peau lésée *ex vivo* pour prédire la pénétration cutanée de composés chimiques. Pour ce faire, le modèle doit permettre de réaliser une lésion qui soit en accord avec la problématique de l'étude. Les modèles de plaies d'excision peuvent être d'épaisseur partielle si elles touchent l'épiderme et la partie supérieure du derme, ou de pleine épaisseur si l'ensemble du derme est retiré (Mendoza-Garcia et al., 2015). Les brûlures sont elles aussi classifiées en fonction de la profondeur de l'altération cutanée : la société française d'étude et de traitement des brûlures définit comme brûlure de premier degré une atteinte superficielle épidermique, de deuxième degré lorsque tout l'épiderme est touché et de troisième degré une atteinte profonde du derme +/- de l'hypoderme. La méthode du « tape stripping » est la plus utilisée pour réaliser une lésion de la barrière cutanée : elle repose sur l'application d'une bande d'adhésive sur la surface cutanée et à son retrait de multiples fois pour retirer successivement les différentes couches du SC. Malgré la simplicité apparente de la technique de nombreux biais au niveau de sa reproductibilité sont observés en fonction du site anatomique, de la pression appliquée sur la bande adhésive et sa durée, et la nature de cette bande adhésive (Schlupp et al., 2014). L'abrasion du SC peut être réalisée de façon plus reproductible par irradiation à l'aide d'un laser excimère à fluorure d'argon pulsé qui présente une faible capacité de pénétration inférieure à l'épaisseur du SC ce qui permet de préserver l'épiderme viable sous-jacent (Fujiwara et al., 2005). Ces atteintes superficielles ne touchent que la couche externe de l'épiderme et correspondent à des lésions de « grattage ». Une atteinte dermique peut être réalisée avec l'utilisation de pointes d'aiguilles plantées à la surface de la peau dans différentes directions (Grives et al., 2015; Mauro et al., 2019). Les méthodes présentées entraînent la formation de plaies superficielles et peu représentatives de la réalité. Lydon et al., 2017, ont développé un modèle de lésion cutanée par retrait des 100 µm cutanés les plus externes à l'aide d'un microtome. En plus d'assurer un retrait total de l'épiderme, ce

type de procédure a été validé sur des explants cutanés et *in vivo* sur des modèles porcins (C. Dalton et al., 2018). L'étude présentée dans ce manuscrit s'est intéressée à la réalisation de plaies par brûlure, qui correspondent au domaine d'usage des décontaminants qui seront par la suite testés. Des plots métalliques sont chauffés à 70°C avant d'être appliqués sur la peau pendant 1 minute sous l'effet de leur propre poids, et la bulle épidermique qui se forme est retirée à l'aide de pinces. La lésion du type brûlure du second degré qui en résulte assure une exposition directe du derme : sa caractérisation et sa reproductibilité ont été déterminées par histologie (**Figure 54**). De plus Berthet, 2017, qui a réalisé au sein de l'équipe sa thèse portant sur des études de cicatrisation cutanée suite à des brûlures, a utilisé un protocole similaire pour réaliser des brûlures thermiques au troisième degré reproductibles *in vivo* sur des souris SKH1 immunocompétentes et sans poils. Le modèle développé est donc représentatif des lésions observées sur le terrain militaire et il peut être adapté pour la réalisation d'études *in vivo*.

### 1.3. Les argiles pour la décontamination cutanée

La Convention sur l'interdiction des armes chimiques a été signée en 1997 mais de nombreux usages récents de chimiques de guerre ont été recensés. Le sarin a notamment été utilisé en 2013 en Syrie contre la population civile lors de l'attaque de la Ghouta, tandis que des attaques à l'ypérite ont été observées en 2015 et 2016 en Syrie et en Irak (Sezigen & Kenar, 2020). Le développement de kits sensibles, spécifiques, simples et rapides est donc un enjeu pour l'utilisation sur le terrain : Worek et al., 2017 ont mis au point un test sanguin basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman pour la détection des composés organophosphorés tandis que Kumar et al., 2018 ont développé une méthode de détection colorimétrique et fluorescente de l'ypérite. Lorsque de tels équipements ne sont pas disponibles, il est essentiel de mettre en place une décontamination d'urgence à l'aide de décontaminants non spécifiques.

La terre de foulon est une argile fibreuse de type palygorskite (Cf **Annexe 1**) qui possède un fort pouvoir adsorbant de par sa grande surface spécifique (224 m<sup>2</sup>/g) et sa capacité d'échange de cations (5-40 mEq/100g) (Post & Crawford, 2007). Ces propriétés ont été mises à profit depuis des milliers d'années pour le foulage de la laine qui a pour but de la dégraisser et de retirer les impuretés avant son tissage (Kherdekar & Adivarekar, 2017). Cet usage découlant des propriétés intrinsèques de l'argile a permis de développer son utilisation dans le domaine de la décontamination cutanée lors d'attaques chimiques ou d'accidents toxiques industriels. En effet, par dépôt sur la peau, la terre de foulon adsorbe le surplus d'un produit retrouvé à la surface cutanée. Cette capacité est commune à toutes les argiles et dépend de la surface spécifique des particules qui peut aller de 10 m<sup>2</sup>/g à 800 m<sup>2</sup>/g (Jlassi et al., 2018). La surface spécifique de la palygorskite est moyenne avec une valeur de 181,14 m<sup>2</sup>/g (Zhong et al., 2019) ce qui en fait un bon matériau adsorbant. Cependant, les argiles de type 2 :1 telles que les

smectites et les vermiculites possèdent une plus grande surface spécifique, ce qui peut en faire de très bonnes argiles adsorbantes pour un éventuel usage en tant que décontaminants cutanés.

Quel que soit le phyllosilicate employé pour la décontamination cutanée, des interactions avec les cellules de la peau peuvent être à l'origine d'une toxicité. Les argiles sont des composés très hétérogènes en terme de granulométrie : Paumier et al., 2008 ont déterminé à l'aide de diverses méthodes que la bentonite est composée de 12% de particules avec une taille supérieure à 200  $\mu\text{m}$  et de 46% de particules fines inférieures à 2  $\mu\text{m}$ . Afin d'appréhender la toxicité globale des argiles, il est nécessaire de différencier les populations qui les composent. D'après nos études, lors de leur mise en suspension les phyllosilicates ne vont pas libérer des particules fines qui vont avoir un effet toxique sur les kératinocytes qui composent la couche externe de la barrière cutanée, ce qui est en accord avec les observations de Janer et al., 2014 (**Figure 1** de l'article de la partie 1 des résultats et **Figure 45**). La toxicité globale des argiles et notamment des plus grosses particules est documentée pour un usage par ingestion en tant que détoxifiant pour limiter la contamination des denrées animales par les aflatoxines (Abdel-Wahhab et al., 1999; Dwyer et al., 1997). La ligne directrice 236 de l'OCDE définissant la « Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques – Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire » a permis de compléter ces données afin de valider l'innocuité des argiles employées. Les deux argiles testées ne présentent pas d'effet toxique cutané *in vitro* et *in vivo* ce qui permet d'envisager leur usage sûr dans le cadre de la décontamination cutanée (**Figure 3** de l'article de la partie 1 des résultats et **Figure 47**).

La décontamination cutanée du paraoxon et du salicylate de méthyle pour mimer respectivement la pénétration du VX et de l'ypérite, est effectuée à l'aide d'une palygorskite et d'une argile de composition minérale indéterminée, sous forme de poudres. Pour la contamination au POX, l'utilisation des deux poudres induit des résultats différents : la terre de foulon qui est une palygorskite permet d'assurer un meilleur retrait du contaminant de la surface cutanée (**Figure 48**). L'argile X possède donc une surface spécifique d'échange plus faible ce qui induit une saturation des sites de fixation plus rapidement. Lors de la comparaison de la décontamination cutanée du paraoxon et du salicylate de méthyle avec la terre de foulon, les pouvoirs décontaminants obtenus sont identiques : il n'y a pas de spécificité de l'argile dans l'adsorption des composés chimiques.

Dans le cadre de l'utilisation des argiles pour un protocole de décontamination sèche la nature de l'argile joue un rôle primordial pour définir l'efficacité de décontamination. De plus, la terre de foulon ne présente pas un caractère sélectif dans la liaison du contaminant ce qui permet d'envisager son usage sans identification préalable de la nature du composé chimique.

#### 1.4. Optimisation de la formulation

Les argiles sous forme de poudre sont des composés volatils avec une fine granulométrie qui peuvent facilement se disperser et se déposer dans le tractus respiratoire (Denet et al., 2020). Lorsqu'un produit contaminant est adsorbé sur les particules d'argiles le risque de contamination croisée est aussi important que le risque de contamination environnementale conséquent à une mauvaise gestion des déchets. L'optimisation de la formulation d'argile peut donc avoir comme double effet la diminution de sa volatilité et donc des contaminations associées, ainsi que l'amélioration de ses propriétés décontaminantes.

La réalisation de suspensions aqueuses permet de répondre à ce double enjeu par la formation de particules d'argiles hydratées avec une forte viscosité. Avec la terre de foulon qui est une argile fibreuse, l'eau ne va pas modifier la structure 3D des particules par gonflement mais elle va permettre de libérer des sites de fixation qui étaient précédemment cachés (Chemedda et al., 2014). Ces propriétés sont mises à profit pour purifier les eaux usées polluées. Dans le cadre de notre étude ce phénomène se traduit par une augmentation de la capacité d'adsorption de l'argile et une diminution de la quantité de contaminant qui diffuse à travers la barrière cutanée. L'argile X, dont la nature n'a pas été caractérisée, présente elle aussi une amélioration de l'efficacité de décontamination sous forme de suspension aqueuse qui est supérieure à celle des suspensions de terre de foulon. L'hypothèse d'une argile sous forme de feuillets « fermés » a précédemment été émise pour définir l'argile X : ce type d'argile présente une grande capacité d'adsorption de l'eau qui va entraîner un gonflement des feuillets (Jlassi et al., 2018). Lorsque les feuillets vont s'écarter de nouveaux sites d'adsorption vont apparaître et la surface spécifique de la particule va augmenter ce qui se traduit par une amélioration de l'efficacité de décontamination (**Figure 50**) (Salles et al., 2010). Le facteur d'augmentation de l'adsorption est le même pour une argile donnée que le contaminant soit le POX ou un composé organique volatil tel que le salicylate de méthyle : la liaison à l'argile est non spécifique même lorsqu'elle se trouve sous forme de suspension.

Cette propriété est très utile lors d'une contamination chimique où il faut identifier la nature du contaminant le plus vite possible pour administrer l'antidote correspondant (Weir et al., 2020). La décontamination cutanée précoce peut précéder cette étape et doit donc assurer un retrait non spécifique du contaminant.

Le SC joue un rôle primordial dans la contamination cutanée et l'évaluation des méthodes de décontamination. En effet, le POX possède un log P de 1,98 ce qui traduit une forte lipophilie du composé. En l'absence de décontamination un réservoir se forme au sein du SC, entraînant un relargage prolongé du contaminant. Dans le cadre de la contamination au POX, l'application de la terre de foulon ou de l'argile X sous forme de poudre ne permet pas de diminuer significativement ce compartiment réservoir (**Tableau 17**). L'utilisation de suspensions d'argile permet de diminuer significativement l'accumulation de contaminant dans

le SC et ainsi améliorer l'efficacité de décontamination. Aucune différence n'est observée selon la nature de l'argile, contrairement à l'accumulation du contaminant dans le compartiment récepteur (**Tableau 18**).

Pour un contaminant donné, la nature de l'argile utilisée sous forme de suspension va conditionner l'efficacité de décontamination car la capacité de gonflement dépend de la composition des couches de l'argile ainsi que de la nature de ses cations interchangeable et de sa densité (Chemedda et al., 2014; Pusch, 2006).

Le pouvoir adsorbant d'une argile en suspension dépend donc de la nature intrinsèque de cette argile qui peut faire varier du simple au double la quantité de produit non adsorbé disponible pour diffuser à travers la peau.

Le retrait du contaminant par adsorption et déplacement physique avec la suspension n'est pas optimal dans certaines conditions. En effet, lorsque la peau est lésée, l'argile hydratée peut stagner dans la lésion et entraîner une contamination prolongée et une réaction inflammatoire locale (Gerlach et al., 2010). Afin de pallier cet effet indésirable, l'aspect galénique peut être modifié, notamment pour former un hydrogel facilitant le retrait du contaminant et de l'argile. L'alcool polyvinylique (PVA) est un polymère biocompatible qui possède de grandes propriétés mécaniques (Kamarul et al., 2014; Sun et al., 2019). Il sert notamment de support pour d'autres polymères grâce à sa capacité à former un réseau ordonné stable. Ce type de polymère est largement utilisé sur des plaies pour la délivrance de molécules actives favorisant la cicatrisation (Mohseni et al., 2019; Niranjana et al., 2019; Sequeira et al., 2019). Son auto-assemblage se fait en quelques minutes à quelques heures en fonction de sa concentration (Moreau et al., 2016). L'ajout du Kolliphor® 407 (P407) va entraîner une déplétion en solvant qui va favoriser la gélification du PVA. Ce deuxième polymère également non toxique et biocompatible est composé de blocs hydrophiles et hydrophobes ce qui lui confère des propriétés amphiphiles. Une de ses particularités est sa capacité à s'organiser pour former des micelles puis un hydrogel avec l'augmentation de température (Ur-Rehman et al., 2010). L'association des deux polymères permet la formation d'un hydrogel visqueux qui peut être facilement appliqué par étalement avant une polymérisation à température cutanée qui entraîne la formation d'un film qui facilite son retrait (**Figure 57**). Cet hydrogel binaire peut ensuite être potentialisé par l'ajout d'une argile pour une utilisation en décontamination cutanée.

L'enjeu de cette formulation est d'assurer une décontamination efficace à l'aide d'une argile adsorbante, et de faciliter le retrait de l'ensemble de l'argile par arrachage du film. Ce type d'hydrogel a déjà été décrit pour un usage cosmétique : Berings et al., 2013, ont caractérisé un masque détoxifiant à base de bentonite et d'un mélange de PVA et de carbopol.

## 2. Perspectives

Ce travail de thèse a permis de développer une méthodologie simple et robuste permettant d'évaluer et de caractériser le pouvoir décontaminant de suspensions d'argile. Les perspectives qui en découlent sont diverses et dépendent directement des résultats présentés. Il s'agit de développer une formulation innovante d'hydrogel pour s'adapter à l'enjeu de la décontamination des peaux lésées face à divers composés chimiques. Ce travail qui fait l'objet d'une bourse de thèse allouée par la DGA au sein de l'équipe à partir de novembre 2020, va poursuivre 3 objectifs.

1. Le développement d'un hydrogel présentant des propriétés mécaniques permettant son application sur différents types de peau représente un point clef. En effet, un travail de formulation est nécessaire afin de proposer un hydrogel répondant aux exigences climatique du terrain (température et humidité) et aux différents types de lésions (superficielle/profonde, saine/suintante...). Cet hydrogel doit permettre avant tout d'assurer une décontamination efficace grâce à l'ajout de phyllosilicates adsorbants. Pour cela nous avons retenu l'alcool polyvinylique et le poloxamère 407 (Cf chapitre 4 des résultats) qui seront assemblés sous forme d'hydrogel binaire pour assurer le support d'une argile décontaminante. Tout l'enjeu du travail de formulation est de potentialiser le pouvoir adsorbant de l'argile tout en contrôlant les propriétés mécaniques de l'hydrogel.
2. Les formulations développées ainsi que les suspensions et les argiles sous forme de poudre seront évaluées sur des modèles murins. La souris SKH1 est une souris immunocompétente sans poil qui est utilisée pour les études de diffusion cutanée *in vivo*. Différents protocoles seront à mettre en place pour dans un premier temps valider les observations réalisées sur les explants de peau de cochon *ex vivo* ; et dans un second temps d'évaluer les nouvelles formulations. Ce modèle murin peut être utilisé pour la réalisation de plaies de type brûlure du second degré ou plaie excisionnelle, ce qui correspond aux types de lésions majoritairement observées sur le champ d'opération militaire.
3. Un travail d'identification de corrélats de décontamination sera mené, afin de proposer les phyllosilicates les plus efficaces dans le cadre de la décontamination cutanée. Comme présenté dans les résultats de ce travail de thèse, les deux familles d'argiles que nous avons testées ne possèdent pas le même pouvoir décontaminant, que ce soit sous forme de poudre ou de suspension. Il est donc important de caractériser la signature géologique de la seconde argile afin de corrélérer efficacité de décontamination et composition minérale

de l'argile. Cela permettra d'élargir la palette de choix des argiles utilisables dans de situation de décontamination d'urgence. De plus, de nouveaux contaminants doivent être testés pour déceler une éventuelle affinité préférentielle dans le phénomène d'adsorption. Par ailleurs, étant donné l'influence du pH sur les phénomènes de gonflement des argiles, la variation de ce paramètre sera explorée évaluer l'évolution du pouvoir décontaminant.

Le but initial de ce projet était aussi de développer un dispositif de décontamination cutanée innovant qui permet la délivrance d'une dose d'hydrogel décontaminant à base d'argile, utilisable par la population militaire et la population civile. Nous avons imaginé un dispositif médical qui pourrait se présenter sous la forme d'un réservoir souple d'un volume moyen de 500 mL, facilement stockable et transportable (**Figure 59**) pour assurer une décontamination d'urgence rapide de l'ordre de la minute. Des études de stabilité devront être réalisées pour s'assurer de la stabilité du dispositif au cours du temps, notamment en fonction de différentes contraintes de température et d'humidité, ainsi que de l'absence de réactions entre le contenant et le contenu.

Un tel produit de décontamination cutanée pourrait avoir un usage étendu au secteur cosmétique pour la lutte contre la contamination induite par les hydrocarbures aromatiques polycycliques. En effet ces molécules de la famille des composés organiques volatils sont des polluants toxiques pour la peau, présents dans l'atmosphère. L'utilisation de cette méthode de décontamination permettrait de limiter la pénétration de ces molécules toxiques et de désorber celles qui se trouvent au sein de la peau.



**Figure 59** : Gourde souple pouvant servir de réservoir pour la délivrance d'une méthode de décontamination cutanée innovante sous la forme d'un hydrogel.



---

# **Conclusions générales**

---



## Conclusions générales

La décontamination cutanée est une thématique identifiée comme prioritaire par la Direction Générale de l'Armement. En effet, la mise au point de méthodes de décontaminations corporelles à l'aide de formulations innovantes représente un enjeu important dans un contexte de risque de contamination chimique de populations militaires et civiles.

Les études effectuées pendant ce travail de thèse ont permis de développer une suspension aqueuse d'argile pour la décontamination cutanée. Cette formulation a été évaluée pour la décontamination de deux simulants de chimiques de guerre : le VX et l'ypérite. Ces deux toxiques ont, de par leur lipophilie, tendance à s'accumuler dans le stratum corneum qui constitue la couche externe de l'épiderme. Un réservoir se forme donc au sein de la peau ce qui va entraîner un relargage prolongé du contaminant. L'utilisation de la terre de foulon sous sa forme traditionnelle en poudre, permet le retrait du contaminant de la surface cutanée mais l'accumulation du contaminant au sein de la peau persiste. La réalisation de suspensions aqueuses de terre de foulon permet d'augmenter le pouvoir décontaminant de l'argile et ainsi de faire disparaître ce compartiment réservoir. En effet, bien que cette palygorskite ne gonfle pas en présence d'eau, sa capacité d'adsorption va être augmentée car le contaminant est entraîné par l'eau dans les canaux de l'argile, vers de nouveaux sites d'adsorption. L'augmentation du pouvoir décontaminant de la terre de foulon sous forme de suspension n'est pas dépendante de sa concentration, ni de la nature du contaminant. L'efficacité de décontamination du paraoxon et du salicylate de méthyle est la même, ce qui signifie que la liaison du contaminant à l'argile est réalisée de façon non spécifique. Les suspensions aqueuses de terre de foulon peuvent être utilisées pour la décontamination cutanée d'urgence, sans identification préalable du contaminant.

L'évaluation de ces formulations innovantes a été réalisée par la méthode de diffusion *ex vivo* sur des explants cutanés. La technique repose sur l'utilisation du dispositif breveté Vitropharma®, correspondant à des cellules de Franz miniaturisées, qui possède un compartiment receveur à l'interface de l'explant cutané pour mimer la circulation systémique retrouvée sous la peau *in vivo*. L'obtention de peau humaine pour réaliser ces expériences est compliquée d'un point de vue éthique et financier : la peau de cochon est donc utilisée comme modèle prédictif en raison des grandes similitudes histologiques avec la peau humaine. Il a cependant été nécessaire de s'assurer de la validité de ce modèle dans le cadre d'études de décontamination cutanée. La formation d'un compartiment réservoir dans le stratum corneum a été observée pour la décontamination avec la terre de foulon sous forme de poudre, ainsi que sa disparition avec l'utilisation des suspensions aqueuses. Pour les deux types de peaux utilisés, les phénomènes de décontamination cutanée sont identiques malgré une différence significative dans l'épaisseur des couches de la peau. La peau de cochon peut donc être

## *Conclusions générales*

utilisée comme substitut de la peau humaine pour le criblage *ex vivo* de nouvelles méthodes de décontamination cutanée.

Les différences structurales entre les familles d'argile ont été exploitées dans le cadre de la décontamination cutanée avec la méthodologie précédemment décrite. La capacité d'adsorption d'une argile est directement proportionnelle à sa surface spécifique, qui elle dépend de la capacité de gonflement lorsque l'argile se retrouve sous forme de suspension. Une argile reconnue pour ses propriétés adsorbantes a été évaluée en tant que décontaminant cutané en comparaison à la terre de foulon. Bien que sous forme de poudre cette nouvelle argile possède un pouvoir adsorbant moins important que la terre de foulon, la formation de suspensions aqueuses a démontré une supériorité par rapport à celles à base de terre de foulon pour la décontamination en diminuant significativement la quantité de contaminant qui diffuse à travers la peau. Il est possible de réaliser des corrélats de décontamination entre une famille d'argile, sa forme galénique et un décontaminant donné.

L'usage de cette suspension innovante pour la décontamination cutanée a été étendu aux peaux lésées. La rupture de l'intégrité cutanée est une contre-indication à l'application d'une méthode de décontamination à base de matériaux adsorbants ou neutralisants : seule la décontamination abondante à l'eau est recommandée. L'évaluation des suspensions de terre de foulon a démontré une augmentation significative du facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel, dépendante de la concentration en argile des suspensions. Lorsque la viscosité de la formulation augmente, le décontaminant est plus difficile à retirer de la plaie ce qui entraîne une contamination prolongée par les particules d'argiles qui ont adsorbé le contaminant. La réalisation d'essais préliminaires de formulation d'hydrogels permettant la formation de film a été très prometteuse : la température de gélification peut être contrôlée pour être proche de la température cutanée et les essais de toxicité démontrent une bonne tolérance du système par les cellules du derme.

Pour conclure, ce travail a démontré la capacité adsorbante des argiles et leur potentialisation sous forme de suspension dans le cadre de la décontamination cutanée. La mise en place d'une méthodologie robuste et reproductible a permis de comparer plusieurs modèles de peau, d'argiles et de contaminants. La forme galénique a évolué tout au long du projet pour passer de poudres à des suspensions aqueuses et au développement préliminaire d'un hydrogel décontaminant.

---

# Annexes

---

## **1. Caractérisation minérale de la terre de foulon au Synchrotron SOLEIL**

Article soumis à Journal of Clay Science – en révision

## **2. Ligne directrice 428 de l'OCDE**

Absorption cutanée : méthodes *in vitro*

## **3. Développement et caractérisation d'un modèle de souris avec un psoriasis pour l'évaluation de traitements**

Article publié dans Pharmaceutics en août 2020

## **Annexe 1**

### **Caractérisation minérale de la terre de foulon au Synchrotron SOLEIL**

Characterization of Fuller's earth in skin decontamination by  
optical and synchrotron radiation technologies

Soumis à Journal of Clay Science – en révision

---

# Characterization of Fuller's earth used in skin decontamination by optical and synchrotron radiation technologies

Annick Roul<sup>1,3,4</sup>, Alix Danoy<sup>1</sup>, Eric Elkaim<sup>2</sup>, Paul Dumas<sup>2</sup>, Marek Haftek<sup>1</sup>, Fabrice Pirot<sup>1,3</sup> and Bernard Verrier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 5305 – CNRS/UCBL1, LBTI, Lyon, France

<sup>2</sup>Synchrotron SOLEIL, L'Orme des Merisiers, Saint-Aubin, BP 48, 91192 Gif-sur-Yvette, France

<sup>3</sup>Laboratoire de pharmacie galénique industrielle (LGI) ISPB UCBL1 Lyon, France

<sup>4</sup>Direction Générale de la Sécurité Civile et de la Gestion des Crises, Ministère de l'intérieur, Paris, France

## ABSTRACT

Fuller's earth (FE), an alumina silicate compound, chemically inert, abundant in nature, known for its adsorptive properties, provides skin decontamination opportunities for chemical, biological, radiological and nuclear (CBRN) agents. A better appreciation of quality guarantees for its use in decontamination processes for both military and civilian populations is required. Elementary composition, morphologic structure, and phase analysis have been investigated by electron microscopy, combined with updated technologies of the French synchrotron facility, i.e.: X-ray diffraction for powders and infrared spectroscopy. Results of this multimodal approach lead to identification of palygorskite as the main component of the FE studied. Cylindrical rods, organized in fiber bundles, characteristic of palygorskite were identified with electron microscopy. Infrared spectroscopy revealed additional molecular impurities, whereas diffractometry detected quartz traces. Synchrotron technologies are attractive for i) the rapid and non-destructive sample preparation, ii) short acquisition time, in the order of minutes, required to obtain the material's signature. Both geological signature and decontamination efficiency may serve as essential criteria of equivalence in the process of standardization of various FE sources, used for decontamination. Future creation of standards for a safe and reliable composition of FE, efficient in decontamination of the skin is required to consolidate the confidence of potential users.

## KEY WORDS:

Fuller's earth, Synchrotron radiation, palygorskite, equivalence, geological signature

## 36 **1 Introduction**

37 Natural mineral products with adsorptive properties are known for their efficient role in skin  
38 decontamination. Since Prehistory, there are indications for clays mixed with water in order to  
39 cure wounds and soothe irritation as a method of cleansing skin. This might have been due to  
40 their mimicking animals e.g. pachyderm, many of which instinctively use minerals for the  
41 above purposes. In the field of health, certain clays are used in pharmaceutical technology  
42 (Dário et al., 2014) and dermatopharmacy because of their high specific surface area, rheological  
43 characteristics and/or excellent adsorptive capacity. Those are extensively used in the  
44 formulation of various pharmaceutical and cosmetic products (Carretero and Pozo, 2010).

45 Fuller's earth (FE) powder, known for its adsorptive properties (Parsons, 1913), a catch-all  
46 phrase for clay or other fine-grained earthy material, chemically inert, abundant in nature,  
47 provides decontamination opportunities for chemical, biological, radiological and nuclear  
48 agents (Taysse et al., 2007 ; Phuong and Maibach, 2016). FE, formed from weathering residues,  
49 differs from diatomaceous earth, siliceous sedimentary rock essentially composed of  
50 amorphous silica (Natrass et al., 2015), consisting principally of the fossilized skeletal remains  
51 of the diatom (Al-Ghouti et al., 2003). The name of FE was derived from the original use of  
52 earth for removing grease and fat from woolen cloth during the process of fulling. Their  
53 constitution is basically clay mineral, but they can contain others earth minerals not classified  
54 as clay (Favero et al., 2016). Despite their various chemical composition, those hydrated  
55 alumino silicates, containing Mg, Al, Na, Fe may be classified in a few major groups e.g.  
56 smectites, kaolinites and fibrous clays, depending on the layer structure (Bergaya, 2006). All  
57 of those groups can be sub-divided into various species regarding differences between crystal  
58 structures.

59 Actually, FE remains the reference (Ganesan et al., 2010) in skin decontamination, among other  
60 options, for mass casualties, as described in official French and European processes for both  
61 military and civilian populations (Chilcott, 2014). Thus, precise information concerning the  
62 chemical composition of such FE is of importance.

63 The aim of this study is the characterization of FE as provided by the official supplier (NBC-  
64 SYS, France), in its original form, in order to identify a geological signature. Macro and  
65 microanalysis have been performed with updated technologies essentially developed in France  
66 at SOLEIL-Synchrotron; that allows a multimodal approach available to compare each FE with  
67 the next one.

68 SOLEIL-Synchrotron, high technology research infrastructure produces and operates a light of  
69 extreme brilliancy, ranging from a few 5 meV for far infrared radiation to 30 Kev for hard X-  
70 rays, which is used to study matter. Each beamline uses the exceptional properties of  
71 synchrotron radiation (continuity and tunability of the energy, extreme brilliancy, polarization,  
72 coherence) to reach the finest and most varied characteristics of studied materials (electronic,  
73 magnetic, chemical, structural or morphological information).

74 Thus, alternatively to conventional methods and preliminary observations by Scanning electron  
75 microscopy (SEM) using Everhart-Thornley secondary electron detector (SE2) and  
76 Transmission Electron Microscopy (TEM), have been combined with specific techniques  
77 available at SOLEIL-Synchrotron, such as X-Ray diffraction (CRISTAL), an infrared micro-

78 spectroscopy beamline (SMIS), and SEM coupled with Energy Dispersing X-Ray (EDX) to  
79 analyze the composition of this FE in more details.

80 i) X-ray powder diffraction (XRPD) has already been routinely employed in the earth sciences  
81 to characterize the crystallography of rocks, minerals, and phases. Indeed, specific atoms  
82 arrangement of crystalline structure could be carried out by XRPD, one of the most suitable  
83 method for phase analysis and the determination of lattice parameters (Jesche et al., 2016).

84 ii) SMIS (Infrared micro-spectroscopy) allows a diffuse and aleatory analysis of the sample  
85 leading to the identification, quantification and spatial repartition of sample elements. The  
86 brilliancy of beamline is the essential benefit to reach a high spectral quality and spatial  
87 resolution and allowing to work on very small grains.

88 Thus, the hypothesis being put forward is that using such technologies will permit to gain  
89 innovative information about chemical components of FE and their structural arrangements,  
90 such finding being able to propose a geological signature correlated to decontamination  
91 properties.

92

## 93 **2 Materials and Methods**

### 94 **2-1 Materials**

95 FE ( $\rho = 0.7 \text{ kg.m}^{-3}$ ) is presented as a free powder, stored in box of 150 g. (NBC-Sys 42408; St  
96 Chamond, France). Purified water ( $0.055 \mu\text{S.cm}^{-1}$ ) was produced by PURELAB Option before  
97 each set of measurements at 24-25°C. Poly(methyl methacrylate) (PMMA) bulk holder,  
98 borosilicate capillaries, 1 mm diameter (Müller, Schöwalde, D14621, Germany) were used to  
99 analyze the FE.

100

### 101 **2-2 Methods**

102 Composition and physico-chemical studies of FE were performed by XRPD high resolution,  
103 infrared micro-spectroscopy, SEM, while morphological analysis was carried out by electron  
104 microscopy combining SEM and TEM.

105 Natural FE powder samples have been prepared to be repeatable according own specific  
106 features.

107

#### 108 **2-2-1 Synchrotron radiation**

109 The synchrotron radiation light is emitted by relativistic electrons, with a speed close to the  
110 speed of light in vacuum, of very high energy (SOLEIL's nominal energy is 2.75 GeV). The  
111 emission of light is tangential to the electron trajectory, in an extremely fine beam (Kunz,  
112 2013). This synchrotron radiation is channeled on different beamlines. Each one has its  
113 appropriate optics (mirrors, monochromators) to shape the beam (unfocused, micro or nano-  
114 focused modes) and to select a poly or monochromatic beam in its energy range, which is used  
115 to perform the matter analysis.

116

#### 117 **2-2-2 XRPD analysis**

118 Mineralogical analysis of FE powder was performed by XRPD, which diagrams were obtained  
119 with i) a BRUKER D2 Phaser, in the chemistry laboratory (SOLEIL-Synchrotron, Saint Aubin,  
120 France), recorded at room temperature, in the Bragg Brentano configuration operating at Cu

121  $K\alpha$  radiation ( $\lambda=1.5418 \text{ \AA}$ ), 30 kV, 10 mA, with a step size of  $0.02^\circ$  ( $2\theta$ ), in  $15$  to  $95^\circ$  ( $2\theta$ )  
122 range. FE was deposited regularly on a standard PMMA sample holder and placed in the center  
123 of the diffractometer ; ii) on the CRISTAL beamline at SOLEIL-Synchrotron, which undulated  
124 beamline delivers an intense and almost parallel  
125 X-Ray beam well adapted to high angular resolution measurement in the 5 to 30 keV energy  
126 range. The FE diffraction diagrams were collected at  $\lambda = 0.7276 \text{ \AA}$  (17.041 keV), the energy  
127 being selected by means of a double Si (111) monochromator. Prior to the experiment, accurate  
128 value of the energy was obtained by recording an X-ray diffraction pattern of the NBS standard  
129 Lab6. FE was enclosed in a 1 mm glass capillary, which was mounted on a spinner rotating at  
130 300 rpm to obtain good particles averaging. Diffracted X-Rays were recorded in Debye–  
131 Scherrer mode using a 21 Si (111) crystals multi-analyzer.

132 The diagram has been analyzed using the Match software (CRYSTAL Impact GBR, Bonn,  
133 Germany) to identify the crystalline phases of the sample by comparison with diagrams  
134 referenced in the PDF4+ database (International Center for Diffraction Data (ICDD), Newton  
135 Square, PA, USA).

136

### 137 **2-2-3 IR micro-spectroscopy**

138 Infrared micro-spectroscopy analysis was performed on SMIS. FE was dispersed onto an  
139 infrared transparent infrared window (BaF<sub>2</sub>) of 13 mm diameter and 1 mm thickness.

140 Infrared spectra were acquired on isolated particles, using an iN10 infrared micro-spectrometer  
141 from Thermo Fischer, with a Schwarzschild focusing objective of x15, N.A. 0.7 (working  
142 distance (WD) of 16 mm), and equipped with a LN<sub>2</sub>-cooled MCT detector. An aperture of  
143 20x20 microns was used in transmission mode. Data has been recorded with 128 accumulations  
144 at  $4 \text{ cm}^{-1}$  spectral resolutions.

145

### 146 **2-2-4 SEM analysis**

147 SEM, (MEB-FEG ZEISS Supra55VP) coupled with i) Energy Dispersing X-Ray spectroscopy  
148 (EDX) and ii) Everhart-Thornley secondary electron detector (SE2), available at SOLEIL-  
149 Synchrotron, have been used to investigate i) elementary composition and mapping; ii)  
150 topography, morphology, microstructural analysis. This field-emission “gun” microscope (FE-  
151 SEM) operates at 0.02 - 30 keV.

152 i) Spectral images were recorded by SEM/EDX (SDD BRUKER 30 mm<sup>2</sup>) at high voltage (15.0  
153 kV), vacuum  $10^{-6}$  mbar and WD 8.0 mm. In order to perform cartography, the FE-SEM operated  
154 at 5 kV. Mapping is obtained by synchronization of both detectors.

155 ii) High-resolution structure was determined with SEM/SE2, at low voltage (between 1 and 2  
156 kV), WD 7.8 mm.

157 FE powder was deposited on carbon adhesive tape on the sample holder before introducing in  
158 the analysis chamber and measurement without the usual deposits of carbon at the surface of  
159 the sample.

160

### 161 **2-2-5 TEM analysis**

162 TEM was performed on JEOL 1400 accelerating voltage 80 kV on the platform, Centre  
163 Imagerie Quantitative Lyon-Est (CIQLE) (Faculty of medicine, University Lyon 1). Images  
164 were acquired with high-precision camera (8M Pixel), ORIUS GATAN 600 fully integrated

165 with the PC controlled TEM operation system and treated by the image processing software,  
166 Digital micrograph. Five  $\mu\text{L}$  of FE dispersion ( $100 \text{ g.L}^{-1}$ ) were deposited on a specific grid  
167 (Formvar Film-coated Grids), which was then decreased at a pressure  $< 1$  Torr to be analyzed  
168 by collimated electron beam 80 kV.

### 169 3 RESULTS

170 Results obtained on raw samples of FE concern i) the chemical composition and ii)  
171 morphological structure allowing its characterization.

172

#### 173 3-1 Samples preparation

174 As structural analysis of FE requires high quality sample preparation, a special emphasis  
175 concerning sample preparation, dedicated to each technique, has been drawn:

176 1a) FE was deposited regularly on a standard PMMA sample holder and placed in the center of  
177 the diffractometer (Fig.1A).

178 1b) FE was enclosed in a 1 mm glass capillary which was mounted on a spinner rotating at 300  
179 rpm to obtain good particles averaging (Fig.1B).

180 1c) FE was dispersed onto an infrared transparent infrared window (BaF<sub>2</sub>) of 13 mm diameter  
181 and 1 mm thickness (Fig.1C).

182 1d) FE powder was deposited on carbon adhesive tape on the sample holder before being  
183 introduced in the analysis chamber and measured without the usual deposits of carbon at the  
184 surface of the sample (Fig.1D).

185 1e) FE dispersion  $100 \text{ g.L}^{-1}$  was deposited on the specific grid.

186 The FE powder has been directly sampled in its original form.

187

188

189

190

191

192

193

194

195

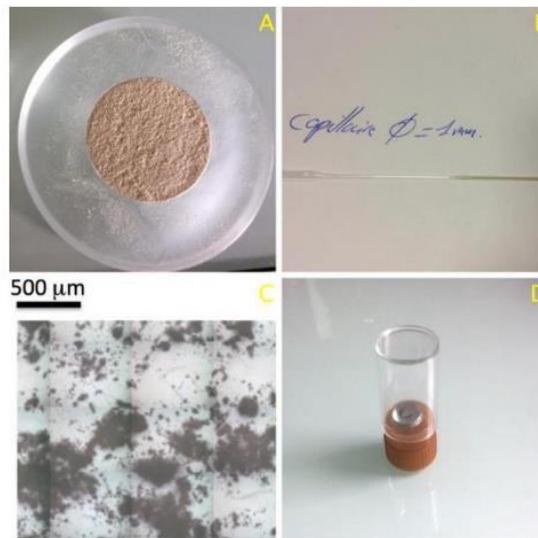
196

197

198

199

200



201 Figure 1: Sample preparation for XRPD laboratory (A), CRISTAL (B), SMIS (C), SEM (D)

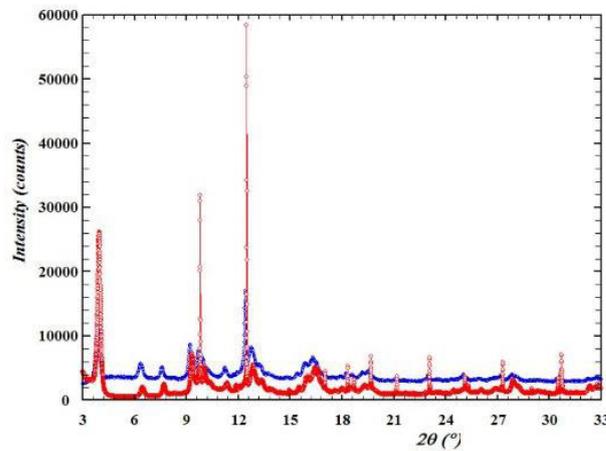
202

#### 203 3-2 Fuller's earth composition

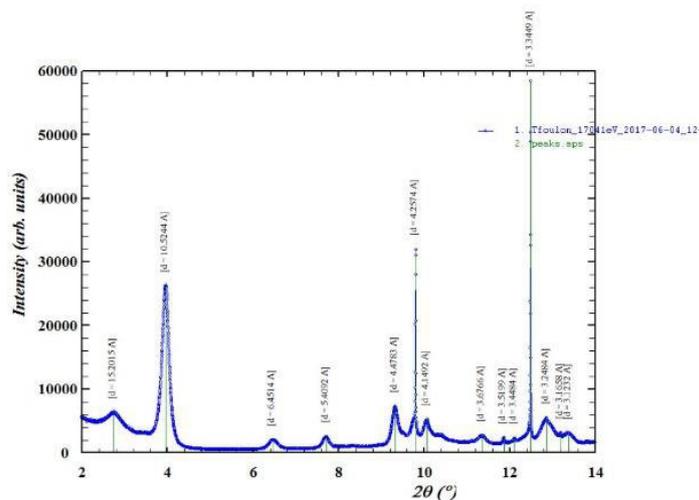
204 Results obtained from XRPD, IR micro-spectroscopy and SEM/EDX correlate to identify the  
205 palygorskite, as the main component of FE, however, additional molecules and unstrained  
206 constituents have been pointed out.

207 **3-2-1 XRPD results**

208 Raw diffraction diagrams from the chemistry laboratory and CRISTAL beamline are presented  
209 in Fig.2. a. Both diagrams i) blue in the Bragg- Brentano geometry ii) red on CRISTAL  
210 beamline provide information on the common reflections, which are similar. However,  
211 CRISTAL diagram reveals a few additional very sharp reflection of quartz (SiO<sub>2</sub>) highlighting  
212 the brilliancy of the synchrotron radiation compared to classical diffraction method. A zoom,  
213 in the range 2° to 14° 2 θ, highlights the corresponding d-values of the sample Fig.2. b. Measure  
214 of intensity (y-axis) versus diffraction angle 2 θ (x-axis) provides information on inter-reticular  
215 distances (d-values) of the structure [directed linked to 2 θ angle via the Bragg relation  $\lambda = 2.d$   
216  $\sin \theta$ ]. This couple intensity (I), inter-reticular distance d (I, d), used to phases identification  
217 by comparison with PDF4+ database (International Center for Diffraction Data (ICDD),  
218 Newton Square, PA, USA), reveals the presence the main phase, the palygorskite (Mg,Al)<sub>2</sub>  
219 Si<sub>4</sub>O<sub>10</sub> (OH)·4(H<sub>2</sub>O) and a non-predominant part of quartz SiO<sub>2</sub> (sharp peaks) (Millot, 2013;  
220 Yalcin & Bozkaya, 1995). Quartz appears irregularly scattered through the palygorskite.



233 Figure 2: a) Diffraction diagrams of Fuller's earth obtained in lab (blue), on CRISTAL (red)

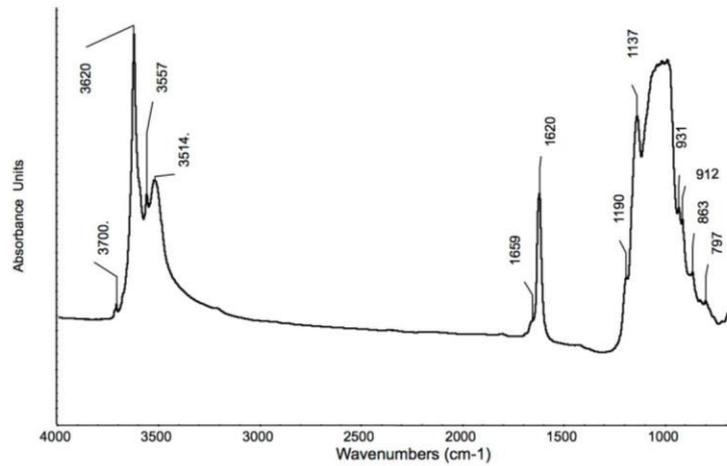


247 Figure 2: b) Zoom of Fuller's earth obtained by XRPD on CRISTAL beamline (d-values)

248

249 **3-2-2 IR micro-spectroscopy results**

250 More than 400 individual particles have been analyzed by SMIS. The spectra were found to be  
 251 identical, in more than 96% observed particles (Fig.3).



264 Figure 3: Infrared spectrum of Fuller's earth particles recorded in the 650-4000 cm<sup>-1</sup>  
 265 frequency domain.

266  
 267 The spectra are close to those published in the literature for palygorskite (Madejová and  
 268 Komadel, 2001; Cheng et al., 2011) while Table I reported the position of the FTIR bands for  
 269 palygorskite and the recorded values.

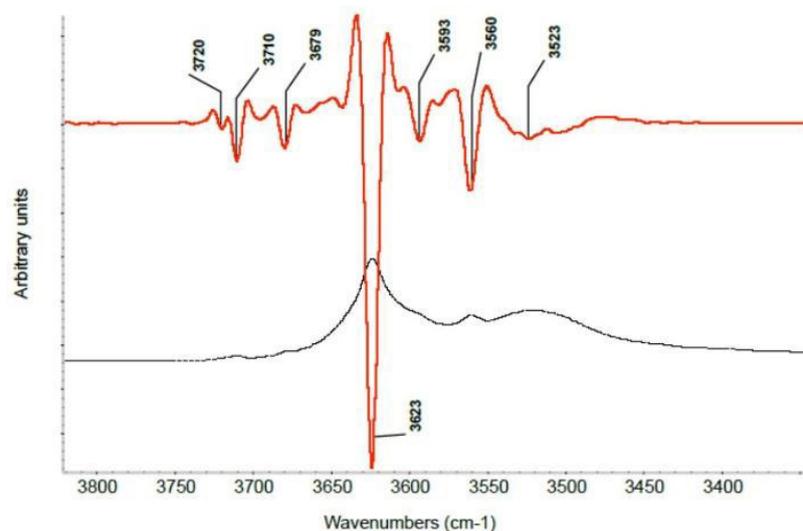
270  
 271

Position (cm <sup>-1</sup> )	Assignment
3615	Al <sub>2</sub> -OH
3581	Mg <sub>2</sub> -OH
3578	Al,Fe <sub>3</sub> +OH
3551	Mg,Fe <sub>3</sub> +OH
3395	Si(OH)Si
3283	Si(OH)Al
1655	H <sub>2</sub> O deformation mode
1635	Si-OH deformation
1200	Si-O-Si
1120	Si-O
1093	Si-O
1035	Si-O
985	Si-O
914	Al <sub>2</sub> -OH
646	Si-O
584	Si-O
512	Octahedral deformation Si-O

272  
 273

Table I: FTIR bands for Palygorskite and the recorded values.

274 However, palygorskite is mixed with other mineral, as additional vibrational bands. More  
 275 specifically, as infrared spectroscopy is quite sensitive on the OH region, between 3200-3800  
 276  $\text{cm}^{-1}$ , a second derivative of the spectra has been processed in order to identify more precisely  
 277 the position of the OH termination inside the FE particle (Fig.4. and table II) (Cai et al., 2007).

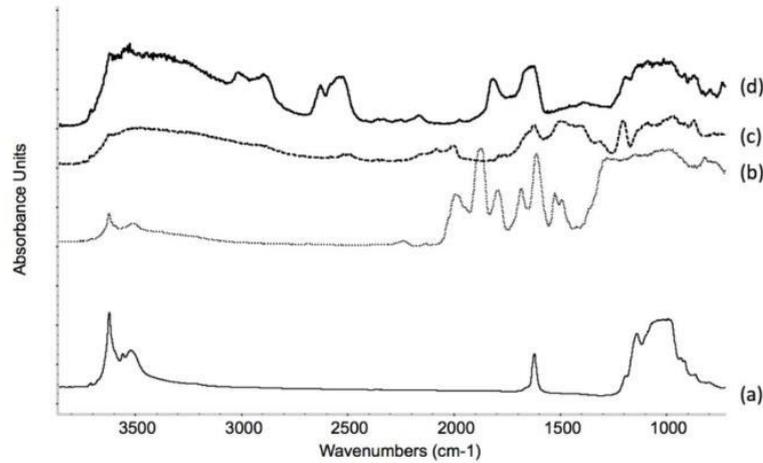


291 Figure 4. Infrared spectrum of Fuller's earth particles in the 3300-3800 frequency region  
 292 (dotted line) and corresponding second derivative, with the band positions.  
 293

Band Position ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tentative Assignment
3720	$\text{Al}_1\text{-OH}$
3710	$\text{Al}_1\text{-OH}$
3679	-
3623	$\text{Al}_2\text{-OH}$
3593	$\text{Mg}_2\text{-OH}$
3560	$\text{Mg, Fe}^{3+}\text{-OH}$
3520	-
1689	-
1662	$\text{Si(OH)Si}$
(shoulder)	
1626	$\text{Si(OH)Al}$
1617	$\text{H}_2\text{O}$ deformation mode
1193	$\text{Si-OH}$ deformation
1136	$\text{Si-O-Si}$
1098	$\text{Si-O}$
1070	$\text{Si-O}$
974	$\text{Si-O}$
930	$\text{Si-O}$
912	$\text{Al}_2\text{-OH}$
861	$\text{Si-O}$
798	$\text{Si-O}$

294  
 295 Table II- Band position and tentative assignment for the Fuller's earth particles.  
 296

297 The high frequency value of the OH stretching mode at  $3700\text{ cm}^{-1}$  points towards an aluminum  
298 terminated laminar sheets. However, the nature of the FE particles is probably complex, since  
299 they are not purified and could have absorbed several contaminants. This is highlighted with  
300 the analysis of individual particles using IR micro-spectroscopy (Fig. 5).

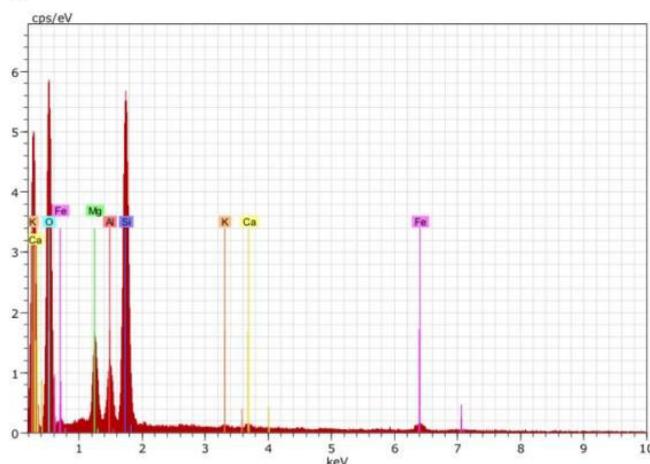


314 Figure 5: Various spectra have been recorded on isolated Fuller's earth particles (b, c and d).  
315 Compared to the most frequently observed spectra (a), additional components have been  
316 included inside these particles.

318 The precise identification of these contaminants and their role in decontamination properties  
319 are out of the scope of this article. They can have various origins, but these spectrums are tools  
320 to demonstrate that IR micro-spectroscopy, at isolated particle level, can indeed revealed the  
321 proportion of particles that have absorbed other components. In the present study, about 3% of  
322 the particles displayed a complex infrared spectrum.

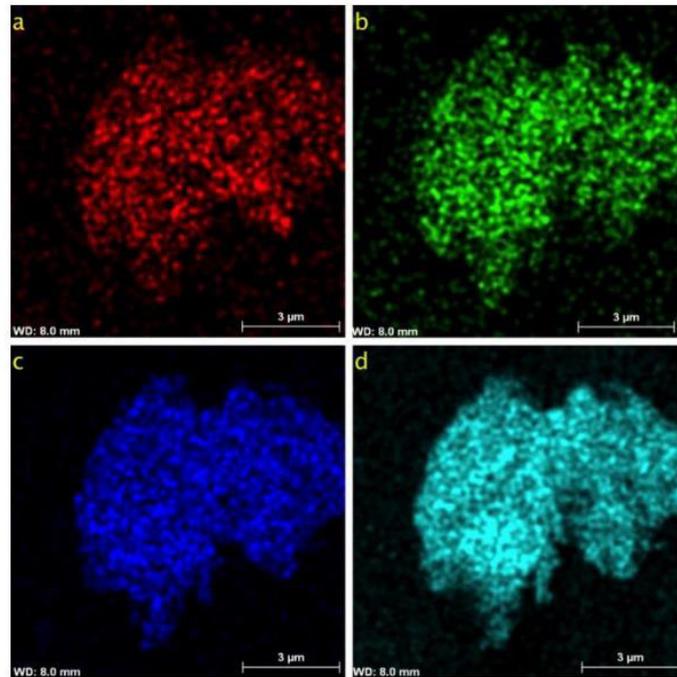
### 323 3-2-3 SEM/ EDX micro-analysis

324 EDX analysis of FE exhibits characteristic X-rays, in energy range (0-15 keV) that spectrum  
325 represents the specific energy for each chemical according their excitation energy e.g.  $K\alpha$ ,  $K\beta$   
326 ( $x$ ) and intensity ( $y$ ) (Fig. 6).



339 Figure 6: Energy-dispersive X-ray analysis representative of the elementary composition in  
340 chemicals.

341 Si, O, Mg and Al constitute the largest part of elements representative of the studied samples:  
342 strong peak for Si, O are followed by weak, faint peaks of Mg Al and Fe, which correlates with  
343 palygorskite's composition (Zucca, 2017). EDX element mapping recorded the two-  
344 dimensional elemental composition of the sample surface of a defined sample section and  
345 consists of the qualitative composition of the main elements, Al, Mg, Si, and O (Fig.7).

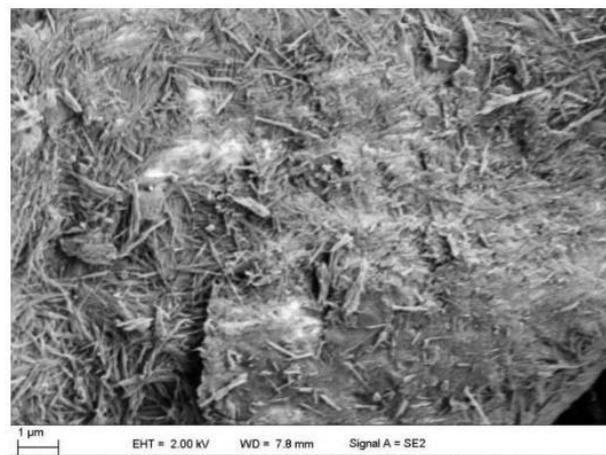


363 Figure 7 a, b, c d: Mapping obtained by EDX for the main components, Al, Mg, Si, O

### 365 3-3 Fuller's earth morphology

#### 366 3-3-1 SEM results

367 SEM reveals (Fig.8) complex surface topography of FE, highlighting multidirectional  
368 disposition of fibrous elements of various lengths, forming a densified interlocked fibrous  
369 texture (Bergaya, 2006).

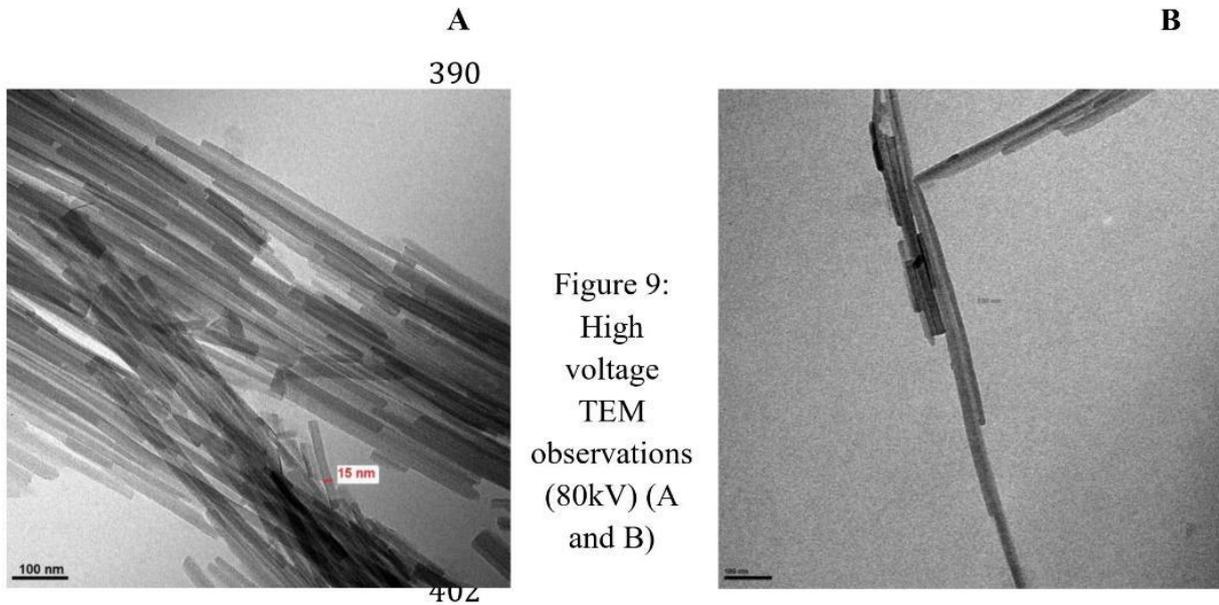


381  
382 Figure 8: Morphology analyzed by SEM/SE2

383 **3-3-2 TEM results**

384 Progressive alignment of rods with various length and diameters of 15 nm are organized in  
385 bundles (Fig.9). It closely looks to palygorskite (Bergaya and Lagaly, 2006). Particles appear  
386 to be cylindrical and not spherical and interrelated in agglomerates (Krekeler and Guggenheim,  
387 2008)

388  
389



403

404 **4 DISCUSSION**

405 Results obtained, combining conventional techniques and synchrotron radiation with both  
406 beamlines SMIS and CRISTAL, correlate to identify impurities wherein the palygorskite is the  
407 main component of the specific FE used in France for its decontamination properties. XRPD  
408 (CRISTAL) (Fig 2.a) reveals a non-clayish component, the quartz ( $\text{SiO}_2$ ), while additional  
409 molecules were pointed out by infrared spectroscopy (SMIS), (Fig. 5 b, c, d). Those components  
410 could have been adsorbed as contaminants or belong to the original composition, this would be  
411 further clarified as the industrial process leading to this commercial FE is not known.  
412 Nevertheless, its fingerprint (Fig. 2b), representative of the palygorskite (Singer and Huertos,  
413 2011) recorded by XRPD, is now referenced in the international data base PDF4+. Combined  
414 to XRPD, SMIS allowed in a few minutes a material signature, especially to characterize  
415 crystalline and amorphous materials in the same time (Shengjie et al., 2013). Results obtained  
416 at SOLEIL-Synchrotron are relevant and will be useful for the intended skin use of this FE  
417 (Cheng et al., 2011). Local information on each grain highlights the heterogeneity of the FE  
418 (SMIS) whereas the identification on CRISTAL obtained from measurement on a macroscopic  
419 sample is thus averaged over millions of grains. The elementary composition (Fig.6) obtained  
420 by SEM/EDX, permits unambiguous correlation of the crystallographic parameters results. The  
421 additional use of electron beam acceleration voltage of 20 kV to detect the K-line of heavier  
422 elements might warrant further attention. SEM/EDX techniques, allow analysis of very small  
423 sections of the particles under observation, this disadvantage has been compensated by a large  
424 observation to cover the samples. Besides high-performance, SOLEIL-Synchrotron techniques

425 provide attractive advantages i) sample preparation of this raw material, in its original form, is  
426 easy, rapid and non-destructive (Fig. 1) ii) the acquisition time ranges in the order of minutes  
427 to obtain a material signature. Nonetheless, limits of each method have to be considered, and  
428 multimodal approach by coupling of techniques improves the outcome quality. As the  
429 palygorskite was successfully recognized by TEM (Fig. 9) (Bergaya, 2006), both electron  
430 microscopy results, SEM and TEM, emphasize that raw dry FE elements noticed by SEM tend  
431 to organize themselves into capillaries when humidified, that could explain the highest  
432 efficiency in decontamination (Roul et al., 2017). It is suggested that nano structural  
433 organization of silicate rods into bundles may be responsible for the efficient sequestration of  
434 water-soluble contaminants. The role of water, suspected to lubricate particles of FE would be  
435 further investigate. Accordingly, the characterization of this FE reveals as main component,  
436 palygorskite and the presence of some residues or contaminants, but it is expected that  
437 geological origin may influence the mineral composition (Chamley, 2013). The palygorskite,  
438 abundant clay is known for its high adsorptive properties (Berhane et al., 2017) and described  
439 by Fersmann's nomenclature (1908-1913) as an isomorphous series between known  
440 magnesium pole (sepiolite) and the unknown aluminum pole, which called para-  
441 montmorillonite (Millot, 2013). Structure proposed by Lapparent (1938) as a layered and  
442 fibrous mineral, highlighting ribbons in the structure; whereas Bradley (1940) suggested a  
443 structure of hollow bricks. In the channels that remain open between the ribbons, water  
444 molecules may enter. The term of attapulgit was applied by Lapparent (1935) to a clay mineral  
445 encountered in Fuller's earth from Attapulgis (USA town), and it was determined a couple of  
446 years later that structure was identical to palygorskite (1954). Palygorskite has been mined for  
447 centuries because of its properties for a wide ranging industrial, medical and pharmaceutical  
448 applications particularly as adsorbents, due to its versatile functionality deriving from the large  
449 surface area, micro porosity characteristic of it (Post and Heaney, 2008). Even if palygorskite,  
450 a hydrous Mg- and Al-rich silicate clay mineral which chemical composition is rather close to  
451 that of some members of the montmorillonite species, its layered structure, discontinuous in the  
452 range size of 10 Å and the development in long rods, emphasize the difference. Further studies  
453 may develop the tetra octahedral model of this palygorskite to explain the influence of cations  
454 positions in the high adsorption of organic compounds (Suárez et al., 2007). This point is  
455 relevant in this study to distinguish those alumino-magnesia silicates that may be either lamellar  
456 or fibrous (Suárez and García-Romero, 2011; Millot, 2013). Adsorptive properties may be  
457 ascribed to the clay mineral, the palygorskite, while the other minerals e.g. quartz may be  
458 regarded as adulterants as described in the petrography of the Fuller's earth (1933). Thus,  
459 palygorskite, according to the presence of different "contaminants" or during their industrial  
460 preparation could have very different adsorptive properties and their applicability in the field  
461 of skin decontamination requires a strict characterization (Elmore & Cosmetic Ingredient  
462 Review Expert Panel, 2003), essentially chemical and mineralogical composition (López-  
463 Galindo et al., 2007). Indeed, high proportion of Si, active in the reconstruction of skin tissues,  
464 providing skin hydration and mitigation of possible skin inflammatory processes (Carretero and  
465 Pozo, 2010), might be relevant to facilitate skin repair. To the opposite, presence of heavy  
466 metals and harmful contents must be avoided or limited to an acceptable level considering  
467 toxicology values.

468 It is hoped that advances in high technology facilitate the development of robust methods to  
469 standardize references of comparison both in geological signature and biological activity  
470 (Yacobi et al., 2014). Considering that a generic product is approved when “therapeutically  
471 equivalent” and interchangeable with the brand name product is reached (Shah et al., 2015), it  
472 is suggest to develop appropriate equivalence criteria to characterize each FE, fitting for  
473 comparison with other FE. The key point will be safety level: agreeing equivalence should be  
474 required for each one during the developmental process or after approval. Therefore, a guide to  
475 set up the methods of generic product approval may help for the quality control and  
476 establishment of the essential characteristic to be declared equivalent and useful for a better  
477 selection of the standardized decontamination agent (Matar et al., 2015). Specifications for  
478 equivalence of the FE need to perform decontamination efficiency onto skin models which will  
479 be developed in further studies (Jung and Maibach, 2015). Future directions will recommend  
480 reliable and robust methods to approve equivalence of various FE in both geological signature  
481 and its efficiency in skin decontamination. New markets could be concluded for FE in the field  
482 of skin decontamination, with other suppliers, requiring basic items to compare them. Boosting  
483 users confidence may be improved by approval of a label or reach the level of medical device  
484 (Joosen et al., 2017) considering regulatory issues in Europe and FDA regulation. Packaging  
485 plays an essential role in ensuring the product in safe condition. It also carries clear information  
486 about how to store and use the product, with information on ingredients as well as potential  
487 risks e.g. inhalation (Wilbourn et al., 1997).

488

## 489 **5 CONCLUSION**

490 Fuller’s earth, a clay mineral, is known for its high adsorptive properties. FE, initially used by  
491 the armies for skin and equipment decontamination has been introduced in skin  
492 decontamination processes for the civilian populations especially, after chemical exposure, e.g.  
493 CWA or TICS (Sellik et al., 2017). It would be appreciated that FE offers the necessary quality  
494 for both safety and harmlessness, for a topical application before testing its efficiency in skin  
495 decontamination, as exemplified by this analysis performed in supplement of basic  
496 information’s. Conventional electron microscopy analysis combined with updated SOLEIL-  
497 Synchrotron techniques XRPD and IR micro-spectroscopy has allowed a detailed  
498 characterization of this FE which correlates successfully with chemical composition obtained  
499 by SEM/EDX whereas morphology structure performed by TEM and SEM highlight the  
500 organization of the fibers. Thanks to SOLEIL-Synchrotron for attractive techniques allowing  
501 easy sample preparation and short acquisition time combining high performance methods to  
502 identify the phases of this FE which main component is the palygorskite.

503 The geological signature of this FE may serve as a standard for further comparison between  
504 various batches or sources of FE. Thus, bioequivalence studies of different FE could be  
505 established combining physico chemical properties, decontamination efficiency and a safety  
506 profile. A social standardized label could be thought and offered to protect and boost user  
507 confidence under control and regulation of academia and authorities.

## 508 **Acknowledgements**

509 The authors would like to thank Mr. Denis Ressenkoff , and Elisabeth Errazuriz-Cerda CIQLE  
510 Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est, Faculté de médecine Lyon-Est, for their concern in

511 support Transmission Electron Microscopy of the Fuller's earth samples for this study.  
512 The authors would like to thank the scientists, Stéphanie Bonnefoy and Karine Chaouche of  
513 SOLEIL-Synchrotron, the laboratory of Chemistry, and SOLEIL for their concern in support  
514 analysis of Fuller's earth samples for this study.  
515 The authors would like to thank the scientists, Francois Nicolas and Stephane Kubky, surface  
516 laboratory manager of SOLEIL, the Division "Expériences SOLEIL" for their concern in  
517 support analysis of Fuller's earth samples for this study.  
518 The authors would like to thank Celine Lory, Industrial Relations Officer at SOLEIL for its  
519 concern in the organization of this work.

## 520 References

- 521 Al-Ghouti, M. A., Khraisheh, M. A. M., Allen, S. J., & Ahmad, M. N. (2003). The removal of  
522 dyes from textile wastewater: a study of the physical characteristics and adsorption  
523 mechanisms of diatomaceous earth. *Journal of Environmental Management*, 69(3), 229–238.  
524 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2003.09.005>
- 525 Bergaya, F. (Ed.). (2006). *Handbook of clay science*. Amsterdam: Elsevier.
- 526 Bergaya, F., & Lagaly, G. (2006). Clays, Clay Minerals, and Clay Science. In F. Bergaya, B.  
527 K. G. Theng, & G. Lagaly (Eds.), *Developments in Clay Science* (Vol. 1, pp. 1–18). Elsevier.  
528 [https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(05\)01001-9](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(05)01001-9)
- 529 Berhane, T. M., Levy, J., Krekeler, M. P. S., & Danielson, N. D. (2017). Kinetic sorption of  
530 contaminants of emerging concern by a palygorskite-montmorillonite filter medium.  
531 *Chemosphere*, 176, 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.068>
- 532 Cai, Y., Xue, J., & Polya, D. A. (2007). A Fourier transform infrared spectroscopic study of  
533 Mg-rich, Mg-poor and acid leached palygorskites. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular  
534 and Biomolecular Spectroscopy*, 66(2), 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2006.02.053>
- 535 Carretero, M. I., & Pozo, M. (2010). Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and  
536 cosmetic industries Part II. Active ingredients. *Applied Clay Science*, 47(3), 171–181.  
537 <https://doi.org/10.1016/j.clay.2009.10.016>
- 538 Chamley, H. (2013). *Clay Sedimentology*. Springer Science & Business Media.
- 539 Cheng, H., Yang, J., Frost, R. L., & Wu, Z. (2011). Infrared transmission and emission  
540 spectroscopic study of selected Chinese palygorskites. *Spectrochimica Acta Part A:  
541 Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 83(1), 518–524.  
542 <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.08.077>
- 543 Chilcott, R. P. (2014). Managing mass casualties and decontamination. *Environment  
544 International*, 72, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.006>
- 545 Dário, G. M., da Silva, G. G., Gonçalves, D. L., Silveira, P., Junior, A. T., Angioletto, E., &  
546 Bernardin, A. M. (2014). Evaluation of the healing activity of therapeutic clay in rat skin  
547 wounds. *Materials Science and Engineering: C*, 43(Supplement C), 109–116.  
548 <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.06.024>
- 549 Elmore, A. R., & Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. (2003). Final report on the safety  
550 assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium  
551 silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapulgite,  
552 bentonite, Fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium  
553 sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite. *International Journal of  
554 Toxicology*, 22 Suppl 1, 37–102.
- 555 Favero, J. da S., Parisotto-Peterle, J., Weiss-Angeli, V., Brandalise, R. N., Gomes, L. B.,  
556 Bergmann, C. P., & dos Santos, V. (2016). Physical and chemical characterization and  
557 method for the decontamination of clays for application in cosmetics. *Applied Clay Science*,  
558 124–125, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.02.022>
- 559 Ganesan, K., Raza, S. K., & Vijayaraghavan, R. (2010). Chemical warfare agents. *Journal of  
560 Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(3), 166. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.68498>
- 561 Grim Ralph E. Petrography of fuller earth (1933). (n.d.). Retrieved from  
562 <https://www.ideals.illinois.edu/bitstream/handle/2142/44678/petrographyofful55726grim.pdf?>

563 sequence=2

564 Jesche, A., Fix, M., Kreyssig, A., Meier, W. R., & Canfield, P. C. (2016). X-Ray diffraction  
565 on large single crystals using a powder diffractometer. *Philosophical Magazine*, *96*(20),  
566 2115–2124. <https://doi.org/10.1080/14786435.2016.1192725>

567 Joosen, M. J. A., van den Berg, R. M., de Jong, A. L., van der Schans, M. J., Noort, D., &  
568 Langenberg, J. P. (2017). The impact of skin decontamination on the time window for  
569 effective treatment of percutaneous VX exposure. *Chemico-Biological Interactions*,  
570 *267*(Supplement C), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.001>

571 Jung, E. C., & Maibach, H. I. (2015). Animal models for percutaneous absorption. *Journal of*  
572 *Applied Toxicology*, *35*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/jat.3004>

573 Krekeler, M. P. S., & Guggenheim, S. (2008). Defects in microstructure in palygorskite–  
574 sepiolite minerals: A transmission electron microscopy (TEM) study. *Applied Clay Science*,  
575 *39*(1), 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.05.001>

576 Kunz, C. (2013). *Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*. Springer Science &  
577 Business Media.

578 López-Galindo, A., Viseras, C., & Cerezo, P. (2007). Compositional, technical and safety  
579 specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products. *Applied Clay*  
580 *Science*, *36*(1–3), 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.016>

581 Madejová, J., & Komadel, P. (2001). Baseline studies of the clay minerals society source  
582 clays. *Clays and Clay Minerals*, *49*(5), 410–432. Retrieved from [https://pubs-](https://pubs-geoscienceworld-org.docelec.univ-lyon1.fr/ccm/article-abstract/49/5/410/48171/baseline-studies-of-the-clay-minerals-society)  
583 [geoscienceworld-org.docelec.univ-lyon1.fr/ccm/article-abstract/49/5/410/48171/baseline-](https://pubs-geoscienceworld-org.docelec.univ-lyon1.fr/ccm/article-abstract/49/5/410/48171/baseline-studies-of-the-clay-minerals-society)  
584 [studies-of-the-clay-minerals-society](https://pubs-geoscienceworld-org.docelec.univ-lyon1.fr/ccm/article-abstract/49/5/410/48171/baseline-studies-of-the-clay-minerals-society)

585 Matar, H., Guerreiro, A., Piletsky, S. A., Price, S. C., & Chilcott, R. P. (2015). Preliminary  
586 evaluation of military, commercial and novel skin decontamination products against a  
587 chemical warfare agent simulant (methyl salicylate). *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 1–8.  
588 <https://doi.org/10.3109/15569527.2015.1072544>

589 Millot, G. (2013). *Geology of Clays: Weathering · Sedimentology · Geochemistry*. Springer  
590 Science & Business Media.

591 Natrass, C., Horwell, C. J., Damby, D. E., Kermanizadeh, A., Brown, D. M., & Stone, V.  
592 (2015). The global variability of diatomaceous earth toxicity: a physicochemical and in vitro  
593 investigation. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)*, *10*.  
594 <https://doi.org/10.1186/s12995-015-0064-7>

595 Parsons, C. L. (1913). *Fuller's earth*. Washington: G.P.O.

596 Phuong, C., & Maibach, H. I. (2016). Recent knowledge: Concepts of dermal absorption in  
597 relation to skin decontamination: Dermal absorption related to skin decontamination. *Journal*  
598 *of Applied Toxicology*, *36*(1), 5–9. <https://doi.org/10.1002/jat.3222>

599 Post, J. E., & Heaney, P. J. (2008). Synchrotron powder X-ray diffraction study of the  
600 structure and dehydration behavior of palygorskite. *American Mineralogist*, *93*(4), 667–675.  
601 <https://doi.org/10.2138/am.2008.2590>

602 Roul, A., Le, C.-A.-K., Gustin, M.-P., Clavaud, E., Verrier, B., Pirot, F., & Falson, F. (2017).  
603 Comparison of four different fuller's earth formulations in skin decontamination. *Journal of*  
604 *Applied Toxicology*. <https://doi.org/10.1002/jat.3506>

605 Sellik, A., Pollet, T., Ouvry, L., Briançon, S., Fessi, H., Hartmann, D. J., & Renaud, F. N. R.  
606 (2017). Degradation of paraoxon (VX chemical agent simulant) and bacteria by magnesium

607 oxide depends on the crystalline structure of magnesium oxide. *Chemico-Biological*  
608 *Interactions*, 267, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.023>

609 Shah, V. P., Yacobi, A., Rădulescu, F. Ș., Miron, D. S., & Lane, M. E. (2015). A science  
610 based approach to topical drug classification system (TCS). *International Journal of*  
611 *Pharmaceutics*, 491(1), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.011>

612 Shengjie, L., Yufang, H., Lei, H., Zhengzhong, S., & Xin, C. (2013). Application of  
613 Synchrotron FTIR Microspectroscopy and Mapping in Analytical Chemistry. *Progress in*  
614 *Chemistry*, 25(5), 821–831.

615 Singer, A., & Huertos, E. G. (2011). *Developments in Palygorskite-sepiolite Research: A New*  
616 *Outlook on These Nanomaterials*. Elsevier.

617 Suárez, M., García-Romero, E., del Río, M. S., Martinetto, P., & Dooryhée, E. (2007). The  
618 effect of the octahedral cations on the dimensions of the palygorskite cell. *Clay Minerals*,  
619 42(3), 287–297. <https://doi.org/10.1180/claymin.2007.042.3.02>

620 Suárez, M., & García-Romero, E. (2011). Advances in the Crystal Chemistry of Sepiolite and  
621 Palygorskite. In *Developments in Clay Science* (Vol. 3, pp. 33–65). Elsevier.  
622 <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53607-5.00002-5>

623 Taysse, L., Daulon, S., Delamanche, S., Bellier, B., & Breton, P. (2007). Skin  
624 decontamination of mustards and organophosphates: comparative efficiency of RSDL and  
625 Fuller’s earth in domestic swine. *Human & Experimental Toxicology*, 26(2), 135–141.  
626 <https://doi.org/10.1177/0960327107071866>

627 Wilbourn, J. D., McGregor, D. B., Partensky, C., & Rice, J. M. (1997). IARC reevaluates  
628 silica and related substances. *Environmental Health Perspectives*, 105(7), 756–759. Retrieved  
629 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1470097/>

630 Yacobi, A., Shah, V. P., Bashaw, E. D., Benfeldt, E., Davit, B., Ganes, D., ... Lane, M. E.  
631 (2014). Current Challenges in Bioequivalence, Quality, and Novel Assessment Technologies  
632 for Topical Products. *Pharmaceutical Research*, 31(4), 837–846.  
633 <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1259-1>

634 Yalcin, H., & Bozkaya, Ö. (1995). Sepiolite-palygorskite from the Hekimhan Region  
635 (Turkey). *Clays and Clay Minerals*, 43(6), 705–717.

636 Zucca, C. (2017). Preliminary microscopic and mineralogical characterization of relict  
637 calcretes in Morocco.

## **Annexe 2**

### **Ligne directrice 428 de l'OCDE – Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques**

Absorption cutanée : méthode *in vitro*

---

## **LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES**

### **Absorption cutanée : méthode *in vitro***

#### **INTRODUCTION**

1. Cette Ligne directrice a été élaborée pour fournir une information sur l'absorption d'une substance d'essai appliquée sur une peau excisée. Elle peut être combinée avec la Ligne directrice de l'OCDE relative à l'absorption cutanée : méthode *in vivo* (1), ou être menée séparément. Il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée (2) pour élaborer des études sur la base de la présente Ligne directrice. Ce document de l'OCDE a été préparé pour faciliter la sélection des procédures *in vitro* appropriées, utilisées selon les circonstances spécifiques, et dans le but de garantir la fiabilité des résultats obtenus avec cette méthode.

#### **CONSIDÉRATIONS INITIALES**

2. Les méthodes de mesure de l'absorption cutanée se divisent en deux grandes catégories: *in vivo* et *in vitro*. Les méthodes *in vivo* d'étude de l'absorption cutanée sont bien connues et fournissent des informations pharmacocinétiques sur un large éventail d'espèces animales. Une méthode *in vivo* est décrite dans une autre Ligne directrice de l'OCDE (1). Les méthodes *in vitro* sont utilisées depuis de nombreuses années pour mesurer l'absorption cutanée. Même si des études de validation formelle des méthodes *in vitro* présentées dans cette Ligne directrice n'ont pas été menées, les experts de l'OCDE ont estimé en 1999 que le volume des données évaluées suffisait pour étayer cette Ligne directrice pour des essais *in vitro* (3). Le document d'orientation de l'OCDE (2) présente des détails supplémentaires appuyant cette décision, dont un certain nombre de comparaisons directes des méthodes *in vitro* et *in vivo*. De même, de nombreuses monographies examinent cette question et offrent un contexte de référence détaillé sur l'utilisation de la méthode *in vitro* (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). Les méthodes *in vitro* mesurent la diffusion d'une substance dans et à travers la peau jusqu'à un réservoir de fluide. On peut utiliser une peau non-viable pour mesurer la diffusion seule, ou une peau fraîche et métaboliquement active pour mesurer simultanément la diffusion et le métabolisme cutané. Ces méthodes conviennent particulièrement pour comparer le transport des substances chimiques dans et à travers la peau, pour différentes préparations, mais elles proposent aussi des modèles utiles pour l'évaluation de l'absorption percutanée chez l'homme.

3. La méthode *in vitro* ne convient pas nécessairement pour toutes les situations et classes de substances, mais on peut l'utiliser pour une première évaluation qualitative de la pénétration cutanée. Dans certains cas, il peut s'avérer nécessaire de compléter l'étude par des données *in vivo*. Pour des informations complémentaires sur les situations où la méthode *in vitro* conviendrait, il est recommandé de consulter le document d'orientation de l'OCDE (2). De même, on peut se reporter au rapport de la réunion des experts de l'OCDE (3).

4. La présente Ligne directrice présente des principes généraux pour mesurer l'absorption cutanée et la diffusion d'une substance d'essai à partir de peau excisée. Dans ce contexte, la peau de nombreuses espèces de mammifères, y compris l'homme, peut être utilisée. Les propriétés de perméabilité de la peau sont conservées après l'excision et le prélèvement, dans la mesure où c'est le *stratum corneum* non-viable qui constitue le principal obstacle à la diffusion ; aucune forme de transport actif des substances chimiques

à travers la peau n'a jamais été identifiée. En revanche, il a été établi que la peau pouvait métaboliser certaines substances au cours de l'absorption percutanée (6), mais ce processus ne limite pas la dose réellement absorbée, même si elle est susceptible d'affecter la nature du produit qui passe ensuite dans le sang.

### **PRINCIPE DE L'ESSAI**

5. La substance d'essai, le cas échéant radiomarquée, est appliquée à la surface d'un échantillon de peau séparant les deux chambres d'une cellule à diffusion. La substance chimique reste sur la peau pendant un temps donné et dans des conditions spécifiques, avant d'être retirée selon une procédure de nettoyage appropriée. Au cours de l'étude, on échantillonne le fluide receveur à des moments donnés, puis on l'analyse pour y rechercher la substance d'essai et/ou des métabolites.

6. Lorsque des systèmes métaboliquement actifs sont utilisés, les éventuels métabolites de la substance d'essai peuvent être analysés selon les méthodes appropriées. A la fin de l'expérience, la distribution de la substance d'essai est déterminée et ses métabolites sont quantifiés, le cas échéant.

7. Dans les conditions appropriées, décrites dans cette Ligne directrice et le document d'orientation associé (2), on mesure l'absorption d'une substance d'essai au cours d'une période de temps donnée en analysant le fluide receveur et la peau traitée. La substance d'essai restant sur la peau doit être considérée comme étant absorbée, à moins qu'il soit démontré que l'on puisse déterminer l'absorption sur la seule base des valeurs relatives au fluide receveur. L'analyse des autres éléments (matières récupérées par nettoyage de la peau et matières restant à l'intérieur des couches dermiques) permet d'enrichir l'évaluation des données, en précisant notamment l'évacuation totale de la substance d'essai et le pourcentage de récupération.

8. Pour démontrer les performances et la fiabilité du système d'essai dans le laboratoire chargé de l'étude, les résultats relatifs aux substances chimiques de référence pertinentes doivent être tenus disponibles et être conformes à la littérature publiée pour la méthode utilisée. Pour répondre à cette exigence, on peut procéder à un essai simultané de la substance d'essai et d'une substance de référence appropriée (présentant de préférence une lipophilicité proche de celle de la substance d'essai), ou proposer un historique approprié relatif à un certain nombre de substances de référence présentant une lipophilicité différente (par exemple, la caféine, l'acide benzoïque et la testostérone).

### **DESCRIPTION DE LA MÉTHODE D'ESSAI**

#### **Cellule à diffusion**

9. Une cellule à diffusion se compose d'un compartiment donneur et d'un compartiment receveur entre lesquels on place la peau (la Figure 1 présente une cellule à diffusion de conception classique). La cellule doit répondre à plusieurs objectifs : assurer une bonne étanchéité sur le pourtour de la peau, permettre un échantillonnage aisé et un bon mélange de la solution dans le compartiment receveur en contact avec le dessous de la peau, et garantir le maintien de la température voulue au niveau de la cellule et de son contenu. Des cellules à diffusion statique ou dynamique peuvent indifféremment être utilisées. Normalement, les compartiments donneurs sont laissés sans occlusion pendant l'exposition à une dose finie d'une préparation d'essai. Toutefois, pour les applications infinies et pour certains scénarios avec des doses finies, l'occlusion du compartiment donneur peut être envisagée.

### **Fluide receveur**

10. L'emploi d'un fluide receveur compatible avec des éléments physiologiques doit être privilégié, mais d'autres fluides peuvent être utilisés à condition que ce choix soit justifié. La composition précise du fluide receveur doit être fournie. La bonne solubilité de la substance d'essai dans le fluide receveur doit être démontrée, de façon à garantir qu'il ne fait pas obstacle à l'absorption. En outre, le fluide receveur ne doit pas affecter l'intégrité de la préparation cutanée. Dans un système dynamique, la vitesse de l'écoulement ne doit pas gêner la diffusion de la substance d'essai dans le fluide receveur. Dans un cellule statique, le fluide doit être remué en permanence et échantillonné régulièrement. Si le métabolisme entre également dans le cadre de l'étude, le fluide receveur doit garantir la viabilité de la peau pendant toute la durée de l'expérience.

### **Préparations de la peau**

11. On peut utiliser indifféremment de la peau d'origine humaine ou animale. Il est reconnu que l'emploi de la peau humaine dépend de considérations et conditions d'ordre éthique nationales et internationales. L'utilisation d'une peau viable est préférable, mais une peau non-viable peut aussi être utilisée dès lors que son intégrité est démontrée. Des membranes d'épiderme (séparées par procédé enzymatique, chimique ou à la chaleur) ou certaines strates de peau (d'une épaisseur généralement comprise entre 200 et 400 µm) préparées avec un dermatome, peuvent être utilisées. Des épaisseurs de peau complètes peuvent être utilisées, mais les épaisseurs excessives (environ > 1 mm) doivent être évitées, sauf si elles sont spécifiquement requises pour examiner la substance d'essai dans les couches de la peau. Les différents choix effectués (espèce retenue, site anatomique et technique de préparation) doivent être justifiés. Des données acceptables pour un minimum de quatre essais répétés par préparation d'essai doivent être fournies.

### **Intégrité de la préparation cutanée**

12. Il est essentiel que la peau soit correctement préparée. Toute manipulation inappropriée peut endommager le *stratum corneum*, auquel cas il convient de contrôler l'intégrité de la peau préparée. Si le champ de l'étude englobe le métabolisme de la peau, une peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les plus courts délais, et dans des conditions propres à soutenir l'activité métabolique. De manière générale, la peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les 24 heures, mais la période de stockage acceptable peut varier selon le système enzymatique impliqué dans la métabolisation et les températures de stockage (13). Lorsque les préparations de peau ont été stockées avant utilisation, des éléments établissant qu'elles ont conservé toutes leurs fonctions doivent être présentés.

### **Substance d'essai**

13. La substance d'essai est le produit dont on étudie les caractéristiques de pénétration. Dans l'idéal, cette substance d'essai doit être radiomarquée.

### **Préparation d'essai**

14. La préparation de la substance d'essai (c'est-à-dire la préparation pure, diluée ou le mélange contenant la substance d'essai à appliquer sur la peau) doit être identique (ou représenter un substitut réaliste) aux produits auxquels peuvent être exposés l'homme ou les autres espèces cibles. Toute modification par rapport à la préparation « d'usage » doit être justifiée.

### **Concentrations et formulations des substances d'essai**

15. Normalement, plusieurs concentrations de la substance d'essai sont utilisées dans les formulations habituelles, de façon à couvrir une gamme réaliste d'expositions humaines potentielles. De la même manière, on peut envisager d'étendre l'étude à un éventail de formulations classiques.

### **Application sur la peau**

16. Dans les conditions normales de l'exposition humaine aux produits chimiques, l'exposition porte généralement sur des doses finies. Par conséquent, il convient d'utiliser des quantités correspondant à une exposition humaine potentielle, soit généralement 1 à 5 mg/centimètre carré pour une substance solide ou jusqu'à 10 µl/centimètre carré pour les liquides. La quantité retenue doit être justifiée par les conditions d'utilisation attendues, les objectifs fixés pour l'étude, ou les caractéristiques physiques de la préparation d'essai. Par exemple, des applications infinies sur la surface de la peau peuvent être envisagées s'il s'agit d'étudier une exposition à des volumes importants par unité de surface.

### **Température**

17. La température a une incidence sur la diffusion passive des produits chimiques (et ainsi sur leur absorption cutanée). Par conséquent, la cellule à diffusion et la peau doivent être maintenues à une température constante proche de la température normale de la peau, soit  $32 \pm 1$  °C. Selon la conception de la cellule, la température du bain ou du bloc de chauffage pourra varier, l'objectif étant de maintenir la peau et le compartiment receveur à leur norme physiologique. De préférence, l'humidité doit être maintenue entre 30 et 70 pour cent.

### **Durée de l'exposition et échantillonnage**

18. L'exposition de la peau à la préparation d'essai peut durer tout le temps de l'expérience, ou moins longtemps (par exemple, pour correspondre à un type spécifique d'exposition humaine). La peau doit être lavée, à l'aide d'un agent lavant approprié, pour éliminer les excédents de la préparation d'essai, et les produits de rinçage utilisés doivent être collectés pour analyse. La procédure de retrait de la préparation, qui dépend des conditions d'utilisation envisagées, doit être justifiée. Normalement, une période d'échantillonnage de 24 heures est nécessaire pour permettre une caractérisation adéquate du profil d'absorption. Sachant que l'intégrité de la peau peut commencer à se détériorer au-delà de 24 heures, la durée d'échantillonnage ne doit normalement pas excéder 24 heures. Cette durée n'est pas nécessaire pour les substances d'essai qui pénètrent rapidement la peau, mais pour celles qui pénètrent lentement, des temps plus importants peuvent se révéler nécessaires. La fréquence d'échantillonnage du fluide receveur doit permettre d'établir une représentation graphique du profil d'absorption de la substance d'essai.

### **Procédures terminales**

19. Tous les éléments du système d'essai (compartiment donneur, produits de rinçage de la surface de la peau, préparation cutanée et compartiment/fluide receveur) doivent être analysés et le niveau de récupération déterminé. Dans certains cas, il peut être nécessaire de fractionner la peau entre la zone exposée et celle placée sous le rebord de la cellule, et entre le *stratum corneum*, l'épiderme et les différentes strates du derme, pour procéder à des analyses séparées.

### **Analyse**

20. Dans toutes les études, un niveau de récupération approprié doit être atteint (à savoir, une moyenne de  $100 \pm 10$  pour cent de la radioactivité, tous les écarts devant être justifiés). La quantité de

substance d'essai dans le fluide receveur, la préparation cutanée, les produits de rinçage de la surface de la peau et des appareils, doivent être analysés selon des procédures appropriées.

## **RÉSULTATS ET RAPPORT**

### **Résultats**

21. L'analyse du fluide receveur, la distribution de la substance d'essai dans le système d'essai et le profil d'absorption dans le temps doivent être présentés. Dans des conditions d'exposition à une dose finie, la quantité récupérée dans le nettoyage de la peau, la quantité présente dans la peau (et dans les différentes couches dermiques si celles-ci ont fait l'objet d'une analyse) et la quantité présente dans le fluide receveur (taux et quantité ou pourcentage de la dose appliquée) doivent être calculées. Parfois, l'absorption cutanée peut être exprimée à partir des seules données relatives au fluide receveur. Toutefois, lorsque de la substance d'essai reste dans la peau à la fin de l'étude, il peut être nécessaire de l'inclure dans la quantité totale absorbée (voir le document d'orientation de l'OCDE, paragraphe 66). Dans des conditions d'exposition à une dose infinie, les données peuvent permettre de calculer une constante de perméabilité ( $K_p$ ). Dans ce dernier cas, le pourcentage absorbé n'est pas pertinent.

### **Rapport d'essai**

22. Le rapport d'essai doit préciser les conditions établies dans le protocole, justifier le choix du système d'essai utilisé, et également contenir les informations suivantes :

Substance d'essai :

- état physique ; propriétés physico-chimiques (au minimum, poids moléculaire et  $\log P_{oe}$ ), pureté (pureté radiochimique) ;
- informations d'identification (par exemple, numéro de lot) ;
- solubilité dans le fluide receveur.

Préparation de l'essai :

- formulation et justification de l'utilisation ;
- homogénéité.

Conditions expérimentales :

- sources et site de la peau, méthode de préparation, conditions de stockage avant utilisation, pré-traitement éventuel (nettoyage, traitement antibiotique, etc.), mesures de l'intégrité de la peau, état métabolique, justification de l'utilisation ;
- conception de la cellule à diffusion, composition du fluide receveur, vitesse d'écoulement du fluide receveur ou temps et procédures d'échantillonnage ;
- détails de l'application de la préparation d'essai et quantification de la dose appliquée ;
- durée de l'exposition ;
- détails du retrait de la préparation d'essai de la peau (par exemple, rinçage de la peau) ;
- détails de l'analyse de la peau et des techniques de fractionnement employées pour mettre en évidence la distribution dans la peau ;
- procédures de nettoyage de la cellule et du matériel ;
- méthodes d'essai, techniques d'extraction, seuils de détection et validation de la méthode analytique.

Résultats:

- récupération totale de l'expérience (dose appliquée  $\equiv$  produits de rinçage de la peau + peau + fluide receveur + produits de rinçage de la cellule) ;
- tableau indiquant la récupération de chaque cellule dans chaque compartiment ;
- profil d'absorption ;
- tableau indiquant les données relatives à l'absorption (sous forme de taux, de quantités ou de pourcentages).

Discussion des résultats.

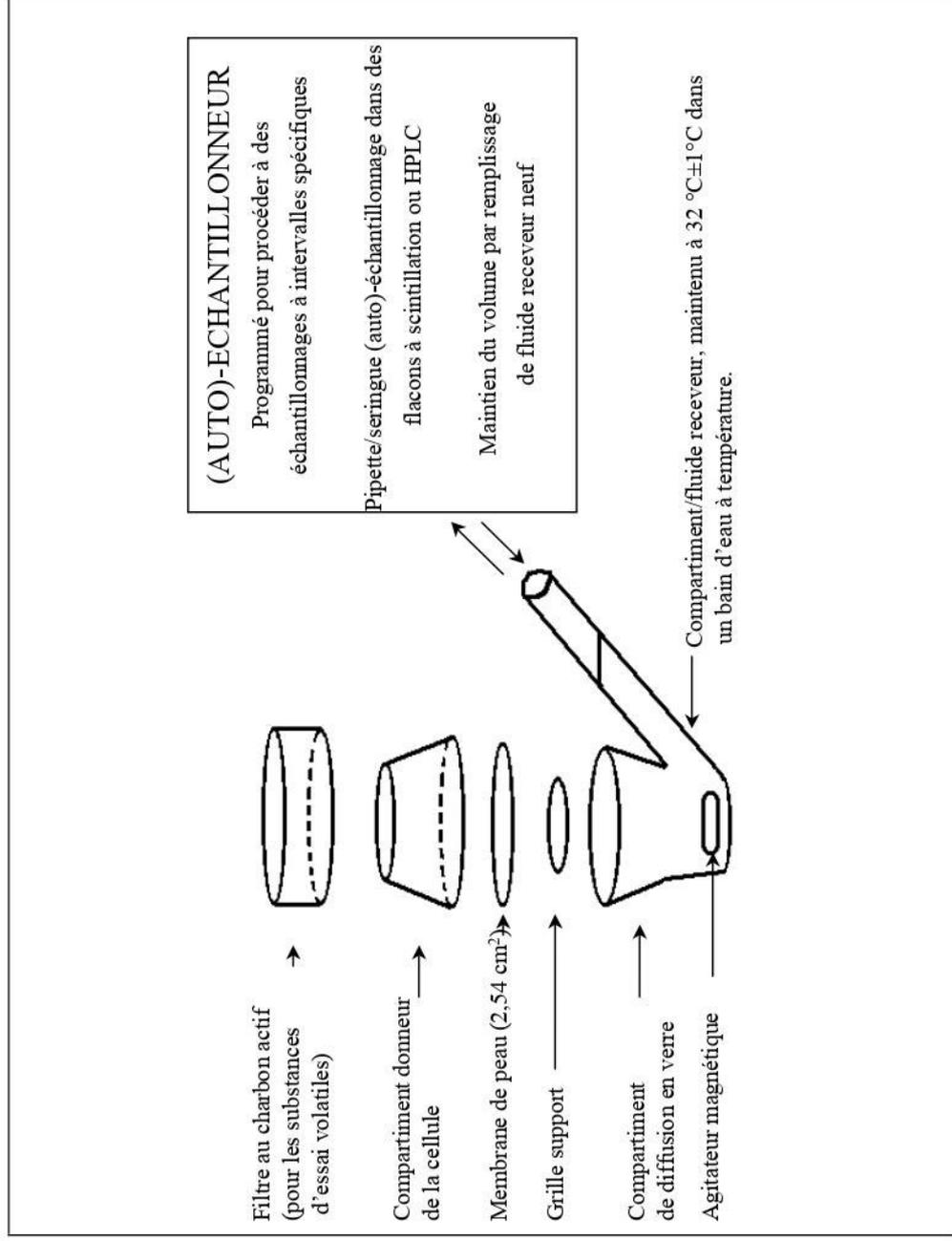
Conclusions.

### **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) OCDE (2004). Ligne directrice 427 – Absorption cutanée : méthode *in vivo*. OCDE, Paris.
- (2) OCDE (2004). Document d'orientation de l'OCDE pour la conduite des études d'absorption cutanée. OCDE, Paris.
- (3) OCDE (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OCDE, Paris.
- (4) Kemppainen BW et Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- (5) Bronaugh RL et Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*, RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.
- (6) Bronaugh RL et Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (7) Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des produits chimiques (1993). Monographie No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Bruxelles.
- (8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, *Fd Chem Tox*, 37, 191-205.
- (9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.
- (10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR et al. (1996). Methods for assessing percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.
- (11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

- (12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.
- (13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

Figure 1 : Exemple de cellule à diffusion statique classiquement utilisée pour la conduite d'études d'absorption percutanée *in vitro*



ANNEXEDÉFINITIONS

Dose non absorbée : la quantité retirée par nettoyage de la surface de la peau après exposition et toute quantité présente sur le couvercle non-occlusif, y compris toutes les quantités volatilisées au cours de l'exposition.

Dose absorbée : (*in vitro*) la masse de substance d'essai atteignant le fluide receveur (ou la circulation systémique) dans une période de temps donnée.

Dose absorbable : (*in vitro*) la quantité présente sur ou dans la peau après nettoyage.

## **Annexe 3**

### **Développement et caractérisation d'un modèle de souris avec un psoriasis pour l'évaluation de traitements**

Advanced characterization of Imiquimod-induced psoriasis-like mouse model

Pharmaceutics 2020; DOI: [10.3390/pharmaceutics12090789](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090789)

---

La rédaction de cet article fait suite à la parution d'un numéro spécial de la revue **Pharmaceutics** dédié aux « Nouvelles approches pour l'administration de médicaments par voie cutanée ». Les travaux présentés ont été réalisés au cours d'une thèse au sein de l'équipe et n'ont pas fait l'objet d'une publication. Ma participation à l'écriture a été nécessaire en temps qu'« experte de l'étude du passage transcutané » pour compléter les connaissances des autres auteurs, plutôt basées sur l'aspect « nanoparticulaire ». Bien que cet article n'ait pas de lien direct évident avec le sujet de ma thèse, ma contribution dans l'écriture a été entière et m'a permis d'approfondir mes connaissances dans l'étude de la caractérisation des modèles d'études *in vivo* disponibles pour étudier le passage transcutané de molécules actives.

Article

# Advanced Characterization of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Mouse Model

Mehwish Jabeen <sup>1</sup>, Anne-Sophie Boisgard <sup>1</sup>, Alix Danoy <sup>1</sup> , Naima El Kholti <sup>1</sup>, Jean-Paul Salvi <sup>2</sup>, Roselyne Boulieu <sup>2,3</sup>, Bérengère Fromy <sup>1</sup>, Bernard Verrier <sup>1</sup> and Myriam Lamrayah <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> UMR 5305: Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7 passage du Vercors, 69367 Lyon CEDEX 07, France; mehwish.jabeen@ibcp.fr (M.J.); boisgard.as@gmail.com (A.-S.B.); alix.danoy@ibcp.fr (A.D.); naima.elkholti@ibcp.fr (N.E.K.); Berengere.fromy@ibcp.fr (B.F.); Bernard.verrier@ibcp.fr (B.V.)

<sup>2</sup> UMR CNRS 5305, Pharmacie Clinique, Pharmacocinétique et Evaluation du Médicament, Université de Lyon, Université Lyon 1, 69373 Lyon CEDEX 08, France; Jean-paul.salvi@univ-lyon1.fr (J.-P.S.); roselyne.boulieu@univ-lyon1.fr (R.B.)

<sup>3</sup> Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Laboratoire de Biologie Médicale Multi Sites du CHU de Lyon, unité de Pharmacocinétique Clinique, 69002 Lyon, France

\* Correspondence: myriam.lamrayah@ibcp.fr

Received: 3 July 2020; Accepted: 18 August 2020; Published: 20 August 2020



**Abstract:** Many autoimmune disorders such as psoriasis lead to the alteration of skin components which generally manifests as unwanted topical symptoms. One of the most widely approved psoriasis-like animal models is the imiquimod (IMQ)-induced mouse model. This representation mimics various aspects of the complex cutaneous pathology and could be appropriate for testing topical treatment options. We perform a thorough characterization of this model by assessing some parameters that are not fully described in the literature, namely a precise description of skin disruption. It was evaluated by transepidermal water loss measurements and analyses of epidermis swelling as a consequence of keratinocyte hyperproliferation. The extent of neo-angiogenesis and hypervascularity in dermis were highlighted by immunostaining. Moreover, we investigated systemic inflammation through cytokines levels, spleen swelling and germinal centers appearance in draining lymph nodes. The severity of all parameters was correlated to IMQ concentration in skin samples. This study outlines new parameters of interest useful to assess this model. We highlight the skin barrier disruption and report a systemic inflammatory reaction occurring at distance both in spleen and lymph nodes. These newly identified biological endpoints could be exploited to investigate the efficacy of therapeutic candidates for psoriasis and more extensively for several other skin inflammatory diseases.

**Keywords:** psoriasis; imiquimod; mouse model; transepidermal water loss; angiogenesis; spleen; lymph nodes; imiquimod quantification in skin

## 1. Introduction

Nearly 3% of the world population suffers from inflammatory skin diseases such as atopic dermatitis and psoriasis, making them highly prevalent disorders known for their significant influence on the patient's quality of life [1]. Psoriasis is a chronic topical disorder characterized by local inflammation, epidermal hyperplasia, leukocyte infiltration and increased vascularity in dermis [2]. This immune-mediated disease entails a dysregulated interplay between immune cells and keratinocytes. While the pathogenesis is not fully understood, intense research has been ongoing to explore the underlying mechanisms involved.

Several animal models mimicking human psoriasis have been developed and utilized over the years. In mice, the topical application of imiquimod (IMQ), a ligand of Toll-like receptors (TLR) 7 and 8,

has been reported to induce psoriasis-like dermatitis [3]. It is a rapid and convenient model that allows the elucidation of underlying mechanisms and the evaluation of new therapies against psoriasis. It has been demonstrated that the IMQ-treated mouse model closely resembles human plaque-type psoriasis with respect to skin erythema, thickening, scaling, epidermal alterations (acanthosis, parakeratosis), and neo-angiogenesis, as well as to the inflammatory infiltrate consisting of T cells, neutrophils and dendritic cells [4]. The IMQ-treated mouse model is one of the most widely exploited models to study psoriasis [5]. In previously conducted studies, psoriasis area severity index (PASI) score, ear thickness measurements, histological staining, splenic involvement and the role of inflammatory cytokines have been very well established in this model [3,4,6]. This model has already been successfully exploited for ex vivo or in vivo screening of various conventional topical formulations [7] as well as novel drug nanovectors, such as poly(lactic acid) [8] or poly(lactic-co-glycolic acid) [9] nanoparticles, liposomes [10], lipid-carrier based gels [11] or  $\beta$ -cyclodextrin complexes [12]. However, there are certain parameters like skin barrier disruption, systemic inflammation, or the correlation between symptoms severity and skin concentration in IMQ that are not fully described for this model in the literature. The present study provides a deeper insight in the characterization of the IMQ-treated mouse model by exploring these parameters that have been well established in human psoriasis, unlike in mice, in addition to conventional ones.

It is well-known that the skin can be functionally and structurally altered by psoriasis. The impairment of skin barrier function is already described for psoriasis in mouse model [13]. However, there are not many studies that discuss the extent to which psoriasis actually modulates the skin barrier function [7]. There is a need to assess the changes in the cutaneous profiles of the intact and psoriatic skins. For this reason and in order to evaluate the disruption of skin barrier, the trans-epidermal water loss (TEWL) was measured in both phenotypes. TEWL is a non-invasive method that determines the amount of water lost ( $\text{g/m}^2\text{h}$ ) from the skin. In case of skin barrier disruption, the amount of water evaporating through the epidermis will increase, therefore increasing the TEWL values. Thus, this parameter can be used as a standard to measure the integrity of skin barrier [14,15].

Vascular endothelial cells are also known to be active participants in the psoriatic inflammatory process [16]. The platelet endothelial cell adhesion molecule PECAM/CD31 is highly expressed at the lateral junctions of endothelial cells in existing and newly formed blood and lymphatic vessels, making it a useful and commonly evaluated endothelial cell marker [17–19]. In addition, PECAM/CD31 plays a role in angiogenesis, platelet aggregation, homeostasis, and in the maintenance of vascular endothelial barrier function [19]. As a second marker, the presence of CD34 positive endothelial cells has been observed in psoriasis since this transmembrane protein is involved in the adhesion phenomenon of blood vessels [20–23]. Thus, we used both anti-CD31 and anti-CD34 staining to confirm the usefulness of these parameters in the IMQ mouse model for the study of angiogenesis and dermal vascularity changes.

Next, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) is one of the key players in the pathogenesis of psoriasis [24–26]. It is considered to be an important target for the development of psoriasis therapies as it has been found to be active on psoriatic keratinocytes [27,28]. Miyoshi et al. reported that the inhibition of STAT3 is effective against psoriatic phenotype occurrence in transgenic mice with constitutively active STAT3 (K5.Stat3C) as well as in psoriatic patients [29]. Thus, the staining of this marker could be a useful indicator of the progression of psoriasis in the IMQ-induced mouse model and subsequently for a potential screening of therapeutic inhibitors.

Another well-documented fact regarding psoriasis is the systemic inflammatory process occurring in the lymph nodes and spleen. As a secondary lymphoid organ, the spleen is an important marker to study the systemic inflammatory process and immune response [30]. Similarly, the importance of lymph nodes in immune mediated diseases such as psoriasis cannot be ignored. To our knowledge, there has been several studies on the usage of these secondary lymphoid organs as inflammatory markers but only a few were able to correlate these changes with the severity of inflammation in psoriasis. Here,

in order to determine the possibility of this correlation to be a marker of psoriasis severity, the changes in spleen and lymph nodes were reported along with the staining of germinal centers.

Above all, the IMQ quantification in the skin samples using high performance liquid chromatography (HPLC) technique adds to the originality of this research work. This aimed to relate the outbreak profile of the monitored parameters with the absorbed concentration of the drug in skin. Although the IMQ-induced mouse model is the most well-established tool to study psoriasis, this is the first study that correlates the IMQ concentration with the progression of psoriasis. This study shows the usefulness of the chosen parameters, which include: (i) the extent of skin barrier damage, (ii) the systemic inflammation, (iii) the expression of vascular endothelial markers and (iv) the inflammatory changes in lymph nodes related to quantification of IMQ in skin. Ultimately, this paper highlights the relevance of controlling these novel parameters when studying psoriasis pathogenesis and, consequently, when developing novel pharmaceutical therapeutics.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Twenty male BALB/cByJ mice between 7 to 8 weeks old were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and housed at the Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES, ENS Lyon, France) for seven days prior to experimentation. All animals were handled according to the institutional regulations and guidelines. The study and procedures were approved by the Ethical Committee of Rhône-Alpes for the Animal Experimentation (CECCAPP, Lyon, France) under the identification code ENS\_2014\_033, approved on 20 June 2014.

### 2.2. Imiquimod Induced Psoriasis

The same protocol as employed by van der Fits et al. [4] was followed for the induction of psoriasis-like lesions in mice. Briefly, the mice were shaved and depilated on their back using a Brav Mini Clipper razor (Wahl, Sterling, ILL, USA) and commercially available depilatory cream (Veet<sup>®</sup>, Reckitt Benckiser Group, Slough, England). The experimental group was treated daily with application of 62.5 mg of commercially available 5% IMQ cream (Aldara, MEDA Pharmaceuticals, Solna, Sweden) on the depilated back and right ear of each mouse. Thus, the total mass of IMQ distributed daily to each mouse is 3.125 mg. This dose has been empirically determined [4] and already demonstrated to cause reproducible and optimal skin inflammation in this model in various publications [7,27,31–33]. The control group was treated similarly with Lanette cream containing cetyl stearyl alcohol (BASF, Ludwigshafen, Germany). The animals were divided into five groups ( $n = 4$ ), including three experimental mice and one control mouse, for each day of euthanasia (day 2, 3, 4, 6 and 8).

After sacrificing the mice, skin ear samples, spleen and both inguinal lymph nodes were collected. Skin and ear sampled were then fixed in 4% *v/v* paraformaldehyde diluted in phosphate buffer saline overnight, followed by paraffin embedding. Five  $\mu\text{m}$  sections were then cut using a microtome (Rotary Microtome Model 1212, Leica, Wetzlar, Germany). For each mouse, an 8 mm skin sample was also harvested using a sterile skin punch and immediately flash-frozen in liquid nitrogen and then stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. Quantification of Imiquimod in Skin

IMQ was extracted from mouse skin using a protocol adapted from De Paula et al. [34]. Briefly, skin samples were shredded in an extraction medium composed of 70% methanol–30% ammonium acetate buffer (pH 4.5, 100 mM). Samples were then sonicated thrice for 30 s each using an ultrasound probe (FB15060, Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). Finally, samples were filtered through a 0.40  $\mu\text{m}$  pore-size membrane filter and stored at 4  $^{\circ}\text{C}$  until HPLC analysis.

The HPLC system consisted of a 2795 separation module (Waters, Agilent, Santa Clare, CA, USA) a Waters 2996 UV-DAD detector and the Waters Empower software system. Chromatographic separations

were carried out on a Kinetex<sup>®</sup> 5 µm C18 100Å (150 × 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Elution was performed using a gradient of two mobile phases. Phase A consisted of acetate ammonium buffer (5 mM, pH 3.85) and phase B was acetonitrile. Gradient started with 80% phase A during 6 min, then decreased from 80 to 65% for 1 min and remained at 65% from minute 7 to 16. After 16 min, the gradient increased back to 80% of phase A for 1 min and remained at 80% for 3 min. Flow rate was 0.7 mL/min, the volume of injection was 20 µL and the analyses were carried out at room temperature (RT). The analysis runtime was 20 min and the detection wavelength was set at 254 nm.

The described procedure was validated according to ICH guidelines (Topic Q2B, 1996) using spiked samples of different concentrations of IMQ in skin extracts. The calibration curve was linear in the concentration range from 0.5 to 100 µg/mL. The regression line equation calculated by the least-squares method was  $y = 164,548.7x + 7909.5$  with a correlation coefficient ( $r$ ) of 0.9999 and slope RSD ( $n = 3$ ) of 3.23%.

#### 2.4. Psoriasis Area Severity Index (PASI) Score Evaluation

The PASI clinical scoring system was used to assess the inflammatory status of the mice dorsal skin for all the 8 days. It included the visual examination of the following three parameters: erythema (redness), induration (thickness) and desquamation (scale) on the back skin of each mouse. Each parameter was given a score between 0 and 4 (0-none, 1-slight, 2-moderate, 3-marked, 4-very marked) leading to a cumulative score from 0 to 12. The evaluation was done independently by two researchers ( $n = 6$  for each parameter) and the mean of values was then calculated.

#### 2.5. Ear Thickness Measurements

For all the 8 consecutive days, the ear thickness measurements for both ears of each mouse were performed using a micrometer (Türlen Anytime Tools, Granada Hills, CA, USA) in µm and the mean of values was calculated ( $n = 15$  for day 1 and decreased subsequently to  $n = 3$  for day 8).

#### 2.6. Histology

The dorsal skin and ear samples of each mouse were stained with Masson's Trichrome staining to evaluate the detailed histological features of psoriasis. Briefly, the skin and ear samples were deparaffinized and the staining was performed using the hematoxylin solution, mixture of orange-G, ponceau acid fuchsin and light green coloring agent using the standard procedure. The samples were then observed under a light microscope (Eclipse Ti-E inverted microscope, Nikon, Minato-ku, Japan) and obtained images were analyzed using ImageJ software version 1.53c (NIH, Bethesda, MD, USA).

For each section, a representative area was selected in order to assess inflammatory aspects of the skin based on both epidermal thickness and inflammatory cells infiltration. The epidermal thickness values for all the three mice of each day was measured using ImageJ software through area and length measurements. The same procedure was repeated for the control group. The measurements were done independently by two researchers ( $n = 6$ ) and statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post hoc analysis. One randomly selected picture per day has been presented in this paper.

#### 2.7. Phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (pSTAT3) Staining

The overexpression of pSTAT3 in the psoriatic skin was determined by immunofluorescence. The skin samples were then stained with primary antibody anti-pSTAT3 (Tyr705) (1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) following the standard procedures and localized by a secondary anti-rabbit antibody Alexa-Fluor 647 (1:500, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The sections were also stained with DAPI (1:100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) before mounting. The stained slides were observed under a fluorescence microscope (Eclipse Ti-E inverted microscope, Nikon, Minato-ku, Japan). One representative image per day has been shown in this paper.

### 2.8. Trans-Epidermal Water Loss (TEWL)

The skin barrier function of each mouse was assessed before euthanasia. Following mouse anesthesia using isoflurane, the measurements of TEWL were recorded in  $\text{g/m}^2\text{h}$  using the Aquaflux device (Biox Systems Ltd., London, UK). The areas considered for the measurements included back, both flanks and both ears. The evaluation was done independently by two researchers ( $n = 10$ ) and the mean of values was then calculated. The values for the affected and control areas were compared and statistically analyzed using a one-way ANOVA coupled with Dunnett multiple comparison post hoc analysis.

### 2.9. Vascular Endothelial Markers Staining

The expression of the vascular markers CD31 and endothelial cells CD34 was assessed by immunofluorescence staining using the rabbit anti-CD31 (1:50, ab28364, Abcam, Cambridge, UK) and the rat anti-CD34 (1:50, ab8158, Abcam) primary antibodies. The formalin preserved skin samples of the psoriatic and naive mice were stained. Sections of 5  $\mu\text{m}$  thickness were cut, deparaffinized in methylcyclohexane, and rehydrated in solutions of graded ethanol. Sections were then immersed in citrate buffer 10 mM citric acid (pH 6) at 95 °C for 30 min to unmask the antigenic sites and followed by the immersion in blockaid (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) at RT to block the non-specific binding sites. Sections were then incubated with primary antibodies at 4 °C overnight and subsequently treated using the secondary antibody mix including anti-rabbit Alexa-Fluor 647 (1:500, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and anti-rat FITC (Jackson ImmunoResearch, Cambridge, England). The sections were also stained with DAPI (1:100, Vector Laboratories) before mounting. Negative controls consisted of adjacent sections from each sample that were processed without the primary antibodies. The analysis of stained sections was performed using a fluorescence microscope (Eclipse Ti-E inverted microscope, Nikon). The images were then treated using ImageJ and one random image per day was selected.

### 2.10. Quantification of Inflammatory Cytokines in Serum and Skin

Blood was collected using the retro-orbital route from the anesthetized mice (using isoflurane) before euthanasia. Samples were then centrifuged twice for 10 min at 16,000 $\times$  g and supernatants were preserved after each centrifugation. The final supernatant obtained was stored at  $-80$  °C until further analysis.

Protein extraction was performed on frozen skin biopsies following the protocol described by Amsen et al. [35]. Briefly, skin samples were crushed in the lysis buffer using the Eppendorf fitting pestle (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA), incubated at 4 °C and then sonicated for 10 s thrice. The supernatant was extracted after the centrifugation at 19,000 $\times$  g, for 15 min at 4 °C and then stored at  $-20$  °C before further analyses.

Quantification assay for the following inflammatory cytokines interleukin IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17A and TNF- $\alpha$  was performed on both skin and serum samples using the ELISA kits (ELISA Ready-SET-GO, eBioscience, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

The statistical difference between each day was determined using one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison post hoc analysis where,  $n = 3$  for experimental group of each day and  $n = 4$  for control group.

### 2.11. Spleen Length and Mass

Following the euthanasia of mice, the spleens were carefully removed. Apart from visual examination, the length of each spleen was determined using a scale in cm and the spleen weight was recorded in g using a digital balance (AE163, Mettler, Columbus, OH, USA).

The measurements are expressed as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$  for experimental group and  $n = 4$  for control). The values for the affected and control mice were then statistically analyzed using one-way ANOVA test followed by Dunnett multiple comparison post hoc analysis.

### 2.12. Lymph Nodes Staining

The two inguinal lymph nodes from each mouse were harvested, placed in Optimum cutting temperature medium (OCT) and immediately flash frozen in liquid nitrogen for germinal center staining. The OCT frozen lymph nodes were cut in 6  $\mu\text{m}$  sections using a cryostat (CM 3050S, Leica, Wetzlar, Germany). After mounting the sections on slides, immunofluorescence staining was performed following the protocol given by Mastelic Gavillet et al. [36] and Lofano et al. [37]. Briefly, the fixation of slides using acetone was followed by the blocking of non-specific binding sites using blockaid (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) at room temperature (RT) for 30 min. The slides were then incubated for 30 min using the primary antibody mix, consisting of purified anti-mouse IgD (1:200, Biolegend, San Diego, CA, USA) and PNA biot (1:100, Biotinylated Peanut Agglutinin). IgG goat anti-rat AF488 and Cy3-Streptavidine (1:100, Life Technologies) were then used as secondary antibodies. To confirm the staining of germinal centers, negative control from each sample was processed without the primary antibody mix. Finally, the slides were mounted with the Vectashield mounting medium without DAPI (Vector Laboratories) and were observed under fluorescence microscope (Eclipse Ti-E inverted microscope, Nikon).

The images of all stained lymph nodes were then analyzed using ImageJ software. The measurements of the area, length and width of each lymph node was made and compared  $n = 3$  for experimental group of each day and  $n = 4$  for control group and statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison post hoc analysis. The number of germinal centers for each lymph node was also noted. One representative image was selected for each day.

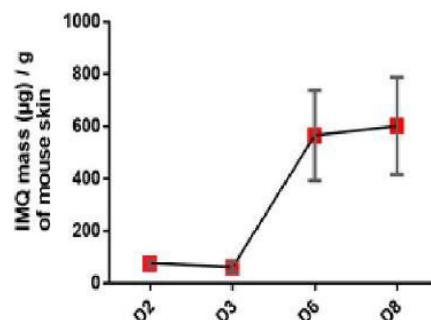
### 2.13. Statistical Analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  SD whereas, for each day  $n = 3$  for the experimental group and  $n = 1$  for the control group for each day of euthanasia. Data was statistically analyzed using GraphPad Prism Version 7.0 software (San Diego, CA, USA). The statistical difference between groups was analyzed using one-way ANOVA tests followed by specific multiple comparison post-hoc tests as mentioned with each observed parameter individually.

## 3. Results

### 3.1. Relation of Imiquimod Concentration to the Severity of Symptoms

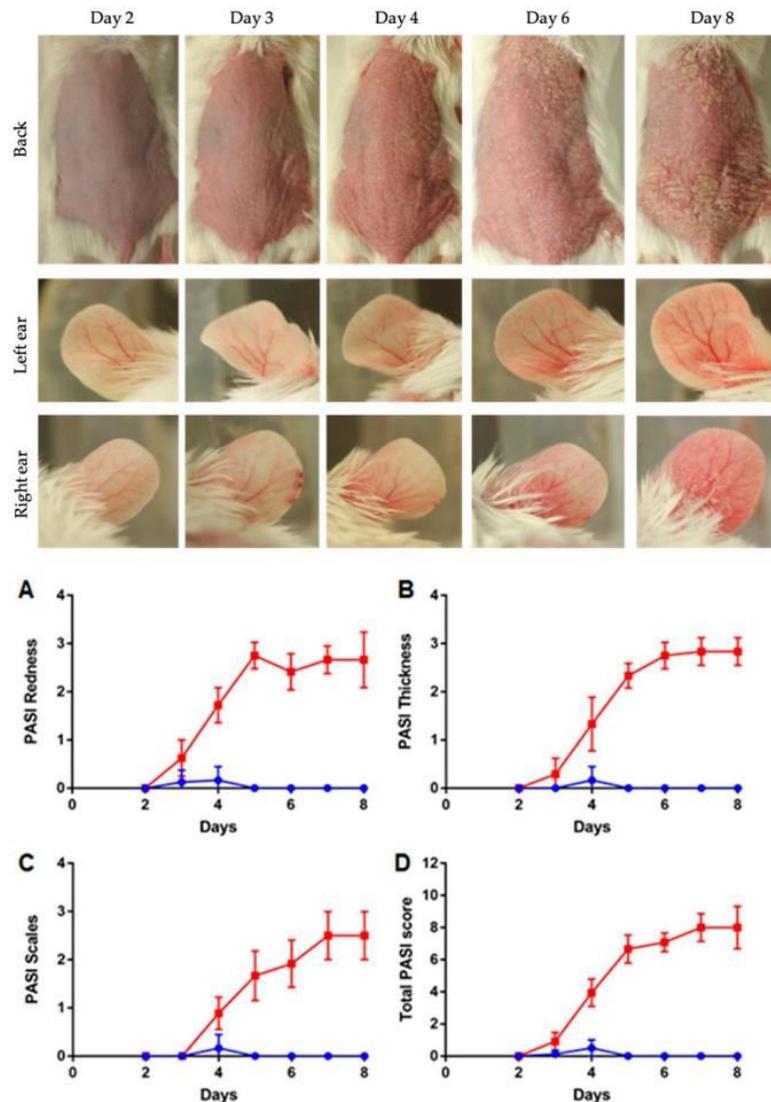
The results obtained from HPLC showed that the IMQ is quantified in skin from day 2 around 100  $\mu\text{g/g}$ . An increase is observed at day 6 to 8 where the concentration reached 600  $\mu\text{g/g}$  (Figure 1).



**Figure 1.** Evaluation of IMQ concentration in mouse skin in the course of IMQ-induced psoriasis-like dermatitis. Values are presented as mean  $\pm$  SD.

### 3.2. Severity of Skin Inflammation

The signs of erythema, thickness and scales on the back skin were seen two or three days after the application of IMQ. All the three parameters along with the cumulative score showed the gradual increase in the observed physical factors with the maximum score at day 8 as compared to the control group (Figure 2, up and down). One mouse died during the adaptation week so there was no control for day 2.

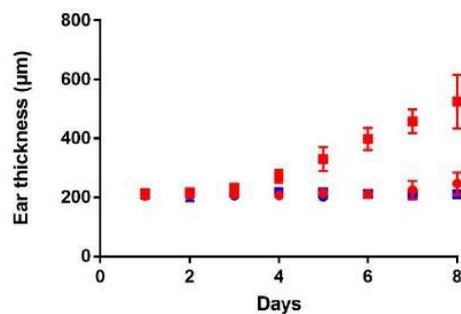


**Figure 2.** (up) Evaluation of dorsal skin and ears following IMQ cream application, from day 2 to day 8. Left ear was negative control, with no IMQ applied. (down) Evaluation of PASI score in the course of IMQ induction of psoriasis-like dermatitis. Observed criteria are skin redness (A), thickness (B), the presence of scales (C) and total PASI score (D). Psoriatic mice are presented with red squares, control mice with blue rounds. Data is presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 15$  for day 1 and decreased subsequently to  $n = 3$  for day 8).

### 3.3. Ear Thickness Measurements

The application of IMQ on the right ear for 8 consecutive days caused a continuous increase in thickness starting from day 5 until the end of the experiment due to the inflammation process (red squares, Figure 3). Contrarily, on the left ear, control ear without treatment, no change in ear thickness

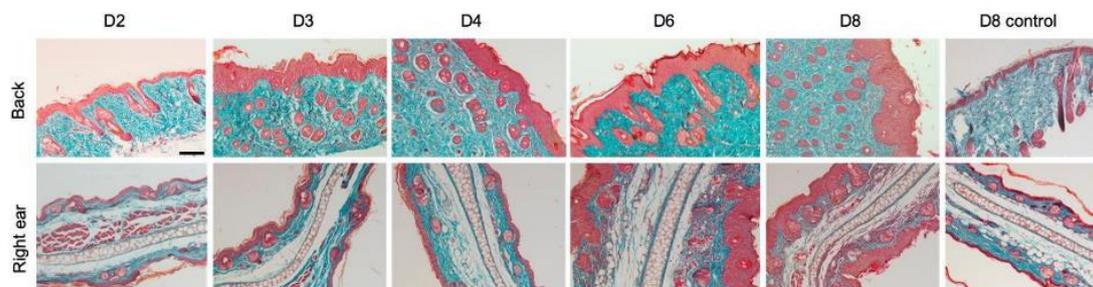
was observed for 8 days (red rounds). For the control group, both right (blue squares) and left (blue rounds) ear measurements were done, and no change was observed for 8 days.



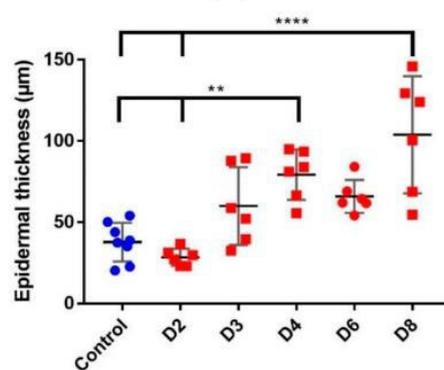
**Figure 3.** Evaluation of ear thickness during 8 days. Experimental group (daily IMQ application on the right ear) is shown in red squares and the control (left ear with Lanette application) is shown in red rounds; For control group, without any topical application, right ear is shown in blue squares and left ear in blue rounds. Data is presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 15$  for day 1 and decreased subsequently to  $n = 3$  for day 8).

### 3.4. Increased Epidermal Thickness and Infiltration of Keratinocytes

The histological observation of the Masson's trichrome stained sections of ear and dorsal skin confirmed the results observed with the PASI score and ear thickness measurements. At the microscopic level of IMQ-treated skin and ears, there was an increase in the epidermal thickness and infiltration of keratinocytes. However, the control group showed an intact skin with no signs of thickness and infiltration (Figure 4).



(A)

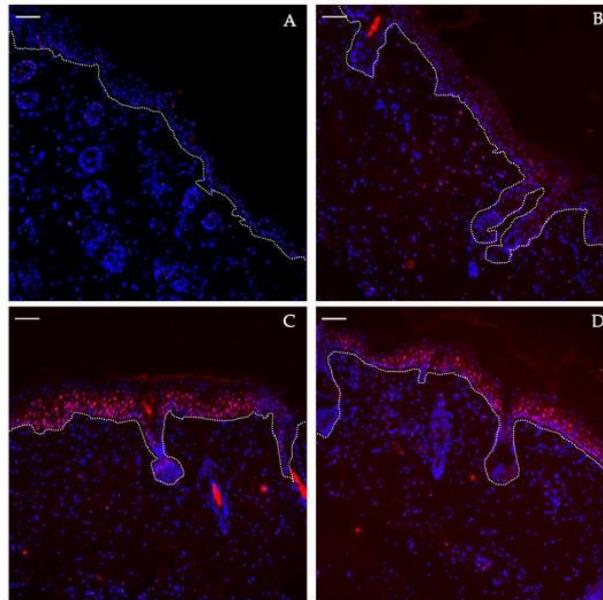


(B)

**Figure 4.** (A) Histological examination by Masson's trichrome staining of back and right ear samples (scale bar = 100  $\mu$ m for each image). (B) Measurement of epidermal back thickness for 8 days of IMQ application; measurements were made by two different persons on 3 images, for each day ( $n = 3$ ) and statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .

### 3.5. Expression of pSTAT3 Proteins

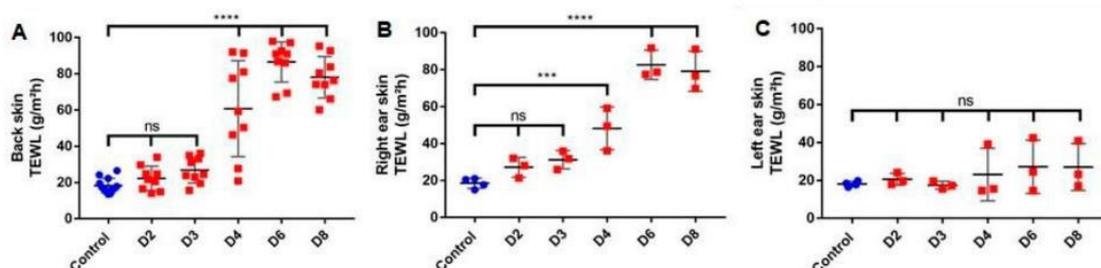
The psoriatic skin slides stained with anti-pSTAT3 clearly reveals the signal for pSTAT3 proteins found in the basal layer of epidermis on days 6 and 8. On the contrary, they are not expressed in the control skin samples (Figure 5).



**Figure 5.** pSTAT3 staining evaluation on dorsal skin in the course of IMQ-induced psoriasis-like dermatitis at day 2 (A), day 4 (B), day 6 (C) and day 8 (D). The dotted white line represents the dermo-epidermal junction with epidermis upwardly. pSTAT3 protein appears in red and cell nuclei in blue. Scale bar = 50  $\mu$ m.

### 3.6. Skin Barrier Disruption

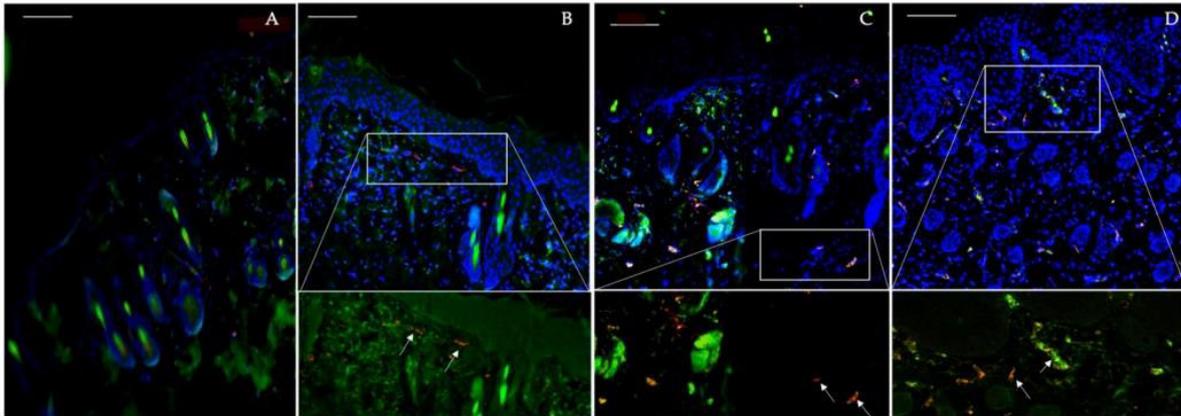
The experimental results for TEWL measurements of the back showed identical results from three different sites including left flank, right flank and upper back. A significant increase of TEWL values from 20  $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$  to approximately 80  $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$  was observed starting from day 4 of IMQ application. This result indicates the disruption of the epidermal barrier caused by psoriasis overtime. Likewise, the TEWL measurements for the right ear (treated with IMQ) showed a significant increase, whereas, the TEWL values for the left control ear (without IMQ) did not increase statistically during all the experimental days (Figure 6).



**Figure 6.** TEWL evaluation during IMQ induction of psoriasis-like dermatitis. TEWL was measured thrice at 3 spots for each mouse back (3 times on the left flank, 3 times on the right flank and 3 times on the upper back) ( $n = 3$ , except for control where  $n = 4$ ) (A). TEWL was also measured on both ears, right ear with IMQ treatment (B) and left ear as control (C) ( $n = 3$ , except for control where  $n = 4$ ). Results were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*\*\*,  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

### 3.7. Dermal Hypervascularity and Angiogenesis

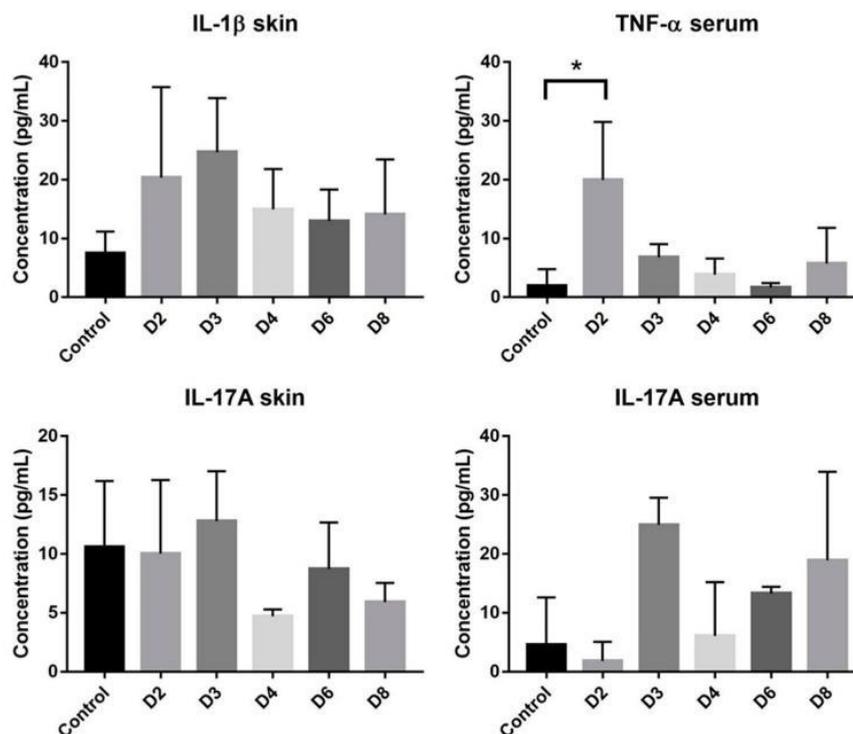
The immunofluorescence staining of vascular and endothelial markers started appearing in the dermal layer from day 4 and was observed in the days 6 and 8 as well (Figure 7). The expression of their signal at these days can be very well related to the literature which reports increased dermal vascularity and angiogenesis in the pathogenesis of this disease.



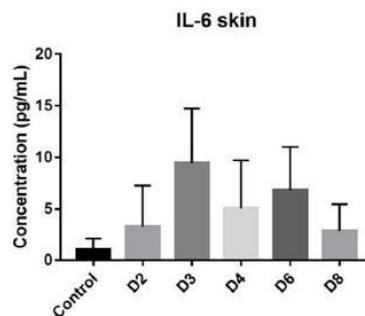
**Figure 7.** Endothelial markers evaluation in the course of IMQ-induced psoriasis-like dermatitis. Day 2 (A), Day 4 (B), Day 6 (C) and Day 8 (D). Blood vessels are presented in red indicating CD31, endothelial cells in green indicating CD34 and cell nuclei in blue by DAPI. Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 3.8. Inflammatory Cytokines

Cytokines produced by T cells are predominant mediators of skin pathology in psoriasis. Increased cytokines concentration was observed in case of IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-17A in skin samples. In blood samples, increased concentration was observed only with IL-17A and TNF- $\alpha$ . However, only the increase of TNF- $\alpha$  in blood at day 2 was significant (Figure 8).



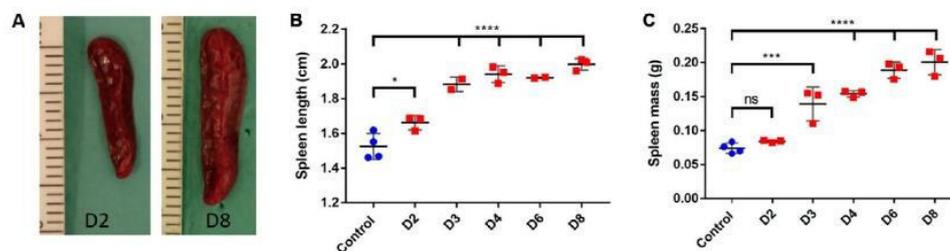
**Figure 8.** Cont.



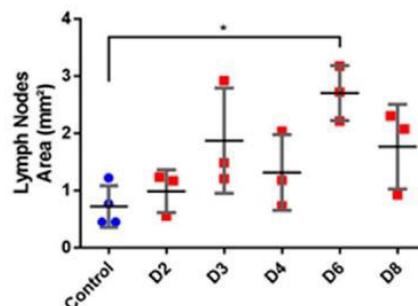
**Figure 8.** Cytokines concentration in both skin and serum samples. Data are presented as mean  $\pm$  SD and statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Only TNF- $\alpha$  level in serum at day 2 is significantly different from control. \*:  $p < 0.05$  ( $n = 3$ , except for control where  $n = 4$ ).

### 3.9. Systemic Inflammatory Response

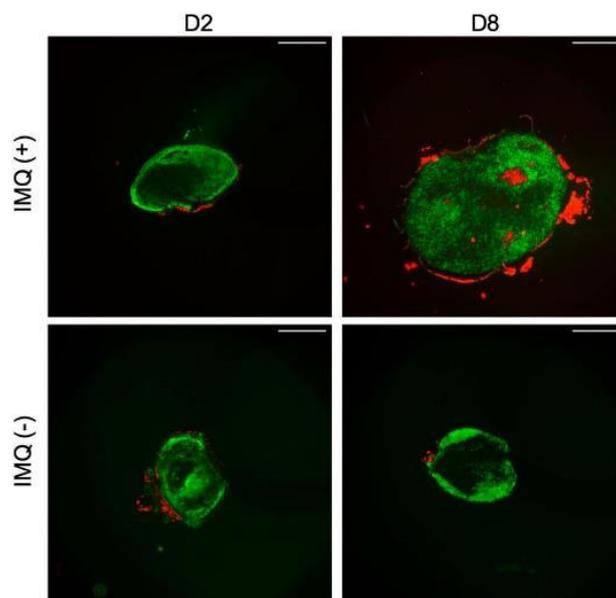
The observation of the secondary lymphoid organ, spleen showed an increase in the mass and length with the progression of psoriasis. The length of the spleen showed a significant increase at day 2 and the difference with the control length became very significant ( $p < 0.0001$ ) with the progression of days. In case of splenic mass, the data showed a significant change starting from day 3 and a total of four-fold increase at day 8 (Figure 9B). Furthermore, a similar trend was seen in case of the area of lymph nodes. The statistical data showed a three-fold increase in the total area (Figure 10). The data is presented as mean values for the respective sampling days. More importantly, the appearance of germinal centers in all the treated mice at day 8 signifies the fact that this immune mediated response of lymph nodes can be related to the severity of psoriasis and is in compliance with other results (Figure 11).



**Figure 9.** Evaluation of spleen length and mass in the course of IMQ-induced psoriasis-like dermatitis. Visual examination shows increased length and width of the spleen between days 2 and 8 (A). Spleen length (B) and mass (C) evaluations were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test. Values are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ , except for control where  $n = 4$ ). \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.0005$ , \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ .



**Figure 10.** Evaluation of area of lymph nodes (mm<sup>2</sup>) in the course of IMQ-induced psoriasis-like dermatitis. Evaluations were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test. Values are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ , except for control where  $n = 4$ ). \*:  $p < 0.05$ .



**Figure 11.** Immunofluorescent staining of germinal centers in mice inguinal lymph nodes. Sections were stained with anti-mouse IgD (BioLegend) to detect B cells follicles (green), and with biotinylated peanut agglutinin (PNA) (Vectors Laboratories) to detect germinal centers (red). Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Discussion

Despite the development of numerous preclinical models to assess the different aspects of topical and transdermal delivery, the complexity of skin barrier in terms of structure and composition remains a limiting factor for drug penetration, even in diseased skin [38,39]. The IMQ-induced psoriasis mouse model recapitulates several features of skin inflammatory diseases similar to human psoriatic inflammation. These characterized features include increased thickening of the epidermal layer, elongation of rete-like ridges and hyperkeratosis after IMQ treatment. Our study showed all these parameters which are in agreement with previous studies [4,6,37].

For the first time, this study focuses on monitoring the quantity of IMQ found in the skin following its topical application. The molecule is detected in skin after two days of daily application and its concentration increased three folds on the day 6 of experimentation. This kinetic of penetration and retention can be explained by the physical and chemical properties of IMQ. The low molecular weight (240.3 g/mol) allows an easy skin penetration but due to its lipophilic properties ( $\log P = 2.6$ ) the molecule is mainly retained in the stratum corneum. The increase in skin drug concentration is related with skin changes that appeared from day 2 to 3. The total PASI score highlights the psoriasis severity notably through the observation of desquamation representing the scale formation. Layers of stratum corneum are detached and thus, promote better IMQ skin penetration.

In parallel, a significant epidermis thickening is observed both on the back and on the treated ear starting from day 4 and increasing throughout the experiment. This epidermal hyperplasia is correlated with the appearance of pSTAT3 that is a key transcription activator involved in the development of psoriatic lesions [27]. The histological analysis of pSTAT3 on the psoriatic skin slides is clearly consistent with the results shown in the previous studies that elucidate the expression of this protein in the keratinocytes of psoriatic skin [34,36]. Furthermore, these findings are in agreement with Sun et al. [27] where they proved berberine to be an effective therapeutic option for psoriasis as it targets pSTAT3. Altogether, these insights show that pSTAT3 staining is a relevant marker to successfully evaluate future anti-psoriatic drugs using IMQ-induced mouse model.

The skin is a semi-permeable barrier which not only regulates the penetration of exogenous compounds from the outside, but also prevents the loss of intrinsic water in the environment. This phenomenon is possible due to the keratinocytes differentiation that generates epidermal barrier that

prevents water loss [40]. These findings support our result where increased trans-epidermal water loss in psoriatic skin is seen as compared to the control skin. In accordance with the evolution of the previous presented parameters, TEWL measurements on the back and treated ear increased from day 3 to 4 to reach a maximum at day 6 to 8 where PASI score and epidermal hyperplasia are maximal. The results in our study are also analogous to the studies shown by Lin et al. [7] and Shah et al. [33]. Furthermore, this parameter describing the severity of damage to the skin barrier [10] reached a significant high value after 4 days of IMQ application like it was described by Takahashi et al. [41]. Moreover, this can also be supported by circumstantial evidence that states that psoriatic inflammation is characterized by acanthosis, hyperkeratosis and infiltration of inflammatory cells into epidermis, ultimately leading to the formation of erythematous plaque, and resulting in the loss of the protective skin barrier [42,43]. However, this parameter can be further analyzed in detail by using various criterion like evaluation of lipid content, formation of cornified envelope or by examining tight junctions. On the other hand, hyperproliferation can be revealed through the observation of proliferative markers such as Ki-67 and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The increase of these nuclear proteins in psoriasis has already been shown in literature [23,44].

These local physical phenomena are accompanied by local inflammation that occurs through the dermal hypervascularity and angiogenesis which are characterized by the infiltration of blood cells in the skin [45]. Indeed, from day 4 an increase in the signal of CD31 and CD34, respectively a vascular and an endothelial marker, is observed in skin samples of IMQ-induced psoriatic mice. It has already been proven that epidermal keratinocytes and vascular endothelial cells are active participants in the psoriasis inflammatory process via secreted cytokines and growth factors along with the upregulation of signaling and adhesion molecules on their surfaces [16]. The changes in dermal vascularity have been reported in studies, however, the pathologic process behind these changes remain unclear and considerable evidence suggests the reason to be angiogenesis [37,46]. The increased expression of endothelial cells and vessels in our study are analogous to the above-mentioned studies and their expression is comparable to that of study conducted by Yazici et al. [44]. Furthermore, skin perfusion was also assessed using speckle and the redness in psoriatic skin was quantified (see Figure S1 in the Supplementary Material). Thus, these markers can be further used to determine the effect of anti-psoriatic drugs using IMQ-induced mouse model.

Systemic toxicity is also observed concomitantly with the onset of local signs of psoriasis. It has been illustrated that various types of cytokines are involved in the modulation of inflammatory responses in inflammatory skin diseases like psoriasis. Indeed, the cutaneous and systemic overexpression of various pro-inflammatory cytokines, such as interleukins and TNF- $\alpha$ , has been highlighted [47]. IL-17A is known to have a crucial role in the psoriasis' pathogenesis: its skin expression is closely related to the development of skin lesions, with an increase starting after one day of IMQ application [4]. In this study there is not significant variation in IL-17A serum and skin levels which is not in accordance with the literature. These results can be explained by the low number of mice in each group ( $n = 3$  for each day,  $n = 4$  for control group) where inter-individual differences take precedence over the parameter fluctuation. A tendency to increase the level in the serum following days of IMQ application is still observed. However, the significant increase of TNF- $\alpha$  serum level at day 2 is correlated with the appearance of psoriasis phenotype and the important increase in spleen length. The systemic inflammation can be correlated with splenic inflammation as already described in patients with psoriasis [48]. Also, in the IMQ-induced mouse model the splenomegaly is reversed by the use of anti-psoriatic treatment, meaning that this phenomenon is not an IMQ side effect but it is due to the psoriasis itself [49]. We also hypothesized that the changes in the lymph nodes can be related to the severity of psoriasis. The results shown in our study can be supported by one that highlights the role of Tfh cell subsets in psoriasis [50]. Furthermore, it can be supported by the work that correlates the Tfh cells directly with the magnitude germinal centers and signify their role in immune mediated disorders [51,52]. Moreover, it has been proven by Yanaba et al. [53] that immune B cells via IL-10 production will then migrate to draining lymph nodes for their activation during IMQ-induced skin

inflammation. Therefore, the appearance of germinal centers and the increase in area measurements of lymph nodes proves the usefulness of this biomarker for the future studies of IMQ-induced psoriasis.

To our knowledge, this is the first study that correlates the severity of psoriasis with the IMQ concentration in skin. After six days of IMQ application on mice back skin, total PASI score as well as the TEWL measurements reached a plateau indicating maximum skin barrier disruption. This conclusion is supported by the thickening of the epidermis and the appearance of pSTAT3 signal in the basal keratinocytes layer at day 6. Similarly, at the systemic level, the swelling of spleen and enlargement of lymph nodes are maximal at day 6, before the appearance of germinal centers at day 8. Thus, the IMQ concentration measured in skin, with highest values at day 6 and 8 is in correlation to the severity of the other symptoms (Table 1). This model sums up the first phase of the human biphasic psoriasis disease characterized by plaque type psoriasis lesions dominated by neutrophils infiltrates before the late phase with chronic plaques associated with Th1 response [54]. This mouse model needs a continuous application of IMQ in order to maintain the chronic inflammation which makes it a hard maintenance model because once the application of IMQ is stopped, there is a rapid return to normal phenotype (see Figure S2 in the Supplementary Material).

**Table 1.** Evolution of identified psoriatic parameters following the eight days of IMQ topical application (0: absence of parameter; -: basal level of the parameter; +/+/+/+/+/: presence of the parameter with higher intensity than basal state, from + for weak increase until ++++ for high increase).

		Ctrl	D2	D3	D4	D6	D8	
Physical/ Histological Markers	IMQ concentration	0	+	+	+	++++	++++	
	PASI score	0	0	+	++	++++	++++	
	Ear thickness	-	-	-	-	++	++++	
	Epidermal thickness	-	-	+	++	++	++++	
	pSTAT3 signal	0	0	0	0	++	++	
	TEWL	Back	-	+	+	+++	++++	++++
		Ear	-	-	-	+	+++	+++
	Dermal vascularity		-	-	-	+	++	++
Systemic Toxicity	TNF- $\alpha$ serum		-	+	-	-	-	
	Spleen	Length	-	+	+++	+++	+++	++++
		Mass	-	-	+	++	+++	+++
	Lymph nodes	Area	-	-	+	+	++	+
		Germinal Centers	0	0	0	0	0	+

Skin is a semi-permeable barrier that discriminates molecules penetration based on their physico-chemical properties and size. As we described with this IMQ-induced psoriasis mouse model, psoriasis is a disease characterized by epidermal swelling and infiltration of inflammatory cells leading to the disruption of this barrier. These changes could improve the penetration of anti-psoriatic drugs either in the free form or through nano-encapsulation of topical treatment. This nano-vectorization method allows a lower drug concentration which can diminish undesirable effects and hence increase patient compliance [55]. Such strategies have already been developed and tested in IMQ-induced psoriasis mouse model [56]. In another internal project, tofacitinib was tested as JAK/STAT pathway inhibitor for the treatment of psoriasis, after incorporation into a cream and compared to Dermoval (GSK), a cream containing clobetasol propionate, commercialized against psoriasis lesions. Formulations were applied daily, twelve hours after the IMQ application on the presented mouse model. The non-appearance/resolution of the psoriatic phenotype on the basis of above mentioned psoriatic markers was taken in consideration to determine the treatment efficacy (see Figure S3 in the Supplementary material).

The wide acceptability of this model cannot be ignored because of the various advantages that it offers. However, there is still a need to bridge the gaps that exist in understating human psoriasis using a comprehensive in vivo model. Hence, the parameters observed in this article can contribute to a comprehensive study of psoriatic characteristics using IMQ-induced mouse model and thus, can lead to a better preclinical evaluation of various pharmaceutical products.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4923/12/9/789/s1>, Figure S1: Measurement of back skin perfusion for 8 days with daily IMQ application. Figure S2: Loss of psoriasis-like phenotype after day 8. Figure S3. Application of the IMQ-induced psoriasis mouse model previously characterized as a tool to assess anti-psoriatic treatment efficacy.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.F., B.V., M.L. and R.B.; methodology, M.J., J.-P.S. and A.-S.B.; formal analysis, M.J., A.D., A.-S.B. and M.L.; investigation, M.J., N.E.K. and A.-S.B.; writing-original draft preparation, M.J., A.D. and M.L.; writing-review and editing, M.L., A.D. and M.J.; supervision, B.V., B.F., R.B. and M.L.; project administration, B.V., M.L. and B.F.; funding acquisition, B.V.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by CNRS funding and CNRS PhD grant to A.-S.B., by DGA for a PhD funding to A.D., and ANR grant number ANR-19 CE14-0006-03 (ANR-Trip).

**Acknowledgments:** We would like to thank Claire Lethias and Primatiss platform for her help during immunochemistry analyses, the PBES (ENS Lyon, SFR biosciences) for animal housing and Marek Haftek for access to AquaFlux device. We would like to thank Fanny Charriaud and Waqas Javed for english language and style corrections.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. B.V. is a shareholder of Adjuvatis. The company had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

## References

1. Ahmed, A.; Leon, A.; Butler, D.C.; Reichenberg, J. Quality-of-life effects of common dermatological diseases. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **2013**, *32*, 101–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Boehncke, W.-H.; Schön, M.P. Psoriasis. *Lancet* **2015**, *386*, 983–994. [[CrossRef](#)]
3. El Malki, K.; Karbach, S.H.; Huppert, J.; Zayoud, M.; Reissig, S.; Schüler, R.; Nikolaev, A.; Karram, K.; Münzel, T.; Kuhlmann, C.R.W.; et al. An alternative pathway of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in the absence of interleukin-17 receptor a signaling. *J. Investig. Dermatol.* **2013**, *133*, 441–451. [[CrossRef](#)]
4. van der Fits, L.; Mourits, S.; Voerman, J.S.A.; Kant, M.; Boon, L.; Laman, J.D.; Cornelissen, F.; Mus, A.-M.; Florencia, E.; Prens, E.P.; et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 5836–5845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chamcheu, J.C.; Chaves-Rodriguez, M.-I.; Adhami, V.M.; Siddiqui, I.A.; Wood, G.S.; Longley, B.J.; Mukhtar, H. Upregulation of PI3K/AKT/mTOR, FAP5 and PPAR $\beta/\delta$  in Human Psoriasis and Imiquimod-induced Murine Psoriasisiform Dermatitis Model. *Acta Derm. Venereol.* **2016**, *96*, 854–856. [[CrossRef](#)]
6. Nadeem, A.; Al-Harbi, N.O.; Al-Harbi, M.M.; El-Sherbeeney, A.M.; Ahmad, S.F.; Siddiqui, N.; Ansari, M.A.; Zoheir, K.M.A.; Attia, S.M.; Al-Hosaini, K.A.; et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation is suppressed by BET bromodomain inhibitor in mice through RORC/IL-17A pathway modulation. *Pharmacol. Res.* **2015**, *99*, 248–257. [[CrossRef](#)]
7. Lin, Y.-K.; Yang, S.-H.; Chen, C.-C.; Kao, H.-C.; Fang, J.-Y. Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137890. [[CrossRef](#)]
8. Boisgard, A.-S.; Lamrayah, M.; Dzikowski, M.; Salmon, D.; Kirilov, P.; Primard, C.; Pirot, F.; Fromy, B.; Verrier, B. Innovative drug vehicle for local treatment of inflammatory skin diseases: Ex vivo and in vivo screening of five topical formulations containing poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 51–60. [[CrossRef](#)]
9. Sun, L.; Liu, Z.; Wang, L.; Cun, D.; Tong, H.H.Y.; Yan, R.; Chen, X.; Wang, R.; Zheng, Y. Enhanced topical penetration, system exposure and anti-psoriasis activity of two particle-sized, curcumin-loaded PLGA nanoparticles in hydrogel. *J. Control. Release* **2017**, *254*, 44–54. [[CrossRef](#)]
10. Bahramizadeh, M.; Bahramizadeh, M.; Kiafar, B.; Jafarian, A.H.; Nikpoor, A.R.; Hatamipour, M.; Esmaily, H.; Rezaemehr, Z.; Golmohammadzadeh, S.; Moosavian, S.A.; et al. Development, characterization and

- evaluation of topical methotrexate-entrapped deformable liposome on imiquimod-induced psoriasis in a mouse model. *Int. J. Pharm.* **2019**, *569*, 118623. [[CrossRef](#)]
11. Sathe, P.; Saka, R.; Kommineni, N.; Raza, K.; Khan, W. Dithranol-loaded nanostructured lipid carrier-based gel ameliorate psoriasis in imiquimod-induced mice psoriatic plaque model. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2019**, *45*, 826–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  12. Wu, L.; Liu, G.; Wang, W.; Liu, R.; Liao, L.; Cheng, N.; Li, W.; Zhang, W.; Ding, D. Cyclodextrin-Modified CeO<sub>2</sub> Nanoparticles as a Multifunctional Nanozyme for Combinational Therapy of Psoriasis. *Int. J. Nanomed.* **2020**, *15*, 2515–2527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  13. Raychaudhuri, S.K.; Maverakis, E.; Raychaudhuri, S.P. Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 490–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  14. Gardien, K.L.M.; Baas, D.C.; de Vet, H.C.W.; Middelkoop, E. Transepidermal water loss measured with the Tewameter TM300 in burn scars. *Burns* **2016**, *42*, 1455–1462. [[CrossRef](#)]
  15. Cristiano, M.C.; Froiio, F.; Mancuso, A.; Iannone, M.; Fresta, M.; Fiorito, S.; Celia, C.; Paolino, D. In vitro and in vivo trans-epidermal water loss evaluation following topical drug delivery systems application for pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *186*, 113295. [[CrossRef](#)]
  16. Danilenko, D.M. Review paper: Preclinical models of psoriasis. *Vet. Pathol.* **2008**, *45*, 563–575. [[CrossRef](#)]
  17. Heidenreich, R.; Röcken, M.; Ghoreschi, K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* **2009**, *90*, 232–248. [[CrossRef](#)]
  18. Ilan, N.; Madri, J.A. PECAM-1: Old friend, new partners. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15*, 515–524. [[CrossRef](#)]
  19. Cao, G.; O'Brien, C.D.; Zhou, Z.; Sanders, S.M.; Greenbaum, J.N.; Makrigiannakis, A.; DeLisser, H.M. Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2002**, *282*, C1181–C1190. [[CrossRef](#)]
  20. Manole, C.; Gherghiceanu, M.; Simionescu, O. Telocyte dynamics in psoriasis. *J. Cell Mol. Med.* **2015**, *19*, 1504–1519. [[CrossRef](#)]
  21. Zhang, K.; Li, X.; Yin, G.; Liu, Y.; Tang, X. Functional characterization of T cells differentiated in vitro from bone marrow-derived CD34 cells of psoriatic patients with family history. *Exp. Dermatol.* **2010**, *19*, e128–e135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  22. Amin, M.M.; Azim, Z.A. Immunohistochemical study of osteopontin, Ki-67, and CD34 of psoriasis in Mansoura, Egypt. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **2012**, *55*, 56–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  23. Ramezani, M.; Shamshiri, A.; Zavattaro, E.; Khazaei, S.; Rezaei, M.; Mahmoodi, R.; Sadeghi, M. Immunohistochemical expression of P53, Ki-67, and CD34 in psoriasis and psoriasisiform dermatitis. *Biomedicine* **2019**, *9*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  24. Sano, S.; Chan, K.S.; Carbajal, S.; Clifford, J.; Peavey, M.; Kiguchi, K.; Itami, S.; Nickoloff, B.J.; DiGiovanni, J. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 43–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  25. O'Shea, J.J.; Schwartz, D.M.; Villarino, A.V.; Gadina, M.; McInnes, I.B.; Laurence, A. The JAK-STAT pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu. Rev. Med.* **2015**, *66*, 311–328. [[CrossRef](#)]
  26. Calautti, E.; Avalle, L.; Poli, V. Psoriasis: A STAT3-Centric View. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 171. [[CrossRef](#)]
  27. Sun, S.; Zhang, X.; Xu, M.; Zhang, F.; Tian, F.; Cui, J.; Xia, Y.; Liang, C.; Zhou, S.; Wei, H.; et al. Berberine downregulates CDC6 and inhibits proliferation via targeting JAK-STAT3 signaling in keratinocytes. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 274. [[CrossRef](#)]
  28. Kuang, Y.-H.; Lu, Y.; Liu, Y.-K.; Liao, L.-Q.; Zhou, X.-C.; Qin, Q.-S.; Jia, X.-K.; Wu, L.-S.; Zhu, W.; Chen, X. Topical Sunitinib ointment alleviates Psoriasis-like inflammation by inhibiting the proliferation and apoptosis of keratinocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *824*, 57–63. [[CrossRef](#)]
  29. Miyoshi, K.; Takaishi, M.; Nakajima, K.; Ikeda, M.; Kanda, T.; Tarutani, M.; Iiyama, T.; Asao, N.; DiGiovanni, J.; Sano, S. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: A clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J. Investig. Dermatol.* **2011**, *131*, 108–117. [[CrossRef](#)]
  30. Bogen, S.; Pak, J.; Garifallou, M.; Deng, X.; Muller, W.A. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 1059–1064. [[CrossRef](#)]
  31. Chen, T.; Fu, L.-X.; Guo, Z.-P.; Yin, B.; Cao, N.; Qin, S. Involvement of high mobility group box-1 in imiquimod-induced psoriasis-like mice model. *J. Dermatol.* **2017**, *44*, 573–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Costa, S.; Marini, O.; Bevilacqua, D.; DeFranco, A.L.; Hou, B.; Lonardi, S.; Vermi, W.; Rodegher, P.; Panato, A.; Tagliaro, F.; et al. Role of MyD88 signaling in the imiquimod-induced mouse model of psoriasis: Focus on innate myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *102*, 791–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gilliet, M.; Conrad, C.; Geiges, M.; Cozzio, A.; Thürlimann, W.; Burg, G.; Nestle, F.O.; Dummer, R. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Arch. Dermatol.* **2004**, *140*, 1490–1495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. De Paula, D.; Martins, C.A.; Bentley, M.V.L.B. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. *Biomed. Chromatogr.* **2008**, *22*, 1416–1423. [[CrossRef](#)]
35. Amsen, D.; de Visser, K.E.; Town, T. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *511*, 107–142. [[CrossRef](#)]
36. Mastelic Gavillet, B.; Eberhardt, C.S.; Auderset, F.; Castellino, F.; Seubert, A.; Tregoning, J.S.; Lambert, P.-H.; de Gregorio, E.; Del Giudice, G.; Siegrist, C.-A. MF59 Mediates Its B Cell Adjuvanticity by Promoting T Follicular Helper Cells and Thus Germinal Center Responses in Adult and Early Life. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 4836–4845. [[CrossRef](#)]
37. Lofano, G.; Mancini, F.; Salvatore, G.; Cantisani, R.; Monaci, E.; Carrisi, C.; Tavarini, S.; Sammicheli, C.; Rossi Paccani, S.; Soldaini, E.; et al. Oil-in-Water Emulsion MF59 Increases Germinal Center B Cell Differentiation and Persistence in Response to Vaccination. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 1617–1627. [[CrossRef](#)]
38. Vogt, A.; Wischke, C.; Neffe, A.T.; Ma, N.; Alexiev, U.; Lendlein, A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin—Do existing technologies match clinical challenges? *J. Control. Release* **2016**, *242*, 3–15. [[CrossRef](#)]
39. Nino, M.; Calabrò, G.; Santoianni, P. Topical delivery of active principles: The field of dermatological research. *Dermatol. Online J.* **2010**, *16*, 4.
40. Wikramanayake, T.C.; Stojadinovic, O.; Tomic-Canic, M. Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing. *Adv. Wound Care* **2014**, *3*, 272–280. [[CrossRef](#)]
41. Takahashi, T.; Koga, Y.; Kainoh, M. Anti-IL-12/IL-23p40 antibody ameliorates dermatitis and skin barrier dysfunction in mice with imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *828*, 26–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Shah, P.P.; Desai, P.R.; Patel, A.R.; Singh, M.S. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. *Biomaterials* **2012**, *33*, 1607–1617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Pietrzak, A.T.; Zalewska, A.; Chodorowska, G.; Krasowska, D.; Michalak-Stoma, A.; Nockowski, P.; Osemłak, P.; Paszkowski, T.; Roliński, J.M. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin. Chim. Acta* **2008**, *394*, 7–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yazici, A.C.; Tursen, U.; Apa, D.D.; Ikizoglu, G.; Api, H.; Baz, K.; Tasdelen, B. The changes in expression of ICAM-3, Ki-67, PCNA, and CD31 in psoriatic lesions before and after methotrexate treatment. *Arch. Dermatol. Res.* **2005**, *297*, 249–255. [[CrossRef](#)]
45. Itoh, T.; Hatano, R.; Komiya, E.; Otsuka, H.; Narita, Y.; Aune, T.M.; Dang, N.H.; Matsuoka, S.; Naito, H.; Tominaga, M.; et al. Biological Effects of IL-26 on T Cell-Mediated Skin Inflammation, Including Psoriasis. *J. Investig. Dermatol.* **2019**, *139*, 878–889. [[CrossRef](#)]
46. Creamer, D.; Allen, M.H.; Sousa, A.; Poston, R.; Barker, J.N. Localization of endothelial proliferation and microvascular expansion in active plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.* **1997**, *136*, 859–865. [[CrossRef](#)]
47. Coimbra, S.; Figueiredo, A.; Castro, E.; Rocha-Pereira, P.; Santos-Silva, A. The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis. *Int. J. Dermatol.* **2012**, *51*, 389–395, quiz 395–398. [[CrossRef](#)]
48. Hjuler, K.F.; Gormsen, L.C.; Vendelbo, M.H.; Egeberg, A.; Nielsen, J.; Iversen, L. Systemic Inflammation and Evidence of a Cardio-splenic Axis in Patients with Psoriasis. *Acta Derm. Venereol.* **2018**, *98*, 390–395. [[CrossRef](#)]
49. Lin, Z.-M.; Ma, M.; Li, H.; Qi, Q.; Liu, Y.-T.; Yan, Y.-X.; Shen, Y.-F.; Yang, X.-Q.; Zhu, F.-H.; He, S.-J.; et al. Topical administration of reversible SAHH inhibitor ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in mice via suppression of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -induced inflammatory response in keratinocytes and T cell-derived IL-17. *Pharmacol. Res.* **2018**, *129*, 443–452. [[CrossRef](#)]
50. Grine, L.; Dejager, L.; Libert, C.; Vandenbroucke, R.E. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2015**, *26*, 25–33. [[CrossRef](#)]
51. Vaporciyan, A.A.; DeLisser, H.M.; Yan, H.C.; Mendiguren, I.I.; Thom, S.R.; Jones, M.L.; Ward, P.A.; Albelda, S.M. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* **1993**, *262*, 1580–1582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Wang, Y.; Wang, L.; Shi, Y.; Wang, F.; Yang, H.; Han, S.; Bai, Y. Altered circulating T follicular helper cell subsets in patients with psoriasis vulgaris. *Immunol. Lett.* **2017**, *181*, 101–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Yanaba, K.; Kamata, M.; Ishiura, N.; Shibata, S.; Asano, Y.; Tada, Y.; Sugaya, M.; Kadono, T.; Tedder, T.F.; Sato, S. Regulatory B cells suppress imiquimod-induced, psoriasis-like skin inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **2013**, *94*, 563–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Terhorst, D.; Chelbi, R.; Wohn, C.; Malosse, C.; Tamoutounour, S.; Jorquera, A.; Bajenoff, M.; Dalod, M.; Malissen, B.; Henri, S. Dynamics and Transcriptomics of Skin Dendritic Cells and Macrophages in an Imiquimod-Induced, Biphasic Mouse Model of Psoriasis. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 4953–4961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Carter, P.; Narasimhan, B.; Wang, Q. Biocompatible nanoparticles and vesicular systems in transdermal drug delivery for various skin diseases. *Int. J. Pharm.* **2019**, *555*, 49–62. [[CrossRef](#)]
56. Pradhan, M.; Alexander, A.; Singh, M.R.; Singh, D.; Saraf, S.; Saraf, S. Understanding the prospective of nano-formulations towards the treatment of psoriasis. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107*, 447–463. [[CrossRef](#)]



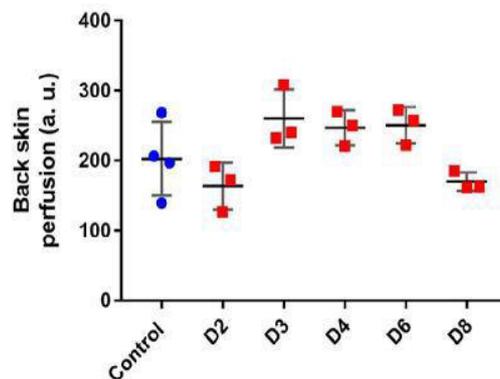
© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Supplementary Materials: Advanced Characterization of Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Mouse Model

Mehwish Jabeen, Anne-Sophie Boisgard, Alix Danoy, Naima El Kholti, Jean-Paul Salvi, Roselyne Bouliou, Bérangère Fromy, Bernard Verrier and Myriam Lamrayah

### Skin perfusion using Laser Speckle Contrast Imaging (LSCI)

**Methods:** In order to measure skin perfusion at the psoriatic sites (back and right ear), as well as for negative control (left ear), the non-invasive Laser Speckle Contrast Imaging (PeriCam PSI System®, Perimed, France) was used as previously described in human and animal studies [1,2]. Two images per second were taken and the average of skin perfusion was calculated using the manufacturer's software (PimSoft5.1®, Perimed). Results are expressed in arbitrary units (a.u.).

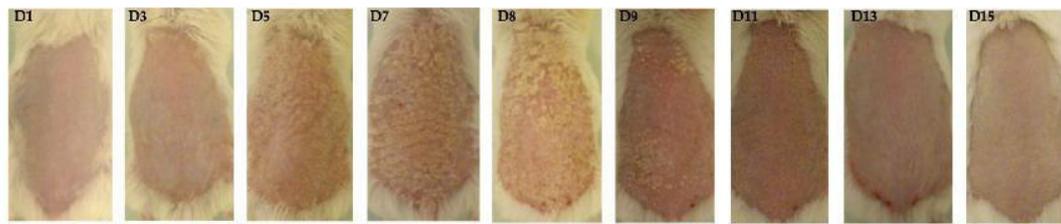


**Figure S1.** Measurement of back skin perfusion for 8 days with daily IMQ application. Evaluations were statistically analyzed using a one-way ANOVA followed by Dunnett multiple comparison test, all comparisons were not significantly different. Values are presented as mean  $\pm$  SD (n=3, except for control where n=4).

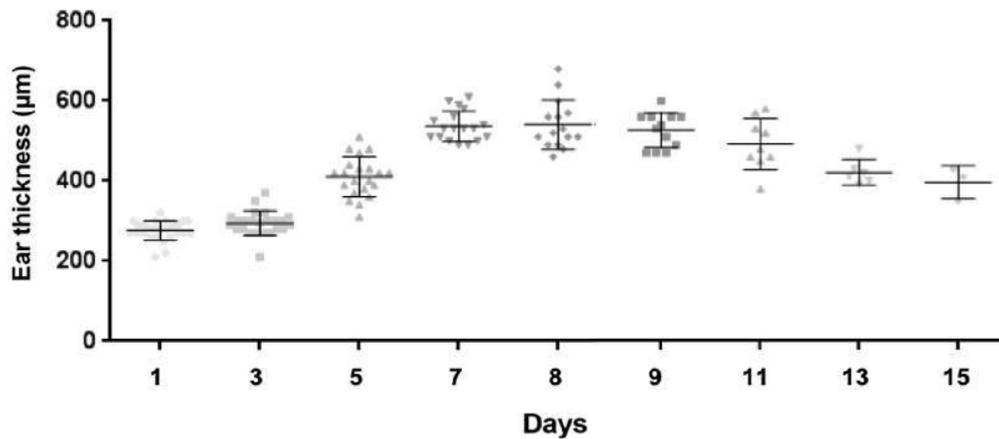
No statistical differences are observed for the back skin perfusion following IMQ application, probably due to the low number of mice in each group. The inter-individual variability is undoubted and masks the evolution of the parameter attributable to the phenotype. There is, however, a tendency to an increased skin perfusion from day 3 to day 6, which is in accordance with the redness evolution measured through PASI score and the appearance of dermal hypervascularity or angiogenesis markers.

### Maintenance of the psoriatic phenotype in the IMQ-induced psoriasis model during 8 days of IMQ application and 15 days of observation

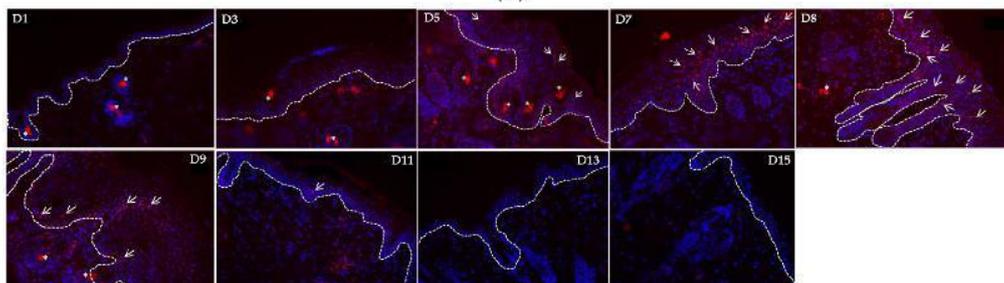
**Methods:** The experimental procedure was the same as already described in the main manuscript (see section 2.2), except that the study was not stopped at day 8. The mice were kept alive for seven more days after discontinuation of IMQ application, to examine the maintenance of the psoriatic phenotype in this model.



(A)



(B)



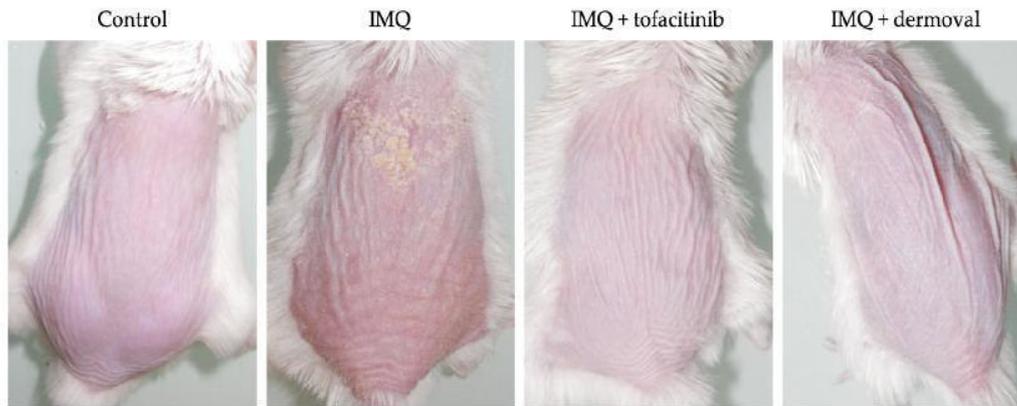
(C)

**Figure S2.** Loss of psoriasis-like phenotype after day 8. A) Evaluation of dorsal skin during 15 days, with IMQ cream application from day 1 to day 8; B) Evaluation of right ear thickness during 15 days with daily IMQ application from day 1 to day 8. Values are presented as mean  $\pm$  SD (n=27 for day 1 and decreased subsequently to n=3 for day 15); C) pSTAT3 staining evaluation on dorsal skin during 15 days, with IMQ cream application from day 1 to day 15. The dotted white line represents the dermo-epidermal junction with dermis below. pSTAT3 protein appears in red (indicated by arrows) and cell nuclei in blue (asterisks represent the unspecific red staining).

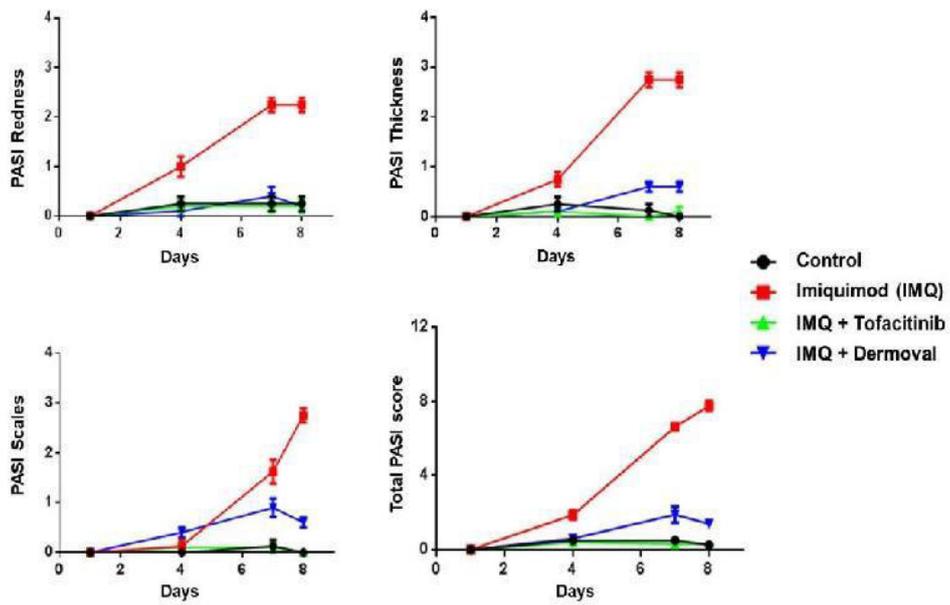
### IMQ-induced psoriasis mouse model to evaluate anti-psoriatic treatment

**Methods:** The experimental procedure was the same as already described in the main manuscript (see section 2.2). The animals were divided into four groups (n=4). Briefly, the mice were shaved and depilated on their back using a Wahl Brav Mini Clipper razor and commercially available depilatory cream (Veet®). The experimental groups were treated daily with application of 62.5 mg of commercially available 5% IMQ cream (Aldara, MEDA Pharmaceuticals) at the depilated back, during eight days. In parallel, twelve hours after IMQ application, the groups IMQ+ tofacitinib and IMQ + dermoval received respectively 125 mg of a cream containing 0.1% tofacitinib or 125 mg of a cream containing 0.05% of clobetasol propionate (Dermoal, GSK). Dermoal was used here as positive control of psoriasis topical treatment [3]. The control group was treated similarly with Lanette cream containing cetyl stearyl alcohol (BASF).

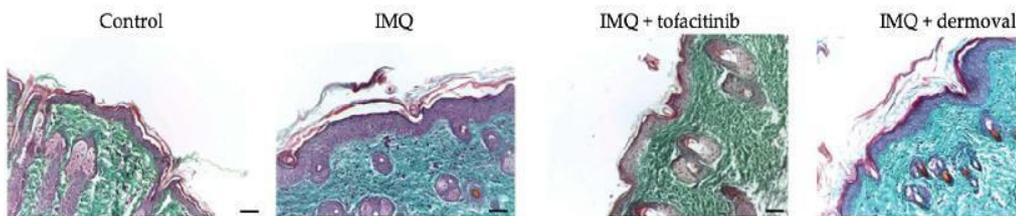
The tofacitinib cream was prepared by dissolving 15 mg of tofacitinib citrate (Sigma) in 10 mL of pure water and 5 mL of excipient Versatile (Fagron), then the mixture was homogenized.



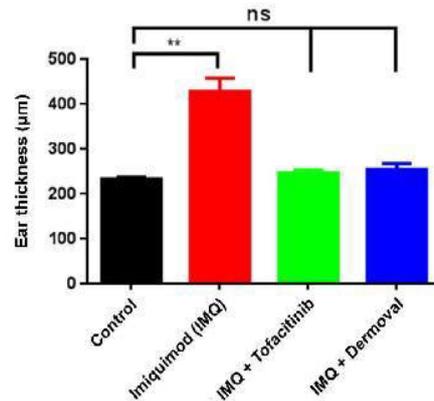
(A)



(B)



(C)



(D)

**Figure S3.** Application of the IMQ-induced psoriasis mouse model previously characterized as a tool to assess anti-psoriatic treatment efficacy. A) Evaluation of dorsal skin at day 9 for the four groups; B) Evaluation of PASI score in the course of the evaluation of psoriatic treatment on IMQ-induced psoriasis model. Observed criteria are skin redness, thickness, the presence of scales and total PASI score; C) Histological examination by Masson's trichrome staining of back skin samples (scale bar = 100 µm for each image); D) Measurement of ear thickness at day 9 on control and IMQ-induced mouse model with or without treatments. Results were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test. Values are presented as mean ± SD. \*\*: p<0.001.

## References

1. Fromy, B.; Lingueglia, E.; Sigaucho-Roussel, D.; Saunet, J.L.; Lazdunski, M. Asic3 is a neuronal mechanosensor for pressure-induced vasodilation that protects against pressure ulcers. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1205–1207, doi:10.1038/nm.2844.
2. Tew, G.A.; Klonizakis, M.; Crank, H.; Briers, J.D.; Hodges, G.J. Comparison of laser speckle contrast imaging with laser Doppler for assessing microvascular function. *Microvasc. Res.* **2011**, *82*, 326–332, doi:10.1016/j.mvr.2011.07.007.
3. Sun, J.; Dou, W.; Zhao, Y.; Hu, J. A comparison of the effects of topical treatment of calcipotriol, camptothecin, clobetasol and tazarotene on an imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **2014**, *36*, 17–24, doi:10.3109/08923973.2013.862542.



---

# **Références bibliographiques**

---



## Références bibliographiques

- Abdayem, R., & Haftek, M. (2018). [The epidermal barrier]. *Annales De Dermatologie Et De Venereologie*, 145(4), 293-301.
- Abdel-Wahhab, M. A., Nada, S. A., & Amra, H. A. (1999). Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-induced developmental toxicity in rat. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 19(3), 199-204.
- AFNOR NF X 52-122, janvier 2016. "Sécurité et protection du citoyen - NRBC-E - Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine."
- Ali, I., Peng, C., Lin, D., Saroj, D. P., Naz, I., Khan, Z. M., Sultan, M., & Ali, M. (2019). Encapsulated green magnetic nanoparticles for the removal of toxic Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> from water : Development, characterization and application. *Journal of Environmental Management*, 234, 273-289.
- Amlôt, R., Carter, H., Riddle, L., Lerner, J., & Chilcott, R. P. (2017). Volunteer trials of a novel improvised dry decontamination protocol for use during mass casualty incidents as part of the UK'S Initial Operational Response (IOR). *PLoS ONE*, 12(6).
- Anghel, S. I., & Wahli, W. (2007). Fat poetry : A kingdom for PPAR gamma. *Cell Research*, 17(6), 486-511.
- 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)<sub>4</sub> : Near Instantaneous Decontamination of VX. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(21), 11606-11614.
- Bartelt-Hunt, S. L., Knappe, D. R. U., & Barlaz, M. A. (2008). A Review of Chemical Warfare Agent Simulants for the Study of Environmental Behavior. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(2), 112-136.
- Baxter, C., Gaskin, S., Logan, M., & Pisaniello, D. (2020). The Mass Decontamination Paradigm : Response Relating to Gas Phase Exposures and Skin Decontamination. In H. Zhu & H. I. Maibach (Éds.), *Skin Decontamination : A Comprehensive Clinical Research Guide* (p. 141-162). Springer International Publishing.
- Behkami, S. (2019). Statistical and chemometric view of the variation in the concentration of selected organophosphates in peeled unwashed and unpeeled washed fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 300, 125220.
- Benech-Kieffer, F., Wegrich, P., Schwarzenbach, R., Klecak, G., Weber, T., Leclaire, J., & Schaefer, H. (2000). Percutaneous absorption of sunscreens in vitro : Interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 13(6), 324-335.
- Beneke, K., Lagaly, G., Beneke, K., & Lagaly, G. (s. d.). *Washing in ancient times 1*.
- Bergaya, F., & Lagaly, G. (2006). Chapter 1 General Introduction : Clays, Clay Minerals, and Clay Science. In Faïza Bergaya, B. K. G. Theng, & G. Lagaly (Éds.), *Developments in Clay Science* (Vol. 1, p. 1-18). Elsevier.

## Références bibliographiques

- Beringhs, A. O., Rosa, J. M., Stulzer, H. K., Budal, R. M., & Sonaglio, D. (2013). Green Clay and Aloe Vera Peel-Off Facial Masks : Response Surface Methodology Applied to the Formulation Design. *AAPS PharmSciTech*, 14(1), 445-455.
- Bernard, B. A. (2017). The hair follicle enigma. *Experimental Dermatology*, 26(6), 472-477.
- Berthet, M. (2017). *Nanoparticules biodégradables et multifonctionnelles pour la régénération tissulaire de plaies cutanées profondes* [These de doctorat, Lyon].
- 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. *Human & Experimental Toxicology*, 27(3), 253-261.
- Black, R. (2016). *CHAPTER 1 Development, Historical Use and Properties of Chemical Warfare Agents*. 1-28.
- Boncheva, M., Damien, F., & Normand, V. (2008). Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(5), 1344-1355.
- Bos, J. D., & Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology*, 9(3), 165-169.
- Bouwstra, J. A., & Ponc, M. (2006). The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(12), 2080-2095.
- Braue, E. H., Boardman, C. H., & Hurst, C. G. (2008). Decontamination of chemical casualties. In *Medical aspects of chemical warfare* (p. 527-557). Government Printing Office.
- 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. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 30(1), 15-28.
- Breitkreutz, D., Koxholt, I., Thiemann, K., & Nischt, R. (2013). Skin basement membrane : The foundation of epidermal integrity--BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. *BioMed Research International*, 2013, 179784.
- Brigatti, M. F., Galan, E., & Theng, B. K. G. (2006). Chapter 2 Structures and Mineralogy of Clay Minerals. In Faïza Bergaya, B. K. G. Theng, & G. Lagaly (Éds.), *Developments in Clay Science* (Vol. 1, p. 19-86). Elsevier.
- Cabal, J., Kuca, K., Sevelová-Bartosová, L., & Dohnal, V. (2004). Cyclodextrines as functional agents for decontamination of the skin contaminated by nerve agents. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 47(2), 115-118.
- Candi, E., Schmidt, R., & Melino, G. (2005). The cornified envelope : A model of cell death in the skin. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(4), 328-340.

## Références bibliographiques

- Cao, S., Dong, T., Xu, G., & Wang, F. (2016). Study on structure and wetting characteristic of cattail fibers as natural materials for oil sorption. *Environmental Technology*, 37(24), 3193-3199.
- Cao, Y., Elmahdy, A., Zhu, H., Hui, X., & Maibach, H. (2018). Binding affinity and decontamination of dermal decontamination gel to model chemical warfare agent simulants. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 38(5), 724-733.
- Cao, Y., Hui, X., Zhu, H., Elmahdy, A., & Maibach, H. (2018). In vitro human skin permeation and decontamination of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) using Dermal Decontamination Gel (DDGel) and Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL). *Toxicology Letters*, 291, 86-91.
- Capoun, T., & Krykorkova, J. (2014). Comparison of Selected Methods for Individual Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Toxics*, 2(2), 307-326.
- Carretero, M. I. (2020). Clays in pelotherapy. A review. Part I : Mineralogy, chemistry, physical and physicochemical properties. *Applied Clay Science*, 189, 105526.
- Carretero, M. I., & Pozo, M. (2010). Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries Part II. Active ingredients. *Applied Clay Science*, 47(3), 171-181.
- Carter, H., Amlôt, R., Williams, R., Rubin, G. J., & Drury, J. (2016). Mass Casualty Decontamination in a Chemical or Radiological/ Nuclear Incident : Further Guiding Principles. *PLoS Currents*, 8.
- Chai, P. R., Hayes, B. D., Erickson, T. B., & Boyer, E. W. (2018). Novichok agents : A historical, current, and toxicological perspective. *Toxicology Communications*, 2(1), 45-48.
- Chan, H. P., Zhai, H., Hui, X., & Maibach, H. I. (2013). Skin decontamination : Principles and perspectives. *Toxicology and Industrial Health*, 29(10), 955-968.
- Chang, P.-H., Jiang, W.-T., Li, Z., Kuo, C.-Y., Wu, Q., Jean, J.-S., & Lv, G. (2016). Interaction of ciprofloxacin and probe compounds with palygorskite PFI-1. *Journal of Hazardous Materials*, 303, 55-63.
- Chemeda, Y. C., Christidis, G. E., Khan, N. M. T., Koutsopoulou, E., Hatzistamou, V., & Kelessidis, V. C. (2014). Rheological properties of palygorskite–bentonite and sepiolite–bentonite mixed clay suspensions. *Applied Clay Science*, 90, 165-174.
- Chen, C.-P., Chen, C.-C., Huang, C.-W., & Chang, Y.-C. (2018). Evaluating Molecular Properties Involved in Transport of Small Molecules in Stratum Corneum : A Quantitative Structure-Activity Relationship for Skin Permeability. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(4).
- Chen, K.-X., Zhou, X.-H., Sun, C.-A., & Yan, P.-X. (2019). Manifestations of and risk factors for acute myocardial injury after acute organophosphorus pesticide poisoning. *Medicine*, 98(6), e14371.
- Chilcott, R. P., Barai, N., Beezer, A. E., Brain, S. I., Brown, M. B., Bunge, A. L., Burgess, S. E., Cross, S., Dalton, C. H., Dias, M., Farinha, A., Finnin, B. C., Gallagher, S. J., Green, D. M., Gunt, H., Gwyther, R. L., Heard, C. M., Jarvis, C. A., Kamiyama, F., ... Hadgraft, J. (2005). Inter- and intralaboratory variation of in vitro diffusion cell measurements : An international multicenter

- study using quasi-standardized methods and materials. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(3), 632-638.
- 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. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 21(4), 279-283.
- Chilcott, R. P., Larner, J., & Matar, H. (2019). UK's initial operational response and specialist operational response to CBRN and HazMat incidents : A primer on decontamination protocols for healthcare professionals. *Emergency Medicine Journal: EMJ*, 36(2), 117-123.
- Chilcott, R. P., Mitchell, H., & Matar, H. (2019). Optimization of Nonambulant Mass Casualty Decontamination Protocols as Part of an Initial or Specialist Operational Response to Chemical Incidents. *Prehospital Emergency Care: Official Journal of the National Association of EMS Physicians and the National Association of State EMS Directors*, 23(1), 32-43.
- Choi, W. I., Hwang, Y., Sahu, A., Min, K., Sung, D., Tae, G., & Chang, J. H. (2018). An injectable and physical levan-based hydrogel as a dermal filler for soft tissue augmentation. *Biomaterials Science*, 6(10), 2627-2638.
- Choy, Y. B., & Prausnitz, M. R. (2011). The rule of five for non-oral routes of drug delivery : Ophthalmic, inhalation and transdermal. *Pharmaceutical Research*, 28(5), 943-948.
- Ciottoni, G. R. (2018). Toxidrome Recognition in Chemical-Weapons Attacks. *The New England Journal of Medicine*, 378(17), 1611-1620.
- Circulaire 700-SGDN-PSE-PPS "Moyens de secours pour attaque terroriste chimique" du 2 octobre 2018, Secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale.  
[http://circulaire.legifrance.gouv.fr/pdf/2019/01/cir\\_44286.pdf](http://circulaire.legifrance.gouv.fr/pdf/2019/01/cir_44286.pdf)
- Clarkson, E. D., & Gordon, R. K. (2015). Chapter 76—Rapid Decontamination of Chemical Warfare Agents from the Skin. In R. C. Gupta (Éd.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)* (p. 1127-1139). Academic Press.
- Claverie, M., Garcia, J., Prevost, T., Brendlé, J., & Limousy, L. (2019). Inorganic and Hybrid (Organic-Inorganic) Lamellar Materials for Heavy metals and Radionuclides Capture in Energy Wastes Management-A Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(9).
- Coates, M., Lee, M. J., Norton, D., & MacLeod, M. (2019, décembre 17). *The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems*. *Frontiers in Immunology; Front Immunol*.
- Cohen, P., & Spiegelman, B. M. (2016). Cell biology of fat storage. *Molecular Biology of the Cell*, 27(16), 2523-2527.
- Dachir, S., Fishbine, E., Meshulam, Y., Buch, H., Allon, N., & Kadar, T. (2020). Fuller's Earth : Old and Faithful Skin Decontaminant Against Toxic Agents. In H. Zhu & H. I. Maibach (Éds.), *Skin Decontamination : A Comprehensive Clinical Research Guide* (p. 101-119). Springer International Publishing.

## Références bibliographiques

- Dalton, C. H., Hall, C. A., Lydon, H. L., Chipman, J. K., Graham, J. S., Jenner, J., & Chilcott, R. P. (2015a). Development of haemostatic decontaminants for the treatment of wounds contaminated with chemical warfare agents. 2 : Evaluation of in vitro topical decontamination efficacy using undamaged skin. *Journal of Applied Toxicology*, 35(5), 543-550.
- Dalton, C. H., Hall, C. A., Lydon, H. L., Chipman, J. K., Graham, J. S., Jenner, J., & Chilcott, R. P. (2015b). Development of haemostatic decontaminants for the treatment of wounds contaminated with chemical warfare agents. 2 : Evaluation of in vitro topical decontamination efficacy using undamaged skin. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 35(5), 543-550.
- Dalton, C. H., Hattersley, I. J., Rutter, S. J., & Chilcott, R. P. (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. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 20(8), 1532-1536.
- Dalton, C., Hall, C., Lydon, H., Jenner, J., Chipman, J. K., Graham, J. S., & Chilcott, R. P. (2018). The percutaneous absorption of soman in a damaged skin porcine model and the evaluation of WoundStat™ as a topical decontaminant. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 37(2), 172-179.
- Dário, G. M., da Silva, G. G., Gonçalves, D. L., Silveira, P., Junior, A. T., Angioletto, E., & Bernardin, A. M. (2014). Evaluation of the healing activity of therapeutic clay in rat skin wounds. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 43, 109-116.
- Denet, E., Espina-Benitez, M. B., Pitault, I., Pollet, T., Blaha, D., Bolzinger, M.-A., Rodriguez-Nava, V., & Briançon, S. (2020). Metal oxide nanoparticles for the decontamination of toxic chemical and biological compounds. *International Journal of Pharmaceutics*, 583, 119373.
- Dennerlein, K., Jäger, T., Göen, T., Kilo, S., Schaller, K. H., Drexler, H., & Korinth, G. (2015). Evaluation of the effect of skin cleaning procedures on the dermal absorption of chemicals. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 29(5), 828-833.
- Derbalah, A., Chidya, R., Jadoon, W., & Sakugawa, H. (2019). Temporal trends in organophosphorus pesticides use and concentrations in river water in Japan, and risk assessment. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 79, 135-152.
- Devault, D. A., Karolak, S., Lévi, Y., Rousis, N. I., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2018). Exposure of an urban population to pesticides assessed by wastewater-based epidemiology in a Caribbean island. *The Science of the Total Environment*, 644, 129-136.
- Diridollou, S., Patat, F., Gens, F., Vaillant, L., Black, D., Lagarde, J. M., Gall, Y., & Berson, M. (2000). In vivo model of the mechanical properties of the human skin under suction. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 6(4), 214-221.
- Dorandeu, F., Taysse, L., Boudry, I., Foquin, A., Hérodin, F., Mathieu, J., Daulon, S., Cruz, C., & Lallement, G. (2011). Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse. (I) Development of a model for screening studies in skin decontamination and protection. *Human & Experimental Toxicology*, 30(6), 470-490.

## Références bibliographiques

- Driskell, R. R., & Watt, F. M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends in Cell Biology*, 25(2), 92-99.
- Dwyer, M., Kubena, L., Harvey, R., Mayura, K., Sarr, A., Buckley, S., Bailey, R., & Phillips, T. (1997). Effects of inorganic adsorbents and cyclopiazonic acid in broiler chickens. *Poultry Science*, 76(8), 1141-1149.
- Elmore, A. (2003). Final Report on the Safety Assessment of Aluminum Silicate, Calcium Silicate, Magnesium Aluminum Silicate, Magnesium Silicate, Magnesium Trisilicate, Sodium Magnesium Silicate, Zirconium Silicate, Attapulgit, Bentonite, Fuller's Earth, Hectorite, Kaolin, Lithium Magnesium Silicate, Lithium Magnesium Sodium Silicate, Montmorillonite, Pyrophyllite, and Zeolite. *International Journal of Toxicology*, 22(1\_suppl), 37-102.
- Fajuyigbe, D., Lwin, S. M., Diffey, B. L., Baker, R., Tobin, D. J., Sarkany, R. P. E., & Young, A. R. (2018). Melanin distribution in human epidermis affords localized protection against DNA photodamage and concurs with skin cancer incidence difference in extreme phototypes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(7), 3700-3706.
- Faria, M., Garcia-Reyero, N., Padrós, F., Babin, P. J., Sebastián, D., Cachot, J., Prats, E., Arick li, M., Rial, E., Knoll-Gellida, A., Mathieu, G., Le Bihanic, F., Escalon, B. L., Zorzano, A., Soares, A. M. V. M., & Raldúa, D. (2015). Zebrafish Models for Human Acute Organophosphorus Poisoning. *Scientific Reports*, 5, 15591.
- Feingold, K. R., & Elias, P. M. (2014). Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(3), 280-294.
- Feldman, R. J. (2010). Chemical agent simulant release from clothing following vapor exposure. *Academic Emergency Medicine: Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine*, 17(2), 221-224.
- Feng, D., Li, X., Wang, X., Li, J., Sun, F., Sun, Z., Zhang, T., Li, P., Chen, Y., & Zhang, X. (2018). Water adsorption and its impact on the pore structure characteristics of shale clay. *Applied Clay Science*, 155, 126-138.
- Fentabil, M., Gebremedhin, M., Barry, J., Mikler, J., & Cochrane, L. (2020). In vivo efficacy of the Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL®) kit against organophosphate and carbamate pesticides. *Chemico-Biological Interactions*, 108980.
- Fentabil, M., Gebremedhin, M., Purdon, J. G., Cochrane, L., & Goldman, V. S. (2018). Degradation of pesticides with RSDL® (reactive skin decontamination lotion kit) lotion : LC-MS investigation. *Toxicology Letters*, 293, 241-248.
- Forsberg, E., Öberg, L., Artursson, E., Wigenstam, E., Bucht, A., & Thors, L. (2020). Decontamination Efficacy of Soapy Water and Water Washing Following Exposure of Toxic Chemicals on Human Skin. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 0(ja), 1-27.
- Fujiwara, A., Hinokitani, T., Goto, K., & Arai, T. (2005). Partial ablation of porcine stratum corneum by argon-fluoride excimer laser to enhance transdermal drug permeability. *Lasers in Medical Science*, 19(4), 210-217.

## Références bibliographiques

- Gagnon, D., & Crandall, C. G. (2018). Sweating as a heat loss thermoeffector. *Handbook of Clinical Neurology*, 156, 211-232.
- Galan, E. (1996). Properties and applications of palygorskite-sepiolite clays. *Clay Minerals*, 31(4), 443-453.
- Gattu, S., & Maibach, H. I. (2010). Enhanced absorption through damaged skin : An overview of the in vitro human model. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(4), 171-176.
- Gawarammana, I. B., & Buckley, N. A. (2011). Medical management of paraquat ingestion. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 72(5), 745-757.
- Gerlach, T., Grayson, J. K., Pichakron, K. O., Sena, M. J., DeMartini, S. D., Clark, B. Z., Estep, J. S., & Zierold, D. (2010). Preliminary study of the effects of smectite granules (WoundStat) on vascular repair and wound healing in a swine survival model. *The Journal of Trauma*, 69(5), 1203-1209.
- Gitari, M. W., & Mudzielwana, R. (2018). Mineralogical and Chemical Characteristics of Raw and Modified Clays and Their Application in Arsenic and Fluoride Removal : Review. *Current Topics in the Utilization of Clay in Industrial and Medical Applications*.
- Godin, B., & Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery : Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11), 1152-1161.
- Goldsmith, M., & Ashani, Y. (2018). Catalytic bioscavengers as countermeasures against organophosphate nerve agents. *Chemico-Biological Interactions*, 292, 50-64.
- Gould, J. (2018). Superpowered skin. *Nature*, 563(7732), S84-S85.
- Grives, S., Phan, G., Morat, G., Suhard, D., Rebiere, F., & Fattal, E. (2015). Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(6), 2008-2017.
- Haines, D. D., & Fox, S. C. (2014). Acute and Long-Term Impact of Chemical Weapons : Lessons from the Iran-Iraq War. *Forensic Science Review*, 26(2), 97-114.
- Hamad, M. H., Adeel, A. A., Alhaboob, A. A. N., Ashri, A. M., & Salih, M. A. (2016). Acute poisoning in a child following topical treatment of head lice (pediculosis capitis) with an organophosphate pesticide. *Sudanese Journal of Paediatrics*, 16(1), 63-66.
- 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. *Military Medicine*, 169(11), 856-862.
- Han, H.-K., Lee, Y.-C., Lee, M.-Y., Patil, A. J., & Shin, H.-J. (2011). Magnesium and calcium organophyllosilicates : Synthesis and in vitro cytotoxicity study. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(7), 2564-2572.
- Harms, M., & Seale, P. (2013). Brown and beige fat : Development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine*, 19(10), 1252-1263.

- Hendriks, F. M., Brokken, D., Oomens, C. W. J., Bader, D. L., & Baaijens, F. P. T. (2006). The relative contributions of different skin layers to the mechanical behavior of human skin in vivo using suction experiments. *Medical Engineering & Physics*, 28(3), 259-266.
- Henretig, F. M., Kirk, M. A., & McKay, C. A. (2019). Hazardous Chemical Emergencies and Poisonings. *The New England Journal of Medicine*, 380(17), 1638-1655.
- Hoppin, J. A., Long, S., Umbach, D. M., Lubin, J. H., Starks, S. E., Gerr, F., Thomas, K., Hines, C. J., Weichenthal, S., Kamel, F., Koutros, S., Alavanja, M., Beane Freeman, L. E., & Sandler, D. P. (2012). Lifetime organophosphorous insecticide use among private pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 22(6), 584-592.
- Houston, M., & Hendrickson, R. G. (2005). Decontamination. *Critical Care Clinics*, 21(4), 653-672, v.
- 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 Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(7), 2496-2502.
- In, M. K., Richardson, K. C., Loewa, A., Hedtrich, S., Kaessmeyer, S., & Plendl, J. (2019). Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 48(3), 207-217.
- Jacobi, U., Kaiser, 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: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 13(1), 19-24.
- James, T., Collins, S., Amlôt, R., & Marczylo, T. (2019). GC-MS/MS quantification of benzyl salicylate on skin and hair : A novel chemical simulant for human decontamination studies. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1129, 121818.
- James, T., Wyke, S., Marczylo, T., Collins, S., Gaulton, T., Foxall, K., Amlôt, R., & Duarte-Davidson, R. (2018). Chemical warfare agent simulants for human volunteer trials of emergency decontamination : A systematic review. *Journal of Applied Toxicology*, 38(1), 113-121.
- Janer, G., Fernández-Rosas, E., Molino, E. M. del, González-Gálvez, D., Vilar, G., López-Iglesias, C., Ermini, V., & Vázquez-Campos, S. (2014). In vitro toxicity of functionalised nanoclays is mainly driven by the presence of organic modifiers. *Nanotoxicology*, 8(3), 279-294.
- Jlassi, K., Radwan, A. B., Sadasivuni, K. K., Mrlik, M., Abdullah, A. M., Chehimi, M. M., & Krupa, I. (2018). Anti-corrosive and oil sensitive coatings based on epoxy/polyaniline/magnetite-clay composites through diazonium interfacial chemistry. *Scientific Reports*, 8(1), 13369.
- John, H., Balszuweit, F., Kehe, K., Worek, F., & Thiermann, H. (2015). Chapter 56—Toxicokinetic Aspects of Nerve Agents and Vesicants. In R. C. Gupta (Éd.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Second Edition)* (p. 817-856). Academic Press.

## Références bibliographiques

- Joodaki, H., & Panzer, M. B. (2018). Skin mechanical properties and modeling : A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine*, 232(4), 323-343.
- Joosen, M. J. A., van den Berg, R. M., de Jong, A. L., van der Schans, M. J., Noort, D., & Langenberg, J. P. (2017). The impact of skin decontamination on the time window for effective treatment of percutaneous VX exposure. *Chemico-Biological Interactions*, 267, 48-56.
- Joosen, Marloes J. A., van der Schans, M. J., Kuijpers, W. C., van Helden, H. P. M., & Noort, D. (2013). Timing of decontamination and treatment in case of percutaneous VX poisoning : A mini review. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 149-153.
- Joosen, Marloes J. A., van der Schans, M. J., & van Helden, H. P. M. (2008). Percutaneous exposure to VX : Clinical signs, effects on brain acetylcholine levels and EEG. *Neurochemical Research*, 33(2), 308-317.
- Josse, D. (2020). Effectiveness of Chemical, Biological, Radiological, and Nuclear (CBRN) Skin Decontaminants : Toward Tests Standardization. In H. Zhu & H. I. Maibach (Éds.), *Skin Decontamination : A Comprehensive Clinical Research Guide* (p. 77-85). Springer International Publishing.
- Jung, E. C., & Maibach, H. I. (2015). Animal models for percutaneous absorption. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 35(1), 1-10.
- Kais, B., Stengel, D., Batel, A., & Braunbeck, T. (2015). Acetylcholinesterase in zebrafish embryos as a tool to identify neurotoxic effects in sediments. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(21), 16329-16339.
- Kamarul, T., Krishnamurthy, G., Salih, N. D., Ibrahim, N. S., Raghavendran, H. R. B., Suhaeb, A. R., & Choon, D. S. K. (2014). Biocompatibility and toxicity of poly(vinyl alcohol)/N,O-carboxymethyl chitosan scaffold. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 905103.
- Karadzovska, D., Brooks, J. D., & Riviere, J. E. (2012). Experimental factors affecting in vitro absorption of six model compounds across porcine skin. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 26(7), 1191-1198.
- Kassouf, N., Syed, S., Lerner, J., Amlôt, R., & Chilcott, R. P. (2017). Evaluation of absorbent materials for use as ad hoc dry decontaminants during mass casualty incidents as part of the UK's Initial Operational Response (IOR). *PLoS One*, 12(2), e0170966.
- Kherdekar, G., & Adivarekar, R. V. (2017). Effect of different Wool Scouring Techniques on Physical Properties of Wool Fiber. *International Journal of Modern Trends in Engineering & Research*, 4(5), 163-167.
- Kim, I. Y., Yoo, M. K., Seo, J. H., Park, S. S., Na, H. S., Lee, H. C., Kim, S. K., & Cho, C. S. (2007). Evaluation of semi-interpenetrating polymer networks composed of chitosan and poloxamer for wound dressing application. *International Journal of Pharmaceutics*, 341(1), 35-43.
- Kim, K., Tsay, O. G., Atwood, D. A., & Churchill, D. G. (2011). Destruction and Detection of Chemical Warfare Agents. *Chemical Reviews*, 111(9), 5345-5403.

## Références bibliographiques

- Klingner, T. D. (2007). Fundamentals of percutaneous chemical absorption and decontamination. *Journal of Chemical Health and Safety*, 14(4), 11-15.
- Kong, R., & Bhargava, R. (2011). Characterization of porcine skin as a model for human skin studies using infrared spectroscopic imaging. *The Analyst*, 136(11), 2359-2366.
- Krishna, G., Goel, S., & Krishna, M. (2020). Chapter 51—Alternative animal toxicity testing of chemical warfare agents. In R. C. Gupta (Éd.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents (Third Edition)* (p. 853-871). Academic Press.
- Kumar, V., Rana, H., Raviraju, G., & Gupta, A. K. (2018). Chemodosimeter for Selective and Sensitive Chromogenic and Fluorogenic Detection of Mustard Gas for Real Time Analysis. *Analytical Chemistry*, 90(2), 1417-1422.
- Küster, E. (2005). Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 75(1), 76-85.
- Lademann, J., 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 Pharmacology and Physiology*, 24(2), 87-92.
- Lake, W. A., Divarco, S., Schulze, P., & Gougelet, R. (2013, août 1). *Guidelines for Mass Casualty Decontamination During an HAZMAT/Weapon of Mass Destruction Incident : Volumes I and II* [Article]. United States. Army Research, Development, and Engineering Command; Edgewood Chemical Biological Center. Homeland Security Digital Library; United States. Army Research, Development, and Engineering Command; Edgewood Chemical Biological Center.
- Lane, M. E. (2013). Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 447(1), 12-21.
- Leclerc, T., Donat, N., Cirodde, A., Schaal, J.-V., & Barges, L. (2015). Brûlures en situation opérationnelle : Description et épidémiologie. *Médecine et armées*, 43(2), 133-138.
- Lessenger, J. E., & Reese, B. E. (1999). Rational Use of Cholinesterase Activity Testing in Pesticide Poisoning. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 12(4), 307-314.
- Leyva-Gómez, G., Santillan-Reyes, E., Lima, E., Madrid-Martínez, A., Krötzsch, E., Quintanar-Guerrero, D., Garcíadiego-Cázares, D., Martínez-Jiménez, A., Hernández Morales, M., Ortega-Peña, S., Contreras-Figueroa, M., Cortina-Ramírez, G., & Abarca-Buis, R. F. (2017). A novel hydrogel of poloxamer 407 and chitosan obtained by gamma irradiation exhibits physicochemical properties for wound management. *Materials Science and Engineering: C*, 74, 36-46.
- Lian, G., Chen, L., & Han, L. (2008). An evaluation of mathematical models for predicting skin permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(1), 584-598.
- Lomash, V., & Pant, S. C. (2014). A novel decontaminant and wound healant formulation of N,N'-dichloro-bis[2,4,6-trichlorophenyl]urea against sulfur mustard-induced skin injury. *Wound*

*Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 22(1), 85-95.

- López-Gálvez, N., Wagoner, R., Beamer, P., De Zapien, J., & Rosales, C. (2018). Migrant Farmworkers' Exposure to Pesticides in Sonora, Mexico. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(12), 2651.
- López-Lilao, A., Gómez-Tena, M. P., Mallol, G., & Monfort, E. (2017). Clay hydration mechanisms and their effect on dustiness. *Applied Clay Science*, 144, 157-164.
- Lorke, D. E., & Petroianu, G. A. (2019). Reversible cholinesterase inhibitors as pretreatment for exposure to organophosphates. A review. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 39(1), 101-116.
- Lydon, H., Hall, C., Matar, H., Dalton, C., Chipman, J. K., Graham, J. S., & Chilcott, R. P. (2018). The percutaneous toxicokinetics of VX in a damaged skin porcine model and the evaluation of WoundStat™ as a topical decontaminant. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 38(3), 318-328.
- Lydon, H. L., Hall, C. A., Dalton, C. H., Chipman, J. K., Graham, J. S., & Chilcott, R. P. (2017). Development of haemostatic decontaminants for treatment of wounds contaminated with chemical warfare agents. 3 : Evaluation of in vitro topical decontamination efficacy using damaged skin. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 37(8), 976-984.
- Macht, F., Eusterhues, K., Pronk, G. J., & Totsche, K. U. (2011). Specific surface area of clay minerals : Comparison between atomic force microscopy measurements and bulk-gas (N<sub>2</sub>) and -liquid (EGME) adsorption methods. *Applied Clay Science*, 53(1), 20-26.
- MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874-880.
- Maisanaba, S., Pichardo, S., Puerto, M., Gutiérrez-Praena, D., Cameán, A. M., & Jos, A. (2015). Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites : A review. *Environmental Research*, 138, 233-254.
- Mandour, R. A. (2013). Environmental Risks of Insecticides Cholinesterase Inhibitors. *Toxicology International*, 20(1), 30-34.
- Mannis, D., & Brandl, A. (2015). Efficacy of common decontamination methods for cleaning contaminated wounds. *Health Physics*, 108(1 Suppl 1), S5-S12.
- Marrs, T. C., Rice, P., & Vale, J. A. (2006). The Role of Oximes in the Treatment of Nerve Agent Poisoning in Civilian Casualties. *Toxicological Reviews*, 25(4), 297-323.
- Matar, H., Larner, J., Kansagra, S., Atkinson, K. L., Skamarauskas, J. T., Amlot, R., & Chilcott, R. P. (2014). Design and characterisation of a novel in vitro skin diffusion cell system for assessing mass casualty decontamination systems. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 28(4), 492-501.

## Références bibliographiques

- Matar, Hazem, Guerreiro, A., Piletsky, S. A., Price, S. C., & Chilcott, R. P. (2016). Preliminary evaluation of military, commercial and novel skin decontamination products against a chemical warfare agent simulant (methyl salicylate). *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 35(2), 137-144.
- Matejuk, A. (2018). Skin Immunity. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 66(1), 45-54.
- Mauro, M., Crosera, M., Monai, M., Montini, T., Fornasiero, P., Bovenzi, M., Adami, G., Turco, G., & Filon, F. L. (2019). Cerium Oxide Nanoparticles Absorption through Intact and Damaged Human Skin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(20).
- Mendonça dos Santos, A. C., Akkari, A. C. S., Ferreira, I. R. S., Maruyama, C. R., Pascoli, M., Guilherme, V. A., de Paula, E., Fraceto, L. F., de Lima, R., Melo, P. da S., & de Araujo, D. R. (2015). Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride : Sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, in vitro toxicity, and pharmacological evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2391-2401.
- Mendoza-Garcia, J., Sebastian, A., Alonso-Rasgado, T., & Bayat, A. (2015). Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin : Functional evaluation using photodynamic therapy. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 23(5), 685-702.
- Menon, G. K. (2002). New insights into skin structure : Scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, S3-S17.
- Menon, G. K., Cleary, G. W., & Lane, M. E. (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*, 435(1), 3-9.
- Mew, E. J., Padmanathan, P., Konradsen, F., Eddleston, M., Chang, S.-S., Phillips, M. R., & Gunnell, D. (2017). The global burden of fatal self-poisoning with pesticides 2006-15 : Systematic review. *Journal of Affective Disorders*, 219, 93-104.
- Millerioux, J., Cruz, C., Bazire, A., Polly, V., Lallement, G., Lefevre, L., & Josse, D. (2009). Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 23(1), 127-133.
- Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., & Kuca, K. (2011). METHOD OF STATIC DIFFUSION CELLS FOR ASSESSMENT OF PESTICIDES SKIN PERMEATION. *Military Medical Science Letters*, 80, 46-51.
- Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., & Kuca, K. (2015). Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(1), 32-36.
- Misik, J., Pavlikova, R., Josse, D., Cabal, J., & Kuca, K. (2012). In vitro skin permeation and decontamination of the organophosphorus pesticide paraoxon under various physical conditions—Evidence for a wash-in effect. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22(7), 520-525.

## Références bibliographiques

- Mnisi, R. L., & Ndibewu, P. P. (2017). Surface and adsorptive properties of Moringa oleifera bark for removal of V(V) from aqueous solutions. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(12), 606.
- Mohseni, M., Shamloo, A., Aghababaie, Z., Afjoul, H., Abdi, S., Moravvej, H., & Vossoughi, M. (2019). A comparative study of wound dressings loaded with silver sulfadiazine and silver nanoparticles : In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 564, 350-358.
- Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins : Biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 705-733.
- Moody, R. P., & Maibach, H. I. (2006). Skin decontamination : Importance of the wash-in effect. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 44(11), 1783-1788.
- Moore, C. A., Wilkinson, S. C., Blain, P. G., Dunn, M., Aust, G. A., & Williams, F. M. (2014). Percutaneous absorption and distribution of organophosphates (chlorpyrifos and dichlorvos) following dermal exposure and decontamination scenarios using in vitro human skin model. *Toxicology Letters*, 229(1), 66-72.
- Moraes, J. D. D., Bertolino, S. R. A., Cuffini, S. L., Ducart, D. F., Bretzke, P. E., & Leonardi, G. R. (2017). Clay minerals : Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw materials for therapeutic purposes-A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1-2), 213-219.
- Moreau, D., Chauvet, C., Etienne, F., Rannou, F. P., & Corté, L. (2016). Hydrogel films and coatings by swelling-induced gelation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(47), 13295-13300.
- Mousa, M., Evans, N. D., Oreffo, R. O. C., & Dawson, J. I. (2018). Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design : A review of clay bioactivity. *Biomaterials*, 159, 204-214.
- Mumford, H., Price, M. E., & Wetherell, J. R. (2008). A novel approach to assessing percutaneous VX poisoning in the conscious guinea-pig. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 28(5), 694-702.
- 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. *Environmental Health Perspectives*, 107(12), 933-974.
- Nachon, F., Brazzolotto, X., Trovaslet, M., & Masson, P. (2013). Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chemico-Biological Interactions*, 206(3), 536-544.
- Nadziakiewicza, M., Kehoe, S., & Micek, P. (2019). Physico-Chemical Properties of Clay Minerals and Their Use as a Health Promoting Feed Additive. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 9(10).
- 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.

## Références bibliographiques

- Natarajan, V. T., Ganju, P., Ramkumar, A., Grover, R., & Gokhale, R. S. (2014). Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. *Nature Chemical Biology*, 10(7), 542-551.
- Naughton, S. X., & Terry, A. V. (2018). Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology*, 408, 101-112.
- Nepovimova, E., & Kuca, K. (2018). Chemical warfare agent NOVICHOK - mini-review of available data. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 121, 343-350.
- Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P. W., & Schaefer, U. F. (2005). The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm® : An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 167-178.
- Ngo, M. A., O'Malley, M., & Maibach, H. I. (2010). Percutaneous absorption and exposure assessment of pesticides. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 30(2), 91-114.
- Ngulube, T., Gumbo, J. R., Masindi, V., & Maity, A. (2017). An update on synthetic dyes adsorption onto clay based minerals : A state-of-art review. *Journal of Environmental Management*, 191, 35-57.
- Niranjan, R., Kaushik, M., Prakash, J., Venkataprasanna, K. S., Christy, A., Pannerselvam, B., & Venkatasubbu, G. D. (2019). Enhanced wound healing by PVA/Chitosan/Curcumin patches : In vitro and in vivo study. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 182, 110339.
- OECD. 2004 "Guideline for the testing of chemicals: skin absorption: in vitro method (n°428)"
- OECD. 2013 "Ligne directrice pour les essais de produits chimiques - Poisson, essai de toxicité aiguë au stade embryonnaire (n°236)"
- Pacsial-Ong, E. J., & Aguilar, Z. P. (2013). Chemical warfare agent detection : A review of current trends and future perspective. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 5, 516-543.
- Pan-On, S., Rujvivipat, S., Ounaroon, A., & Tiyaboonchai, W. (2018). Development and characterization of clay facial mask containing turmeric extract solid dispersion. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(4), 590-597.
- Park, S.-M., Alessi, D. S., & Baek, K. (2019). Selective adsorption and irreversible fixation behavior of cesium onto 2:1 layered clay mineral : A mini review. *Journal of Hazardous Materials*, 369, 569-576.
- Paumier, S., Pantet, A., & Monnet, P. (2008). Evaluation of the organization of the homoionic smectite layers (Na<sup>(+)</sup> or Ca<sup>(2+)</sup>) in diluted dispersions using granulometry, microscopy and rheometry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 141(1-2), 66-75.
- Pavlikova, R., Misik, J., Cabal, J., Marek, J., & Kuca, K. (2018). In vitro skin decontamination of paraoxon – wet-type cleansing effect of selected detergents. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 37(1), 77-83.

## Références bibliographiques

- Petroianu, G. A., Nurulain, S. M., Shafiullah, M., Hasan, M. Y., Kuča, K., & Lorke, D. E. (2013). Usefulness of administration of non-organophosphate cholinesterase inhibitors before acute exposure to organophosphates : Assessment using paraoxon. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 33(9), 894-900.
- Phuong, C., & Maibach, H. I. (2016). Recent knowledge : Concepts of dermal absorption in relation to skin decontamination. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 36(1), 5-9.
- Piérard, G. E. (1999). EEMCO Guidance to the in vivo Assessment of Tensile Functional Properties of the Skin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 12(6), 352-362.
- Pitschmann, V. (2014). Overall view of chemical and biochemical weapons. *Toxins*, 6(6), 1761-1784.
- Poirier, L., Jacquet, P., Elias, M., Daudé, D., & Chabrière, E. (2017). La décontamination des organophosphorés : Vers de nouvelles alternatives. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 75(3), 209-226.
- Pope, C. N. (1999). Organophosphorus pesticides : Do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 2(2), 161-181.
- Post, J. L., & Crawford, S. (2007). Varied forms of palygorskite and sepiolite from different geologic systems. *Applied Clay Science*, 36(4), 232-244.
- Potgieter, J. H., Potgieter-Vermaak, S. S., & Kalibantonga, P. D. (2006). Heavy metals removal from solution by palygorskite clay. *Minerals Engineering*, 19(5), 463-470.
- 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(2), 484-490.
- Proksch, E. (2018). PH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*, 45(9), 1044-1052.
- Proksch, E., Fölster-Holst, R., Bräutigam, M., Sepehrmanesh, M., Pfeiffer, S., & Jensen, J.-M. (2009). Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 7(10), 899-910.
- Pusch, R. (2006). Chapter 6 Mechanical Properties of Clays and Clay Minerals. In Faïza Bergaya, B. K. G. Theng, & G. Lagaly (Éds.), *Developments in Clay Science* (Vol. 1, p. 247-260). Elsevier.
- Rawlings, A. V., & Matts, P. J. (2005). Stratum corneum moisturization at the molecular level : An update in relation to the dry skin cycle. *The Journal of Investigative Dermatology*, 124(6), 1099-1110.
- Renou, J., Mercey, G., Verdelet, T., Păunescu, E., Gillon, E., Arboléas, M., Liodice, M., Kliachyna, M., Baati, R., Nachon, F., Jean, L., & Renard, P.-Y. (2013). Syntheses and in vitro evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Chemico-Biological Interactions*, 203(1), 81-84.

## Références bibliographiques

- Riviere, J. E., Smith, C. E., Budsaba, K., Brooks, J. D., Olajos, E. J., Salem, H., & Monteiro-Riviere, N. A. (2001). Use of methyl salicylate as a simulant to predict the percutaneous absorption of sulfur mustard. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 21(2), 91-99.
- Roul, A., Le, C.-A.-K., Gustin, M.-P., Clavaud, E., Verrier, B., Pirot, F., & Falson, F. (2017). Comparison of four different fuller's earth formulations in skin decontamination. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, 37(12), 1527-1536.
- Rousseau, J. M., Rüttimann, M., & Brinquin, L. (2000). Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : Insecticides et armes chimiques. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 19(8), 588-598.
- Salem, H., Jr, A. L. T., & Smart, J. K. (2019). *Chemical Warfare Agents : Biomedical and Psychological Effects, Medical Countermeasures, and Emergency Response p1-p20*. CRC Press.
- Salerno, A., Bolzinger, M.-A., Rolland, P., Chevalier, Y., Josse, D., & Briançon, S. (2016). Pickering emulsions for skin decontamination. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 34, 45-54.
- Salerno, A., Devers, T., Bolzinger, M.-A., Pelletier, J., Josse, D., & Briançon, S. (2017). In vitro skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO<sub>2</sub>. *Chemico-Biological Interactions*, 267, 57-66.
- Salles, F., Bildstein, O., Douillard, J. M., Jullien, M., Raynal, J., & Van Damme, H. (2010). On the Cation Dependence of Interlamellar and Interparticular Water and Swelling in Smectite Clays. *Langmuir*, 26(7), 5028-5037.
- Salmon, D., Gilbert, E., Gioia, B., Haftek, M., Pivot, C., Verrier, B., & Pirot, F. (2015). New easy handling and sampling device for bioavailability screening of topical formulations. *European Journal of Dermatology: EJD*, 25 Suppl 1, 23-29.
- Salter, W. B., Owens, J. R., & Wander, J. D. (2011). Methyl salicylate : A reactive chemical warfare agent surrogate to detect reaction with hypochlorite. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(11), 4262-4267.
- Sandri, G., Bonferoni, M. C., Ferrari, F., Rossi, S., Aguzzi, C., Mori, M., Grisoli, P., Cerezo, P., Tenci, M., Viseras, C., & Caramella, C. (2014). Montmorillonite-chitosan-silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions : In vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. *Carbohydrate Polymers*, 102, 970-977.
- Schlupp, P., Weber, M., Schmidts, T., Geiger, K., & Runkel, F. (2014). Development and validation of an alternative disturbed skin model by mechanical abrasion to study drug penetration. *Results in Pharma Sciences*, 4, 26-33.
- Schwartz, M. D., Hurst, C. G., Kirk, M. A., & Braue, S. J. D. R. and E. H. (2012, juillet 31). *Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) for the Decontamination of Chemical Warfare Agent (CWA) Dermal Exposure*. Current Pharmaceutical Biotechnology.

## Références bibliographiques

- Sekkat, N., Kalia, Y. N., & Guy, R. H. (2002). Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(11), 2376-2381.
- Sellik, A., Pollet, T., Ouvry, L., Briançon, S., Fessi, H., Hartmann, D. J., & Renaud, F. N. R. (2017). Degradation of paraoxon (VX chemical agent simulant) and bacteria by magnesium oxide depends on the crystalline structure of magnesium oxide. *Chemico-Biological Interactions*, 267, 67-73.
- Sequeira, R. S., Miguel, S. P., Cabral, C. S. D., Moreira, A. F., Ferreira, P., & Correia, I. J. (2019). Development of a poly(vinyl alcohol)/lysine electrospun membrane-based drug delivery system for improved skin regeneration. *International Journal of Pharmaceutics*, 570, 118640.
- Sezigen, S., & Kenar, L. (2020). Recent sulfur mustard attacks in Middle East and experience of health professionals. *Toxicology Letters*, 320, 52-57.
- Sharma, N., Chaudhary, M., Butola, B. S., Jeyabalaji, J. K., Pathak, D. P., & Sharma, R. K. (2019). Preparation, characterization and evaluation of the zinc titanate and silver nitrate incorporated wipes for topical chemical and biological decontamination. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 96, 183-196.
- Shihana, F., Worek, F., Dassanayake, G. A., Rathgamage, S. H., Dhanarisi, J., & Buckley, N. A. (2019). Evaluation of the accuracy of "ChE check mobile" in measurement of acetylcholinesterase in pesticide poisoning. *Clinical Toxicology*, 57(6), 411-414.
- Simon, G. A., & Maibach, H. I. (2000). The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man : Qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 13(5), 229-234.
- Sirousazar, M., Jahani-Javanmardi, A., Kheiri, F., & Hassan, Z. M. (2016). In vitro and in vivo assays on egg white/polyvinyl alcohol/clay nanocomposite hydrogel wound dressings. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 27(16), 1569-1583.
- Sorrell, J. M., & Caplan, A. I. (2004). Fibroblast heterogeneity : More than skin deep. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 5), 667-675.
- Spiandore, M., Piram, A., Lacoste, A., Josse, D., & Doumenq, P. (2014). Hair analysis as a useful procedure for detection of vapour exposure to chemical warfare agents : Simulation of sulphur mustard with methyl salicylate. *Drug Testing and Analysis*, 6 Suppl 1, 67-73.
- 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., Grygar, T. M., Opluštil, F., & Němec, T. (2012). Ge<sup>4+</sup> doped TiO<sub>2</sub> for stoichiometric degradation of warfare agents. *Journal of Hazardous Materials*, 227-228, 62-67.
- Sun, X., Dai, H., Guo, P., & Sha, X. (2019). Biocompatibility of a New Kind of Polyvinyl Alcohol Embolic Microspheres : In Vitro and In Vivo Evaluation. *Molecular Biotechnology*, 61(8), 610-621.

## Références bibliographiques

- Sydnés, L. K. (2018). How to curb production of chemical weapons. *Nature*, 556(7701), 293-295.
- Szinicz, L. (2005). History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*, 214(3), 167-181.
- 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. *Human & Experimental Toxicology*, 26(2), 135-141.
- Taysse, L., Dorandeu, F., Daulon, S., Foquin, A., Perrier, N., Lallement, G., & Breton, P. (2011). 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 exposure. *Human & Experimental Toxicology*, 30(6), 491-498.
- Tazart, A., Bolzinger, M. A., Moureau, A., Molina, T., Coudert, S., Angulo, J. F., Briançon, S., & Griffiths, N. M. (2017). Penetration and decontamination of americium-241 ex vivo using fresh and frozen pig skin. *Chemico-Biological Interactions*, 267, 40-47.
- Thabet, H., Brahmi, N., Kouraïchi, N., Elghord, H., & Amamou, M. (2009). Intoxications par les pesticides organophosphorés : Nouveaux concepts. *Réanimation*, 18(7), 633-639.
- Thiermann, H., Szinicz, L., Eyer, P., Zilker, T., & Worek, F. (2005). Correlation between red blood cell acetylcholinesterase activity and neuromuscular transmission in organophosphate poisoning. *Chemico-Biological Interactions*, 157-158, 345-347.
- Thorat, K., Pandey, S., Chandrashekarappa, S., Vavilthota, N., Hiwale, A. A., Shah, P., Sreekumar, S., Upadhyay, S., Phuntsok, T., Mahato, M., Mudnakudu-Nagaraju, K. K., Sunnapu, O., & Vemula, P. K. (2018). Prevention of pesticide-induced neuronal dysfunction and mortality with nucleophilic poly-Oxime topical gel. *Science Advances*, 4(10), eaau1780.
- Thors, L., Koch, B., Koch, M., Hägglund, L., & Bucht, A. (2016). In vitro human skin penetration model for organophosphorus compounds with different physicochemical properties. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 32, 198-204.
- Thors, L., Koch, M., Wigenstam, E., Koch, B., Hägglund, L., & Bucht, A. (2017). Comparison of skin decontamination efficacy of commercial decontamination products following exposure to VX on human skin. *Chemico-Biological Interactions*, 273, 82-89.
- Trenque, I., Magnano, G. C., Bárta, J., Chaput, F., Bolzinger, M. A., Pitault, I., Briançon, S., Masenelli-Varlot, K., Bugnet, M., Dujardin, C., Čuba, V., & Amans, D. (2020). Synthesis routes of CeO<sub>2</sub> nanoparticles dedicated to organophosphorus degradation : A benchmark. *CrystEngComm*, 22(10), 1725-1737.
- Tsai, Y.-L., Chang, P.-H., Gao, Z.-Y., Xu, X.-Y., Chen, Y.-H., Wang, Z.-H., Chen, X.-Y., Yang, Z.-Y., Wang, T.-H., Jean, J.-S., Li, Z., & Jiang, W.-T. (2016). Amitriptyline removal using palygorskite clay. *Chemosphere*, 155, 292-299.
- Uddin, M. K. (2017). A review on the adsorption of heavy metals by clay minerals, with special focus on the past decade. *Chemical Engineering Journal*, 308, 438-462.

- Ur-Rehman, T., Tavelin, S., & Gröbner, G. (2010). Effect of DMSO on micellization, gelation and drug release profile of Poloxamer 407. *International Journal of Pharmaceutics*, 394(1), 92-98.
- Vale, A., & Lotti, M. (2015). Chapter 10—Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. In M. Lotti & M. L. Bleecker (Éds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 131, p. 149-168). Elsevier.
- Vale, A., Marrs, T. C., & Rice, P. (2012). Chemical terrorism and nerve agents. *Medicine*, 40(2), 77-79.
- Vale, J. A., Marrs, T. C., & Maynard, R. L. (2018). Novichok : A murderous nerve agent attack in the UK. *Clinical Toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 56(11), 1093-1097.
- van Beinum, W., Beulke, S., & Brown, C. D. (2005). Pesticide sorption and diffusion in natural clay loam aggregates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9146-9154.
- van Helden, H. P. M., Joosen, M. J. A., & Philippens, I. H. C. (2011). Non-enzymatic pretreatment of nerve agent (soman) poisoning : A brief state-of-the-art review. *Toxicology Letters*, 206(1), 35-40.
- Vayron, P., Renard, P. Y., Taran, F., Créminon, C., Frobert, Y., Grassi, J., & Mioskowski, C. (2000). Toward antibody-catalyzed hydrolysis of organophosphorus poisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(13), 7058-7063.
- Villaverde, J., van Beinum, W., Beulke, S., & Brown, C. D. (2009). The kinetics of sorption by retarded diffusion into soil aggregate pores. *Environmental Science & Technology*, 43(21), 8227-8232.
- Weir, A. G. A., Makin, S., & Breeze, J. (2020). Nerve agents : Emergency preparedness. *BMJ Military Health*, 166(1), 42-46.
- Worek, F., Wille, T., Koller, M., & Thiermann, H. (2016). Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Archives of Toxicology*, 90(9), 2131-2145.
- Worek, F., Wosar, A., Baumann, M., Thiermann, H., & Wille, T. (2017). Development of a sensitive, generic and easy to use organophosphate skin disclosure kit. *Toxicology Letters*, 280, 190-194.
- Yozzo, K. L., McGee, S. P., & Volz, D. C. (2013). Adverse outcome pathways during zebrafish embryogenesis : A case study with paraoxon. *Aquatic Toxicology*, 126, 346-354.
- Yuan, S., Gao, Y., Ji, W., Song, J., & Mei, X. (2018). The evaluation of acute physiology and chronic health evaluation II score, poisoning severity score, sequential organ failure assessment score combine with lactate to assess the prognosis of the patients with acute organophosphate pesticide poisoning. *Medicine*, 97(21), e10862.
- Zhang, Y., Lane, M. E., Hadgraft, J., Heinrich, M., Chen, T., Lian, G., & Sinko, B. (2019). A comparison of the in vitro permeation of niacinamide in mammalian skin and in the Parallel Artificial Membrane Permeation Assay (PAMPA) model. *International Journal of Pharmaceutics*, 556, 142-149.

## Références bibliographiques

- Zhong, L., Tang, A., Yan, P., Wang, J., Wang, Q., Wen, X., & Cui, Y. (2019). Palygorskite-template amorphous carbon nanotubes as a superior adsorbent for removal of dyes from aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, *537*, 450-457.
- Zhu, H., Jung, E.-C., Phuong, C., Hui, X., & Maibach, H. (2016). Effects of soap-water wash on human epidermal penetration. *Journal of Applied Toxicology: JAT*, *36*(8), 997-1002.
- Zimmerman, A., Bai, L., & Ginty, D. D. (2014). The gentle touch receptors of mammalian skin. *Science (New York, N.Y.)*, *346*(6212), 950-954.
- Zouboulis, C. C., Picardo, M., Ju, Q., Kurokawa, I., Töröcsik, D., Bíró, T., & Schneider, M. R. (2016). Beyond acne : Current aspects of sebaceous gland biology and function. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *17*(3), 319-334.



## Résumé

La contamination de populations civiles et militaires via l'utilisation d'armes chimiques est un risque actuel et important. De plus, l'exposition à des chimiques toxiques industriels relargués dans l'atmosphère lors d'accidents peut aussi être source de contamination systémique. De par leurs propriétés physicochimiques, certains agents vont entraîner une contamination par la voie cutanée. La décontamination doit intervenir le plus tôt possible pour retirer l'agent contaminant et ainsi diminuer son passage à travers la peau. Différents produits peuvent assurer ce rôle, dont la terre de foulon, argile possédant une forte capacité adsorbante lorsqu'elle est utilisée sous forme de poudre. L'objectif de ce travail a consisté à développer une formulation innovante à base de terre de foulon, afin d'améliorer son pouvoir décontaminant et d'élargir son champ d'utilisation.

Par la mise en place d'une méthodologie de diffusion *ex vivo* avec le dispositif Vitropharma®, l'étude de la pénétration de simulants de composés organophosphorés et de l'ypérite a été possible. L'évaluation de l'efficacité de décontamination de suspensions aqueuses de terre de foulon a ainsi permis de valider la peau de cochon comme modèle prédictif de la peau humaine pour les études de pénétration percutanée. La comparaison du pouvoir décontaminant de différentes argiles sous forme de poudres et de suspensions, ainsi que l'utilisation de différents simulants ont mis en évidence une relation entre décontamination, surface spécifique et capacité de gonflement de l'argile. Par ailleurs, l'importance du stratum corneum comme compartiment réservoir du contaminant a été reconfirmée. Cette nouvelle méthode de décontamination a également été évaluée sur un modèle de peau lésée, et une modification de la formulation a été initiée pour obtenir un hydrogel.

Mots clés : terre de foulon, décontamination cutanée, suspension, paraoxon, salicylate de méthyle, diffusion *ex vivo*

## Abstract

The contamination of civilian and military populations through the use of chemical weapons is a current and important risk. In addition, exposure to toxic industrial chemical released into the atmosphere during accidents can also be a source of systemic contamination. Due to their physicochemical properties, some agents will cause contamination through the skin. Decontamination must be carried out as soon as possible to remove the contaminating agent and thus reduce its penetration through the skin. Various products can play this role, including Fuller's earth, a clay with a high adsorbent capacity when used in powder form. The objective of this work was to develop an innovative formulation based on Fuller's earth, in order to improve its decontaminating power and broaden its field of use.

By setting up an *ex vivo* diffusion methodology with the Vitropharma® device, the study of the penetration of organophosphorus and mustard gas simulants was possible. Thus the evaluation of the decontamination efficiency of aqueous suspensions of Fuller's earth made it possible to validate pig skin as a predictive model of human skin for percutaneous penetration studies. The comparison of the decontamination power of different clays in powder and suspension forms, as well as the use of different simulants, revealed a relationship between decontamination, specific area and swelling capacity of the clay. Furthermore, the importance of the stratum corneum as a reservoir compartment for the contaminant was reconfirmed. This new decontamination method was also evaluated on an injured skin model, and a modification of the formulation was initiated to obtain an innovative hydrogel.

Keywords : Fuller's earth, skin decontamination, suspension, paraoxon, methyl salicylate, *ex vivo* diffusion