



HAL
open science

Décontamination cutanée face aux composés organophosphorés : de la conception à l'évaluation in vivo d'une formulation filmogène à base de terre de foulon

Kardelen Durmaz

► **To cite this version:**

Kardelen Durmaz. Décontamination cutanée face aux composés organophosphorés : de la conception à l'évaluation in vivo d'une formulation filmogène à base de terre de foulon. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10251 . tel-04710796

HAL Id: tel-04710796

<https://theses.hal.science/tel-04710796v1>

Submitted on 26 Sep 2024

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.

Université Claude Bernard  Lyon 1

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale EDISS 205
Interdisciplinaire Sciences-Santé**

Discipline : Santé, biotechnologie et microbiologie

Soutenue publiquement le 30/11/2023, par :

Kardelen Durmaz

**Décontamination cutanée face aux composés
organophosphorés : de la conception à
l'évaluation *in vivo* d'une formulation
filmogène à base de terre de foulon**

Devant le jury composé de :

Pr. Christine BALDESCHI, PU, CNRS - Université d'Evry-Val d'Essonne
Dr. Francisco FERNANDES, MCU, CNRS - Université Paris Sorbonne
Dr. Florian NACHON, chercheur, IRBA - Ministère des Armées
Pr. Stéphanie BRIANCON, PU, CNRS, LAGEPP - Université Claude Bernard Lyon 1
Dr. Anne-Sophie HANAK, chercheuse, IRBA - Ministère des Armées
Dr. Jérôme SOHIER, DR, CNRS - Université Claude Bernard Lyon 1

Rapporteuse
Rapporteur
Rapporteur
Présidente
Examinatrice
Directeur de thèse



Ces travaux s'intègrent dans le cadre d'une bourse de thèse délivrée par l'Agence de l'Innovation et de la Défense (AID) (n°2020017). Les travaux ont été réalisés sous la supervision du Dr. Jérôme Sohier au sein Laboratoire de Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique (LBTi – UMR5305) dans l'équipe « Vecteurs colloïdaux et ingénierie thérapeutique ciblée » à l'IBCP et à la faculté de pharmacie de Rockefeller (UBCL 1).



Remerciements

Je voudrais exprimer mes remerciements à l'agence de l'innovation et de la défense pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail, ainsi que le soutien que vous m'avez apporté à la DGA et à l'IRBA. Je tiens à remercier le Dr. Florian Nachon, le Dr. Francisco Fernandes et la Dre. Christine Baldeschi qui m'ont fait l'honneur de rapporter ces travaux de thèse. Mes remerciements s'adressent également à la Pre. Stéphanie Briançon et à la Dre Anne-Sophie Annak pour avoir accepté d'examiner cette thèse et d'en faire partie intégrante de mon jury.

Cette belle expérience n'aurait pas été possible sans l'accueil et le soutien d'Alix pour mon stage de fin d'étude. J'ai découvert et appris tant de choses sur un sujet qui m'était jusqu'alors inconnu, au point où j'ai radicalement changé d'avis sur l'idée de poursuivre une thèse. Mes sincères remerciements vont au Dr. Bernard Verrier pour avoir cru en moi et m'avoir offert l'opportunité de poursuivre mes travaux de stage pendant ces trois années. Je n'oublierai jamais le soutien inestimable que vous m'avez apporté, surtout lors des moments les plus difficiles.

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de thèse, le Dr. Jérôme Sohier, d'avoir accepté de superviser ces travaux alors que nous ne nous connaissions pas du tout. Bien que ce sujet te soit totalement nouveau, tu as su me conseiller et m'aider grâce à ton expertise dans le domaine. Merci pour la liberté que tu m'as accordée pour mener à bien ce projet, cela m'a permis de progresser à la fois sur le plan professionnel et personnel.

Un immense merci à toute l'équipe Verrier/Monge, de la Team Gerland à la Team Rock, pour ces moments exceptionnels passés à vos côtés. À Pierre, Renaud, Cynthia, Claire, Sophie, Fanny, Altan, Jean-Yves, Céline, Arthur, Romain, Danielle, Valentine, Jean-Paul, Lois, Iris, Aurore, Lucas, Naima, Sandra, Valentin, Margot, Camille.A, Camille.C, Arnaud, Cloé, Chloé.C, Sarah, Magaly, Marie.H, Marie. B, Benjamine, Hiba et Nicolas, merci infiniment.

Notre être de lumière, Jean-Paul, je tiens à te remercier infiniment pour ton soutien inestimable au cours de ces trois années. Honnêtement, je ne suis pas certaine que j'aurais pu réaliser un travail en HPLC d'une telle qualité sans ton aide. Merci pour ta bienveillance, pour tous les moments que tu as pris pour me conseiller et m'encourager tout au long de cette aventure. Merci pour tout ! Renaud et Cynthia, vous connaissez mon amour pour les souris, et je peux vous assurer que je ne souhaite vraiment pas recommencer cette expérience. Cependant, j'ai réussi à la surmonter et à la mener à bien grâce à vous deux. Vous êtes d'incroyables expérimentateurs animaux, et tout le monde mériterait de travailler avec vous

(même si, en ce moment, vous ne rêvez que de vacances ahah). Merci beaucoup. La team docs, composée uniquement de femmes extraordinaires - Chloé, Magaly, Benjamine, Camille, Sarah, Lucile, Justine, Manon, Laura, Emma, Valentine, Fanny, Marie B et Marie H. Merci d'avoir été les personnes exceptionnelles que vous êtes, et surtout pour votre bonne humeur et pour nos soirées à chanter du Diam's à en perdre la voix. Je ne pouvais pas rêver mieux comme team à mes côtés pour ces trois années.

Pendant cette thèse, j'ai eu l'opportunité d'encadrer une stagiaire, Magaly. Dès notre première rencontre lors de l'entretien, j'ai senti que nous allions passer six merveilleux mois ensemble. En réalité, je n'ai pas eu tort, car tu as été tellement généreuse et incroyable que tu as été ma plus belle rencontre amicale au cours de cette thèse. Merci pour tout le travail que tu as fourni pour amener cette thèse là où elle en est, pour m'avoir encouragée et aidée jusqu'au dernier moment pour ce manuscrit. Merci pour tous ces moments de folie passés à tes côtés, je n'aurais pas pu rêver mieux que de la finir avec toi. Maintenant, c'est à ton tour, je n'ai aucun doute sur la thèse que tu vas réaliser, et j'ai hâte de te voir obtenir ton diplôme de Docteur ! (Kardy, ne pleure pas)

Je n'aurais jamais imaginé qu'au sein d'une équipe de recherche, une entente aussi chaleureuse puisse se créer entre les doctorants. Chloé, j'aurais tellement de choses à dire à ton sujet, mais ta bonne humeur quotidienne va beaucoup me manquer. Je quitte ce laboratoire en étant une personne différente, car maintenant, j'ai beaucoup de "ref" dans mon répertoire. Ma complice de galère en anglais, ainsi que tes pâtes au ketchup, vont me manquer énormément. Et surtout, believe crois en tes rêves, je t'adore Chloé ! Sarah, notre chère maman attentionnée, on a commencé cette aventure ensemble en plein déménagement et l'avons terminé de la même manière. Merci d'avoir été là au quotidien, surtout pour tous les moments où tu étais l'une des premières à dire oui pour aller s'amuser (je n'irais jamais sans toi à l'étoile trop, c'est promis). Tu as été si présente pour moi du début jusqu'à la fin (on connaît) que je voulais te dire que tout le monde rêverait d'avoir une amie comme toi au quotidien. Marie, notre sportive de l'équipe qui a su nous motiver même quand on avait plus la force ! Merci d'avoir été la personne si touchante que tu es. Grâce à toi, je peux le dire maintenant, j'ai mangé les meilleures fondues suisses, et j'ai tellement hâte de te revoir pour savourer les meilleurs Moscato d'Asti. Force à toi pour ta nouvelle expérience aux USA, on ne doute pas toi ! Lucas, ou devrait-je dire plutôt Lulu, spécialiste des surnoms ! On sait très bien d'où vient le mien, Kardy ! Je l'adopte vraiment, un peu comme tout le monde à vrai dire. Merci pour tous ces moments passés à tes côtés et d'avoir été là au quotidien pour nous remonter le moral. Je ne te remercierai jamais assez pour ta contribution à ma thèse. Je n'oublierai jamais le jour où on a réussi à faire un test de

peeling avec ce que tu nous as modélisé hihi, et surtout pour Magaly aussi. Tu ne mérites que le meilleur pour la suite, vraiment ! #Vivrelibre

Camille, je pense que je pourrais t'écrire des pages et des pages de remerciements. Je ne sais même pas par où commencer tant il y a de choses à dire. Cette thèse n'aurait jamais été la même sans toi. Merci de m'avoir soutenue de cette manière, du début jusqu'à la fin. L'avantage d'avoir commencé en même temps, c'est que nous avons pu traverser les pires et les meilleurs moments à deux. Tous ces nouveaux restaurants italiens que l'on a pu tester, tous ces moments à pleurer pour tout et n'importe quoi, toutes ces fois où l'on a chanté « clic clic pan pan pan » pour se motiver à écrire, pour toutes nos sessions live star academy, je n'en oublierai aucune. C'est grâce à toi que j'ai réussi à surmonter les moments les plus difficiles, tu es mon rayon de soleil. Tu es une personne unique qui ne mérite que le meilleur.

A tous mes amis qui m'ont soutenue du premier jour jusqu'au dernier, et qui m'ont accepté comme je suis. Neriman, Sultan, Lucie.E, Nadia, Maeva, Hugo, Lucie.V, Nour, Sara, Hinda, Gwen, Nayilat, Myriam et Cybelle, je suis très chanceuse de vous avoir à mes côtés.

Je voudrais particulièrement remercier ma famille pour tout l'encouragement qu'ils m'ont donné dès le début et qui ont cru en moi à chaque instant. Un grand merci à Ozey, Filo et à Fatma tata pour votre immense amour. A la personne qui compte le plus dans ce monde, ma mère, qui a cru en moi et qui a su me remonter le moral comme personne d'autres. Je lui dédie tout ce travail qui sans elle, rien de tout cela n'aurait pu aboutir, je le sais. Elle est tellement fière de moi, que je le suis sans doute un peu aussi. A la confiance qu'elle a eue en moi, depuis les premiers moments où l'on m'a dit que je ne réusserais pas, tu es la mère que tout le monde mérite d'avoir. Un dernier remerciement pour ma sœur Delphine et à mon frère Deniz, je crois en vous comme vous avez cru en moi, je vous aime de tout mon cœur.

A croire les autres, je ne serais jamais Docteure aujourd'hui. Ne laissez jamais quiconque vous dire que vous en êtes incapable, car personne ne sait mieux que vous ce que vous voulez faire de votre vie.

A ces 3 années incroyables passées à vos côtés, bien récompensées.

Résumé

Bien que les méthodes actuelles pour la décontamination cutanée des agents chimiques de guerre (utilisation de la terre de foulon sous forme de poudre, de l'eau \pm savonneuse et du reactive skin decontamination lotion) présentent un fort intérêt, en particulier face aux composés organophosphorés, certaines limites entravent leur utilisation. Ces limitations, telles que la volatilisation des particules de terre de foulon (TF), le phénomène de « wash-in », ainsi que le coût élevé du RSDL, suscitent une réflexion en vue de développer une nouvelle approche de décontamination capable de surmonter ces défis. En dépit des avancées progressivement réalisées concernant les nouvelles méthodes de décontamination, aucune solution ne se présente actuellement comme étant adapté à une mise en œuvre sur le terrain par les forces militaires en cas d'attaques chimiques, à part les méthodes existantes. Dans ce contexte, cette thèse s'est principalement concentrée sur la conception et à l'évaluation d'une nouvelle formulation novatrice dédiée à la décontamination cutanée vis-à-vis des composés organophosphorés, en particulier le paraoxon-ethyl (POX). Cette nouvelle formulation repose sur l'utilisation d'un polymère filmogène, l'alcool polyvinylique (PVA), auquel la TF et des surfactants (lauryl glucoside ou du decyl glucoside) ont été ajoutés en vue d'obtenir des formulations homogènes douées de propriétés adsorbantes.

Dans un premier temps, le processus de développement a permis de sélectionner 4 formulations présentant les meilleures propriétés filmogènes, temps de séchage et de capacité de décontamination *in vitro* (> 95%). Ces formulations ont ensuite été caractérisées pour confirmer leur aptitude à une application cutanée. Leur rigidité ainsi que leur propriété de pelage permettent une élimination aisée de la peau, sans effritement ni cassure. Leur pouvoir de séquestration, principalement due à la présence de TF, favorise une gestion plus efficace du POX et restreint la volatilisation des particules de TF.

Dans un second temps, l'efficacité de décontamination *ex vivo* des formulations filmogènes de TF a été comparée à celles composées d'un autre phyllosilicate, la terre de Sommières (TS) sur des explants de peau d'origine porcine. Cette étude a souligné l'importance de décontaminer la peau à la suite d'une exposition au POX, afin de limiter sa pénétration, avec une plus-value pour une formulation particulière, qui a surpassé les méthodes de décontamination de références.

Enfin, la biocompatibilité de ces différentes formulations a été évaluée *in vitro* en utilisant des fibroblastes dermiques ainsi qu'*in vivo* sur des souris SKH1 (sans poils et immunocompétentes), avant d'évaluer leur capacité de décontamination *in vivo* face au POX et en comparaison des méthodes standards. Les résultats de cette étude *in vivo*, bien que non-

concluant à ce stade, soulignent la nécessité de réitérer cette évaluation en prenant mieux en compte les mécanismes physiques inhérents à chaque méthode de décontamination. Cela permettra de les comparer de manière non biaisée et ainsi de valider précisément le fort potentiel des formulations, comme démontré *in vitro*.

Mots clés : décontamination cutanée, POX, terre de foulon, formulation filmogène, biocompatibilité, efficacité de décontamination

Summary

While current methods for skin decontamination of chemical warfare agents show significant interest and usage, particularly against organophosphorus compounds, limitations hinder their widespread application. These limitations include the aerosolization of fuller's earth (FE) particles, the "wash-in" phenomenon with high-flow water, and the high cost of RSDL. These issues have led to the development of new decontamination methods to address these shortcomings. Despite ongoing advancements in this field, none currently stand out as suitable for on-field deployment by military forces in the event of chemical attacks.

In this context, the primary objective of this thesis focused on the design and evaluation of an innovative formulation dedicated to skin decontamination against organophosphorus compounds, particularly paraoxon-ethyl (POX). This new formulation was crafted from a film-forming polymer, polyvinyl alcohol (PVA), to which FE and surfactants (lauryl glucoside or decyl glucoside) were added to achieve homogeneous formulations with adsorptive properties.

In an initial phase, the development led to the selection of four formulations exhibiting superior film-forming properties, drying times, and *in vitro* decontamination capacity (>95%). These formulations were subsequently characterized to confirm their suitability for cutaneous application. Their rigidity and peel-off ability allow for easy removal from the skin without crumbling or breaking. Their sequestration power, primarily attributed to the presence of FE, facilitates more effective management of POX and restricts the aerosolization of FE particles.

Subsequently, the *ex vivo* decontamination efficiency of FE film-forming formulations was compared to those prepared with another phyllosilicate, Terre de Sommières (TS), on pig ear skin explants. This study emphasized the importance of decontaminating the skin following POX exposure to limit its penetration, with a specific formulation, P20F9D3, surpassing decontamination methods of reference.

Finally, the biocompatibility of these different formulations was evaluated *in vitro* using dermal fibroblasts and *in vivo* on SKH1 mice (hairless and immunocompetent). Subsequently, their *in vivo* decontamination efficiency against POX, was assessed and compared to established reference methods. Although the results obtained are not conclusive, they emphasize the imperative to revisit and refine this evaluation, accounting for the distinct physical mechanisms inherent to each decontamination method. Such a revisitation will enable an unbiased comparison and the precise validation of their robust potential, as initially demonstrated *in vitro*.

Keywords: Skin decontamination, POX, fuller's earth, film-forming formulation, biocompatibility, decontamination efficiency

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	7
Summary	9
Table des matières	11
Abréviations	15
Liste des illustrations	17
Listes des tableaux	21
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	23
Chapitre 1 : Les agents chimiques de guerre	24
1. Historique.....	24
2. Les agents létaux.....	26
2.1. Les suffocants.....	26
2.2. Les hémotoxiques.....	26
2.3. Les vésicants.....	27
2.4. Les agents neurotoxiques.....	28
3. Les composés organophosphorés (COP).....	30
3.1. Utilisation en tant que pesticides par la population civile (OP).....	30
3.2. Utilisation en tant qu'agent neurotoxiques (NOP).....	31
4. Mode d'action des NOPs.....	34
4.1. Physiologie et mécanisme d'action.....	34
4.2. Les signes cliniques d'empoisonnement aux NOPs.....	37
4.3. Traitements et antidotes.....	40
4.4. Dosage des COPs.....	42
5. Les simulants.....	43
Chapitre 2 : La décontamination cutanée	46
1. Principale voie d'entrée des agents chimiques de guerre : la peau.....	46
1.1. Structure et composition de la peau.....	46
1.2. Fonctions de la peau.....	48
2. Les mécanismes d'absorption cutanée.....	49
2.1. Voies et cinétique d'absorption.....	49
2.2. Facteurs influençant la pénétration cutanée.....	51
3. Modèles d'études d'absorption existants.....	53
3.1. Modèles ex vivo/in vitro de pénétration cutanée.....	54
3.2. Modèles in vivo de pénétration cutanée.....	57

4. La décontamination de masse.....	58
4.1. Les intervenants.....	58
4.2. Gestion des victimes lors d'une attaque aux agents chimiques	59
5. La décontamination humide	61
5.2. La décontamination à base d'eau	61
5.2. La décontamination à base de RSDL	63
6. La décontamination sèche	65
7. Décontamination de peaux lésées et du cuir chevelu	67
7.1. Les peaux lésées.....	67
7.3. Le cuir chevelu	72
8. La décontamination des surfaces	73
Chapitre 3 : Développement d'un nouvel outil de décontamination	76
1. Utilisation des phyllosilicates pour la décontamination	76
1.1. Structure des phyllosilicates	76
1.2. Propriétés des phyllosilicates	81
1.3. Domaines d'utilisation des phyllosilicates.....	84
1.4. Des suspensions de Terre de Foulon pour la décontamination cutanée.....	85
2. Élaboration de méthode de décontamination innovante via l'utilisation de biomatériaux	88
2.1. Les besoins actuels en termes de décontamination : un cahier des charges	88
2.2. Les hydrogels comme modèle de biomatériaux pour la décontamination	91
2.3. Les méthodes de décontamination sous forme d'hydrogel	98
Présentation du projet de recherche.....	99
MATERIELS & METHODES	103
1. Matériels.....	104
2. Préparation des formulations décontaminantes	104
2.1 Formulations à base de TF.....	104
2.2 Formulations à base de TS.....	104
3. Propriétés rhéologiques des formulations.....	105
4. Procédure de sélection des formulations	105
4.1 Propriétés filmogènes des formulations	105
4.2 Temps de séchage à 32°C des formulations	105
4.3 Capacité de décontamination face au POX sur lames de verres.....	105
5. Caractérisation des formulations	106
5.1 Analyse MEB/EDX	106
5.2 Détermination de la surface spécifique et de la microporosité des poudres de phyllosilicates.....	106
6. Test mécaniques	106
6.1 Essai de résistance à la traction uni axiale.....	106
6.2 Test de décollement à 180° des films séchés sur des explants de peau de porc	107
6.3 Analyse histologique de l'intégrité de la peau	107
7. Stabilité des formulations.....	107
8. Cytotoxicité <i>in vitro</i> des formulations	107

8.1 Extraction et culture des NHDFs	107
8.2 Procédure du test presto blue	108
9. Évaluation <i>ex vivo</i> de la décontamination cutanée	108
9.1 Préparation des explants de peau	108
9.2 Procédure de décontamination	109
9.3 Traitement des échantillons	109
9.4 Quantification du POX par HPLC-UV	109
9.5 Évaluation de l'efficacité de décontamination <i>in vitro</i>	110
10. Évaluation des capacités de décontamination des formulations <i>in vivo</i> chez la souris SKH1	110
10.1 Animaux	110
10.2 Évaluation de la biocompatibilité des formulations et du RSDL	110
10.3 Détermination de la DL ₅₀ percutanée	111
10.4 Contamination et décontamination	112
11. Analyses statistiques	113
RESULTATS	115
Résultats 1 : Conception et caractérisation d'une nouvelle formulation filmogène à base de TF comme outil de décontamination face au POX	116
1. Introduction	116
2. Résultats	117
2.1 Développement et sélection des formulations filmogènes	117
2.2 Propriétés rhéologiques des formulations	120
2.3 Structure et composition des formulations	120
2.4 Essai de résistance à la traction et de pelage	123
2.5 Pouvoir séquestrant des formulations	125
2.6 Stabilité des formulations	126
3. Discussion	129
4. Évaluation critique	132
4.1 Hydrogel ou formulation ?	132
4.2 Effet peeling des formulations	133
4.3 Capacité de séquestration du POX	133
Résultats 2 : Comparaison de l'efficacité de décontamination <i>ex vivo</i> des formulations filmogènes de Terre de foulon et de Terre de Sommières face au POX sur des explants de peau d'origine porcine	134
1. Introduction	134
2. Résultats	135
2.1 Modification des formulations filmogènes : remplacement de la TF par la TS	135
2.2 Évaluation de la toxicité <i>in vitro</i> des formulations de TF et TS sur des NHDFs	135
2.3 Évaluation de la cinétique de pénétration du POX en présence de différentes méthodes de décontamination : comparaison des formulations filmogènes de TF et de TS	136
2.4 Quantification du POX dans les différentes méthodes de décontamination et dans la peau	138
2.5 Évaluation de l'efficacité de décontamination des formulations	139
2.6 Surface spécifique et microporosité de la TF et de la TS	139

3. Discussion	140
4. Évaluation critique	142
4.1 Impact de l'utilisation de peaux congelées sur l'absorption du POX ?.....	142
4.2 Importance sur la caractérisation des phyllosilicates	144
Résultats 3 : Évaluation du pouvoir décontaminant face au POX des formulations filmogènes <i>in vivo</i> chez des souris SKH1	145
2.1 Biocompatibilité des formulations.....	145
2.1.1 Suivi des signes cliniques cutanés suite à l'application des formulations	145
2.1.2 Suivi d'une potentielle réaction inflammatoire	146
2.2 Détermination de la DL ₅₀ percutanée du POX	147
2.4 Évaluation du pouvoir décontaminant des différentes méthodes de décontamination	147
2.5 Impact de la contamination au POX et de la méthode de décontamination sur le niveau d'AChE des souris	149
3. Discussion	150
4. Évaluation critique	152
4.1 Complément sur l'évaluation de la biocompatibilité des formulations :.....	152
4.2 Détermination de la DL ₅₀ percutanée :	153
4.3 Évaluation des capacités de décontamination des formulations :.....	153
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	155
1. Résumé des résultats obtenus	156
2. Amélioration des formulations filmogènes et application à d'autres agents chimiques de guerre ?	158
2.1 Ajout de molécules de dégradation et/ou de neutralisation des COPs.....	158
2.2 Evaluation d'autres phyllosilicates.....	159
2.3 Utilisations des formulations filmogènes pour la décontamination d'autres agents chimiques de guerre	160
3. Une alternative pour la décontamination des peaux lésées ?	160
4. La décontamination des surfaces.....	162
CONCLUSION GENERALE.....	165
ANNEXES.....	167
BIBLIOGRAPHIE	192

Abréviations

AChE	Acétylcholinestérase
ACh	Acétylcholine
Al	Aluminium
AIPEA	Nomenclature Committee of International Association for the Study of Clays
CEC	Capacité d'échange de cations
CEES	2-chloréthyl sulfide
CMC	Carboxyméthylcellulose
COP	Composés organophosphorés
COS	Commandant des opérations de secours
DDGel	Gel de décontamination dermique
DE	Efficacité de décontamination
DG	Decyl glucoside
DIMP	Diisopropyl méthylphosphanate
DL	Dose létale
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
EDX	Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie
FDA	Food and Drug Administration
FP	Facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel
GA	Tabun / cyanophosphoramidate d'éthyle
GB	Sarin / (RS)-propan-2-yl methylphosphono fluoridate
GD	Soman / Méthylfluorophosphonate de pinacolyle
GF	Cyclosarin
GV	2-diméthylaminoéthyl-diméthylamido-fluorophosphate
HD	Ypérite
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IL	Interleukines
KBDO	2,3-butanedione monoxime de potassium
LG	Lauryl glucoside
MeS	Salicylate de méthyle
Mg	Magnesium
MMT	Montmorillonite
NHDF	Fibroblastes humains normaux dermiques
NOP	Neurotoxiques organophosphorés
NRBCE	Nucléaires, radiologiques, biologiques, chimiques, explosifs

OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
OIAC	Organisation pour l'interdiction des armes chimiques
OP	Pesticides organophosphorés
P	Phosphore
PAAm	Poly(acrylamide)
PBS	Phosphate-buffered saline
PEO-PPO-PEO	Poly éthylène oxide – poly propylene oxide
PNT	4-nitrophenol
POX	Paraoxon-éthyle
PRV	Point de regroupement des victimes
PVA	Alcool polivinyle
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
SC	Stratum corneum
Si	Silicium
SM	Sulfur mustard / ypérite
TEWL	Perte en eau trans-épidermique / trans epidermic water loss
TF	Terre de Foulon
TS	Terre de Sommières
TNF	Facteur de nécrose tumorale
UV	Ultra-violet
V	Venimeux
VR	S-[2-(Diethylamino)ethyl] O-(2-methylpropyl) / methylphosphonothioate
VX	S-[2-(diisopropylamino)éthyl]méthyl/Phosphonothioate d'O-éthyle/venomous agent X
YM	Module de Young
ZE	Zone d'exclusion

Liste des illustrations

Figure 1- Formule chimique des agents suffocants	26
Figure 2 - Formule chimique des agents hémotoxiques	27
Figure 3 - Formule chimique des agents vésicants	28
Figure 4 - Structure des différents OPs utilisés dans le domaine de l'agriculture, industriel et sanitaire.	30
Figure 5 - Structure d'un neurotoxique organophosphoré.	31
Figure 6 - Formules chimiques des NOPs de la classe G.....	32
Figure 7 - Formules chimiques des NOPs de la classe V.....	34
Figure 8 - Mécanisme d'action des NOPs sur les synapses du système nerveux	36
Figure 9 - Mécanisme moléculaire de l'inhibition de l'AChE par un NOP et processus de réactivation et d'aging de l'AChE entraînant soit sa réactivation soit son inhibition de façon irréversible.	37
Figure 10 - Structure de la peau.....	48
Figure 11 - Les différentes voies d'absorption cutanées ainsi que la cinétique d'absorption lors d'une application topique.....	50
Figure 12 - Cellule de diffusion de Franz statique pour les études <i>ex vivo</i> de pénétration cutanée.	55
Figure 13 - Tenue de sécurité portée par les différents intervenants lors d'une attaque aux armes chimiques	59
Figure 14 - Schéma général d'une intervention face à une attaque terroriste par des agents chimiques.....	60
Figure 15 - Dispositif de lavage à l'eau sous forme de douche (Système Ladder Pipe).....	62
Figure 16 - Kit RSDL et son mode d'application sur la peau	63
Figure 17 - Réaction de substitution nucléophile entre le POX et les produits composant le RSDL.....	64
Figure 18 - Gant poudreux contenant de la TF pour la décontamination cutanée face aux agents chimiques de guerre.....	66
Figure 19 - Appareil de décontamination chimique de 2.5 L à recharge F1.....	73
Figure 20 - Système de décontamination DeconGel.....	74
Figure 21 - Différentes forme des argiles	77
Figure 22 - Structures des différents types de phyllosilicates – Types 1:1, 1:2 et 2:1 1	79
Figure 23 - Structures des différents types de phyllosilicates – Les argiles fibreuses	80
Figure 24 - Représentation d'un hydrogel et de son réseau tridimensionnel.....	92

Figure 25 - Structure chimiques des polymères à caractère filmogène – PVA, PVP, chitosan et l'hydroxypropylcellulose	95
Figure 26 - Représentation d'un tri-bloc de poloxamères et de la formation d'un hydrogel thermoréversibles par l'assemblage en micelle lors de l'augmentation de température	97
Figure 27 - Analyse de la structure et de la composition de la formulation par MEB couplée à un détecteur EDX.....	122
Figure 28– Résistance à la traction et tests de décollement des formulations.....	124
Figure 29- Coupes histologiques d'explants de peau d'origine porcine sans test de pelage (témoin) et après le test de pelage avec la formulation P12F15D3.	124
Figure 30- Micrographie et cartographie EDX des formulations contaminées..	126
Figure 31 – Évolution des propriétés de décontamination <i>in vitro</i> des formulations à différentes températures (4, 22 et 37°C) sur une période de 6 mois.....	127
Figure 32 – Évolution de la sédimentation de la TF au sein des formulations à différentes températures (4, 22 et 37°C sur une période de 6 mois	128
Figure 33 - Cytotoxicité <i>in vitro</i> de chaque formulation (avec et sans TF ou TS) sur les NHDFs après 30 minutes d'exposition au Presto Blue	136
Figure 34 - Évaluation <i>ex vivo</i> de la pénétration du POX à travers la peau de l'oreille de porc avec et sans méthode de décontamination.	137
Figure 35 - Quantification du POX dans la peau et dans les différentes méthodes de décontamination après 24 heures de diffusion à travers un explant de peau d'oreille de porc	138
Figure 36 - Coupes histologiques d'explants de peau d'origine porcine : à gauche, peau congelée ; à droite, peau fraîche	143
Figure 37 - Méthode d'application et de retrait des différentes méthodes de décontamination sur le dos des souris.	146
Figure 38 - Suivi de l'apparition des symptômes sur 24 heures en fonction de la dose de POX appliquée..	147
Figure 39 - Procédure de contamination et décontamination de chaque groupe de souris.	148
Figure 40 - Suivi de l'apparition des symptômes chez les souris non décontaminées (contrôle) et ceux décontaminées avec le RSDL et les deux formulations P12F15L3 et P20F9D3.....	149
Figure 41 - Dosage enzymatique de l'AChE dans le sérum des souris contaminés au POX et décontaminés avec le RSDL et les deux formulations P1215L3 et P20F9D3.....	150
Figure 42 - Effet de l'étalement du POX sur l'apparition des symptômes et durée de vie des souris SKH1 contaminée à la même dose (424.7 µg/kg).....	154
Figure 43 - Développement de modèles de peau lésées <i>ex vivo</i> sur des explants de peau d'origine porcine	162
Figure 44 – Système VitroPharma, cellule miniaturisée de Franz.	215

Figure 45 – Structure chimique des molécules utilisées au cours de ces travaux de thèse. .216

Listes des tableaux

Tableau 1 - Classification des agents chimiques de guerre par catégories et de leur période d'utilisation	29
Tableau 2 - Propriétés physico-chimiques des NOPs de la série G).....	33
Tableau 3 - DL50 percutanée des différents NOPs représentant la toxicité de celle-ci	34
Tableau 4 - Signes cliniques typiques d'un empoisonnement aux NOPs.....	39
Tableau 5 - Traitement anticholinergique par l'atropine	40
Tableau 6 - Traitement par le méthylsulfate de pralidoxime	41
Tableau 7 - Traitement des crises épileptiques par du diazépam	42
Tableau 8 - Les différents simulants du VX et leurs caractéristiques physico-chimiques.....	43
Tableau 9 - Quelques exemples de publications ayant utilisé le POX comme simulant du VX pour des études de pénétration cutanée <i>ex vivo</i> , <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	44
Tableau 10 - Les facteurs influençant l'absorption cutanée	51
Tableau 11 - Volatilité et DL50 des agents G et V chez des rats Wistar.....	53
Tableau 12 - Comparaison des épaisseurs des différentes couches cutanées entre une peau abdominale humaine et l'oreille de porc	56
Tableau 13 - Récapitulatif des toxines utilisées et le résultat pour chaque article impliquant la comparaison quantitative entre le RSDL et d'autres méthodes.....	65
Tableau 14 - Résumé des publications sur les différentes méthodes de décontamination des peaux lésées publiées jusqu'à ce jour	71
Tableau 15 - Efficacité des procédures de décontamination sur des cheveux..	72
Tableau 16 - Comparaison de la CEC, de la surface spécifique et du gonflement de différentes argiles (types 1:1, 2:1, 2:1:1 et les argiles fibreuses)	83
Tableau 17 - Evaluation de différentes suspensions de TF comme méthode de décontamination sur des explants de peau d'origine humaine et porcine avec 2 simulants du VX : le POX et le 4-cyanophenol.	87
Tableau 18 - Catégories et domaines d'applications des différents biomatériaux ainsi que leur avantages et limitations dans leur utilisation	90
Tableau 19 - Quelques exemples d'hydrogels composés de polymères filmogènes supplémentée ou non de principes actifs et de leurs applications	96
Tableau 20 - Quelques exemples de poloxamères (P407 et P188) et de leurs propriétés de gélification et utilisation dans le domaine biomédical.....	98
Tableau 21 – Liste des symptômes et des scores correspondants pour le suivi clinique au niveau cutanée	111

Tableau 22 - DL ₅₀ sous cutanée et percutanée du VX et du POX au sein de l'IRBA.....	112
Tableau 23 – Liste des symptômes correspondant à une crise cholinergique et du score correspond pour le suivi de la contamination des souris au POX	112
Tableau 24 - Développement et sélection des formulations en fonction de leurs propriétés filmogènes, du temps de séchage (à 32°C) et de leurs capacités de décontamination contre le POX sur des lames de verre.	119
Tableau 25 – Évaluation des propriétés rhéologiques des formulations par la détermination des modules d'élasticité G' et de viscosité G'' à température ambiante.....	120
Tableau 26 - Développement des formulations filmogènes de TS (en remplacement de la TF) et évaluation de leurs propriétés filmogènes.....	135
Tableau 27- Efficacité de décontamination <i>in vitro</i> (DE) pour chaque méthode de décontamination comparée au POX sans décontamination	139
Tableau 28 - Surface spécifique et volume de micropores de différents phyllosilicates : TS et TF.	140
Tableau 29 - Suivi sur 72h des signes cliniques cutanée après application et retrait des différentes méthodes de décontamination.....	146
Tableau 30 - Les différents phyllosilicates pouvant être utilisés comme substitution ou complément à la TF dans les formulations filmogènes.....	159

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les agents chimiques de guerre

II. La décontamination cutanée

III. Développement d'un nouvel outil de décontamination à base de phyllosilicates

IV. Présentation du projet de recherche

Chapitre 1 : Les agents chimiques de guerre

1. Historique

Les agents chimiques de guerre représentent un danger d'une ampleur considérable, tant pour les forces militaires que pour les populations civiles. Leur utilisation en tant qu'armes et dans des actes terroristes est documentée depuis l'époque de la Grèce antique et romaine, mais limitée en raison des connaissances scientifiques à cette période¹. L'idée de développer de tels agents chimiques remonte même à la préhistoire, lorsque les humains utilisaient des fléchettes empoisonnées pour la chasse, ou recouraient à des substances toxiques pour empoisonner l'eau, ou encore pour effectuer des fumigations dans le but de repousser les animaux. Au fil du temps, ces substances toxiques ont été employées pour affronter les humains dans des contextes de combats. Au Moyen-Âge, de nouvelles technologies et méthodes de transfert de ces substances toxiques ont été mises au point².

La Première Guerre Mondiale a marqué un tournant décisif dans l'utilisation des produits chimiques en tant qu'armes de destruction massive, avec leur première utilisation par les militaires allemands le 22 avril 1915 à Ypres, en Belgique³. Parmi ceux produits durant cette Première Guerre Mondiale, le phosgène et le diphosgène (agents suffocants) ont provoqué à eux seuls 80 % des décès dus aux agents chimiques. Il est donc estimé que 4 % des décès au combat pendant la Première Guerre Mondiale sont dus aux armes chimiques de guerre. Ces événements ont conduit à un développement constant d'agents chimiques de plus en plus toxiques et efficaces. Les principales puissances impliquées dans les conflits, à savoir l'Allemagne, la France, la Grande-Bretagne, la Russie et les États-Unis, ont produit conjointement plus de 200 000 tonnes d'agents chimiques, dont une grande quantité a finalement été utilisée dans des contextes liés au terrorisme⁴.

Après la Première Guerre Mondiale, la population civile a catégoriquement rejeté l'utilisation des armes chimiques en les considérant comme inhumaines. Néanmoins, dans l'entre-deux-guerres, le développement des armes chimiques a atteint son apogée à la fin des années 1930. Des groupes de recherche allemands ont amorcé le développement de nouveaux composés de type organophosphoré, responsables de crises cholinergiques par leur pouvoir d'inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE). C'est ainsi qu'ont émergé les agents neurotoxiques de deuxième génération, tels que le tabun et le sarin.

Au cours de la Seconde Guerre Mondiale, une quantité considérable de plus de 400 000 tonnes d'agents chimiques a été stockée, parmi lesquels les agents vésicants tels que l'ypérite et la lewisite représentaient les 2/3 des stocks⁵. Malgré cette accumulation importante

d'armes chimiques, un conflit impliquant leur utilisation à grande échelle n'a pas eu lieu⁶. Cependant, il est à noter que les forces japonaises ont fait usage des armes chimiques en Chine.

Après la Seconde Guerre Mondiale, le domaine des armes chimiques a connu des avancées technologiques significatives, parallèle du développement nucléaire. Ces changements qualitatifs ont été marqués par l'introduction et la fabrication en masse d'agents neurotoxiques de classe G, tels que le sarin et le soman, ainsi que l'ajout d'agents de la classe V, dont le VX, qui se sont avérés encore plus efficaces que ceux de la deuxième génération⁷. A partir des années 1950 et 60, une nouvelle tendance est apparue avec l'utilisation d'agents dits « non létaux » englobant des substances psychoactives tels que les glycolates hallucinogènes. Pendant la guerre froide, les États-Unis ont développé des agents chimiques, comprenant les agents binaires, tandis que l'Union soviétique a réagi en créant des armes chimiques de quatrième génération, telles que le Novitchok. Un exemple frappant de l'utilisation mortelle d'armes chimiques s'est produit en Irak, où une accumulation de plus de 3 800 tonnes d'agents a été utilisée pendant la guerre contre l'Irak et la population kurde locale en 1988, entraînant la mort de milliers de victimes⁸.

Une convention visant à interdire la mise au point, la fabrication, le stockage et l'emploi des armes chimiques, ainsi que leur destruction, a été soumise pour la première fois pour signature le 13 janvier 1993 à Paris par l'Organisation pour l'Interdiction des Armes Chimiques (OIAC). Après des négociations complexes, la convention est entrée en vigueur le 29 avril 1997 avec la participation de 193 pays signataires. Cependant, certains pays n'ont pas adhéré à la convention, parmi lesquels on trouve l'Égypte, le Soudan du sud, et la République démocratique populaire de la Corée. Les pays signataires de la convention s'engagent, conformément à l'article 1, à renoncer à toute mise au point, fabrication, acquisition ou accumulation d'armes chimiques, quelles que soient les circonstances. De plus, toutes les armes chimiques développées jusqu'à ce moment, ainsi que les installations de fabrication associées, doivent être détruites sous contrôle dans les dix ans suivant l'entrée en vigueur de la convention.

Des événements plus récents, tels que les attaques terroristes perpétrées par la secte religieuse Aum Shinrikyo à Matsumoto en 1994 et à Tokyo en 1995, mettent en évidence la menace croissante de la prolifération des armes de destruction massive à des fins terroristes. En 1994, lors de l'attaque à Matsumoto, des agents neurotoxiques de type Sarin ont été pulvérisés à partir d'un véhicule, entraînant la mort de 7 personnes et blessant 300 autres⁹. L'année suivante, lors de l'attaque à Tokyo, 12 personnes ont été tuées et des milliers d'autres ont été blessées après que du Sarin ait été répandu dans les rames du métro japonais.

L'existence des armes chimiques n'est généralement pas liée à une époque historique spécifique, mais plutôt conditionnée par les niveaux de la science et des technologies disponibles. Des progrès importants ont été réalisés dans le domaine des contre-mesures défensives au cours de cette période, comme les détecteurs manuels et automatiques (pour l'alerte et le suivi de la contamination), les vêtements de protection et les respirateurs, les méthodes de décontamination et les contre-mesures médicales, en particulier contre les agents neurotoxiques.

2. Les agents létaux

2.1. Les suffocants

Le phosgène, le diphosgène, le dichlore ainsi que la chloropicrine sont des exemples d'agents suffocants, qui sont dispersés sous forme de gaz pour faciliter leur pénétration dans les voies respiratoires (**Figure 1**). Ces agents peuvent provoquer la mort de l'individu par asphyxie, principalement en raison d'une réaction d'acylation avec certains éléments tissulaires des poumons, entraînant une augmentation de la perméabilité des muqueuses alvéolaires qui peut induire des œdèmes pulmonaires et des lésions tout au long du tractus respiratoire. Même à des niveaux toxiques, le phosgène a généralement un effet mortel seulement après un délai considérable pouvant atteindre jusqu'à 24 heures. Cette caractéristique peut rendre la détection et le traitement des victimes plus complexes.

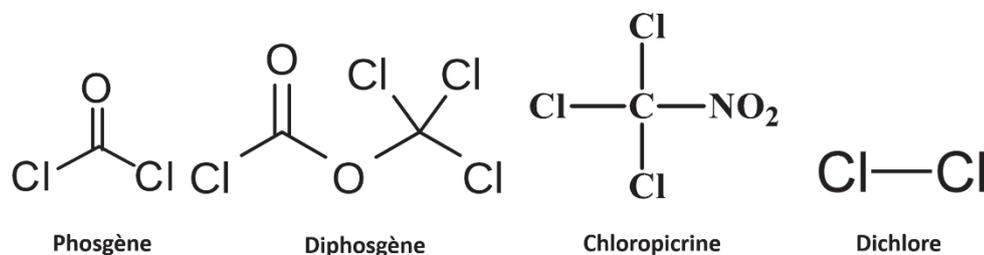


Figure 1- Formule chimique des agents suffocants – phosgène, diphosgène, chloropicrine et dichlore.

2.2. Les hémotoxiques

Le cyanure d'hydrogène et le chlorure de cyanogène sont des exemples d'agents hémotoxiques, responsables d'intoxications respiratoires (**Figure 2**). Ces composés entraînent la mort par asphyxie en raison de leur résorption dans la circulation sanguine et les tissus. Une fois qu'ils pénètrent dans l'organisme, ils réagissent avec le fer trivalent de la cytochrome oxydase pour former un complexe, entravant ainsi l'utilisation de l'oxygène dans les tissus¹⁰.

Ils sont également connus sous le nom d'agents systémiques, car ils inhibent certaines enzymes spécifiques. Les symptômes résultant d'une faible exposition au cyanure d'hydrogène incluent la faiblesse, les vertiges, les maux de tête, la confusion et, parfois, les nausées et les vomissements. Les signes cliniques n'apparaissent qu'à des niveaux d'exposition élevés et comprennent une respiration rapide et douloureuse, une coordination des mouvements altérée, des irrégularités cardiaques, des convulsions hypoxiques, le coma et une insuffisance respiratoire, aboutissant finalement au décès.



Figure 2 - Formule chimique des agents hémotoxiques – Cyanure d'hydrogène et du chlorure de cyanogène

La très grande volatilité des agents hémotoxiques, tels que le cyanure d'hydrogène et le chlorure de cyanogène, réduit leur utilité en tant qu'agents de guerre conventionnels. Cependant, cette même volatilité les rend potentiellement plus dangereux lorsqu'ils sont utilisés comme armes terroristes dans des espaces clos ou semi-clos.

2.3. Les vésicants

Les principaux agents vésicants incluent le gaz moutarde, également connu sous le nom d'ypérite, ainsi que la lewisite (Figure 3). Ces agents vésicants provoquent des lésions cutanées sous forme d'ampoules (vésicules) ainsi que des lésions sévères au niveau des muqueuses, tels que les yeux et les voies respiratoires. L'ypérite est peu volatil, se présente sous forme d'un liquide incolore et dégage une odeur similaire à celle de la moutarde. Néanmoins, la faible stabilité du lewisite ainsi que celle du gaz moutarde à l'azote limite leur utilisation en tant qu'agents chimiques de guerre, car ils ne répondent pas aux exigences requises.

En raison de leur haute persistance, les érythèmes et œdèmes cutanés résultant d'une contamination à l'ypérite peuvent apparaître plusieurs heures après le contact avec la peau, généralement dans un délai de 4 à 6 heures, et sont souvent suivis de la formation de cloques sous-épidermiques¹¹. Les lésions oculaires causées par ces agents vésicants peuvent varier de la conjonctivite à l'opacification, l'ulcération et même la rupture de la cornée.

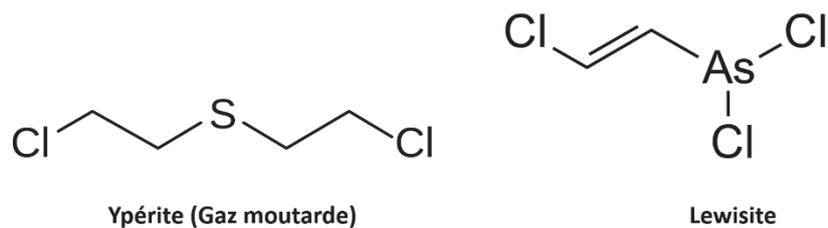


Figure 3 - Formule chimique des agents vésicants – Ypérite (aussi appelé HD) et du Lewisite

Le mécanisme moléculaire sous-jacent des agents alkylants tels que le gaz moutarde, fait actuellement l'objet de recherches intensives. Les données accumulées jusqu'à présent indiquent qu'ils provoquent des altérations des fonctions cellulaires, en particulier au niveau des cellules épidermiques, par le biais de réactions d'alkylation. Ces réactions entraînent majoritairement l'apoptose de ces cellules en bloquant les processus de réplication, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en raison d'un appauvrissement en NAD⁺ et en ATP. La mort par apoptose est influencée à la fois par le récepteur extrinsèque de mort FAS et intrinsèque par la voie mitochondriale. De plus, une contamination à l'ypérite peut entraîner chez l'individu une augmentation de certains médiateurs de l'inflammation, notamment des interleukines (IL) 1-6-8, ainsi que le facteur de nécrose tumorale (TNF)¹².

2.4. Les agents neurotoxiques organophosphorés

Les agents neurotoxiques organophosphorés peuvent être classés en 4 catégories distinctes¹³, appartenant tous à la famille des composés organophosphorés (COP) :

1. Les composés de la série G (pour German), développés en Allemagne et qui comprennent le tabun (GA), le sarin (GB), le soman (GD) et le cyclosarin (GF).
2. Les agents de la série V (pour venimeux), synthétisés après la Seconde Guerre Mondiale, incluant le VE, VG (amiton), VM, la substance-33 ou VR (VX russe) et le VX¹⁴.
3. Les agents de la série VG, qui possèdent les propriétés des deux catégories V et G combinées, avec comme tête de file le GV ou EA-5365 (2-diméthylaminoéthyl-diméthylamido-fluorophosphate).
4. Les agents de la série Novitchok, dont le A230, A232 et d'autres développés par l'Union soviétique à partir des années 1970¹⁵.

A température ambiante, ces composés se présentent sous forme liquide, sont plus ou moins volatils et persistants, présentant ainsi des risques en cas de contact avec la peau et/ou par inhalation. Les agents de type Novitchok présentés pour certains comme étant plus

toxiques que les agents V, eux-mêmes plus puissants que les agents G en raison de leur persistance accrue dans l'environnement et l'organisme et leur vitesse de réaction élevée avec l'AChE (**Tableau 1**).

Ces composés organophosphorés peuvent interagir et inhiber l'AChE, une enzyme impliquée dans la régulation de l'acétylcholine (ACh) provoquant une crise cholinergique. Les détails sur les mécanismes d'action et les effets des agents neurotoxiques seront abordés dans le paragraphe 4.

Agents chimiques		Effets biologiques	Exemples	Fabrication
Vésicants		Inflammation cutanée, cloques et destruction totale des tissus	Ypérite Lewisite	Première Guerre Mondiale - 1930
Hémotoxiques		Fonction corporelle → inactivation cytochrome (système oxydase)	Cyanure d'hydrogène Chlorure d'hydrogène	Première Guerre Mondiale
Suffocants		Tissu pulmonaire → œdèmes pulmonaire	Phosgène, diphosgène, chloropicrine	Première Guerre Mondiale
Neurotoxiques	Série V	Perturbation du système nerveux → Inhibition de l'AChE	VX VE VG VM	1950 - 1960
	Série G		GA GB GD	Seconde Guerre Mondiale
	Binaire		GB-2 VX-2	1970 - 1980
	Novitchok		A-230 A-232 A-234	1980 - 1990

Tableau 1 - Classification des agents chimiques de guerre par catégories et de leur période d'utilisation (adaptée de Pitschamann *et al.*, 2014¹⁶)

3. Les composés organophosphorés (COP)

3.1. Utilisation en tant que pesticides par la population civile (OP)

Les pesticides organophosphorés (OPs) constituent une famille étendue et variée de composés organophosphorés qui ont apporté de nombreux avantages dans les domaines de l'agriculture, de l'industrie et de la santé publique sanitaire. Cependant, leur toxicité tant chez les humains que chez les animaux a toujours été une préoccupation majeure¹⁷. Ces produits chimiques sont utilisés depuis le début du XX^{ème} siècle, et parmi les plus fréquemment utilisés figurent le parathion-éthyl, le quinalphos, le chlorpyrifos ou encore le diazinon (**Figure 4**). Malgré l'existence d'une législation spécifique qui régule leur utilisation, la fréquence de leur emploi en tant qu'insecticides, herbicides et fongicides pose actuellement problème. En outre, ils sont largement utilisés dans l'agriculture pour protéger les cultures des ravageurs et des maladies, mais ils peuvent également être utilisés dans des contextes non agricoles tels que le contrôle des parasites dans les bâtiments, les jardins et les espaces publics¹⁸.

L'auto-intoxication par les pesticides organophosphorés est un problème clinique important dans les régions rurales et tue environ 200 000 personnes chaque année¹⁹. L'empoisonnement involontaire tue beaucoup moins de personnes, mais constitue un problème dans des endroits où des OPs hautement toxiques sont disponibles.

D'autre part, des preuves épidémiologiques et expérimentales du lien entre l'exposition aux pesticides et l'incidence des maladies humaines ont été publiées²⁰. Des expositions chroniques à de faibles doses peuvent provoquer des problèmes de santé, tels que le cancer, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, l'asthme, la bronchite, l'infertilité, des malformations congénitales, le trouble déficitaire de l'attention avec hyperactivité, l'autisme, le diabète et l'obésité.

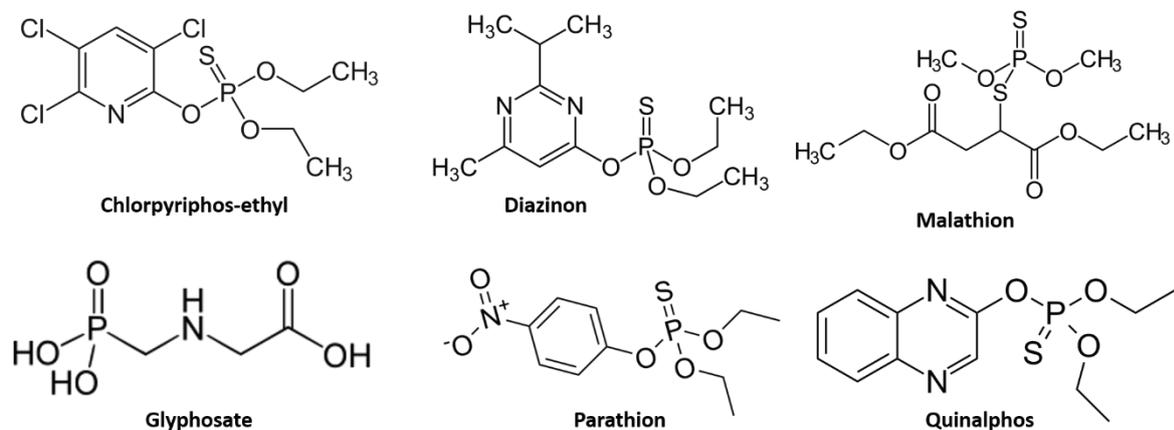


Figure 4 - Structure des différents OPs utilisés dans le domaine de l'agriculture, industriel et sanitaire.

Face à ces préoccupations, de nombreuses réglementations ont été mises en place dans un grand nombre de pays pour contrôler l'utilisation des pesticides organophosphorés, notamment en ce qui concerne les doses autorisées, les méthodes d'application et les périodes de réentrée après traitement. Certaines formulations de pesticides organophosphorés ont également été interdites en raison de leur haut niveau de toxicité.

3.2. Utilisation en tant qu'agent neurotoxiques (NOP)

Les agents neurotoxiques organophosphorés (NOP) employés en tant qu'armes chimiques de guerre sont dérivés d'esters de l'acide phosphonique (**Figure 5**). Tel exposé dans la section 2.4, ces NOPs agissent en qualité d'inhibiteurs soit directs soit indirects des cholinestérases, selon qu'ils aient subi ou non une transformation métabolique préalable²¹.

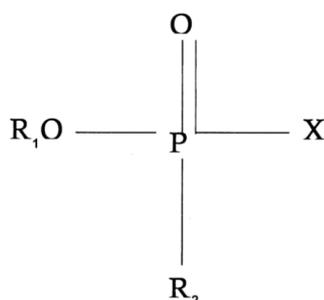


Figure 5 - Structure d'un neurotoxique organophosphoré – R1 = Groupements alkyl, alkoxy, S-alkyl ou -amine, R2 = Groupement alkyl ou -amine, X= CN, F, O-aryl, S-R.

Les propriétés physico-chimiques des agents les plus fréquemment utilisés sont résumées dans le **tableau 2**. Les NOPs font partis intégrants des agents létaux, qui sont classifiés en deux catégories distinctes. Les composés du groupe G sont des dérivés d'esters de l'acide cyano- ou fluorophosphonique, dont la toxicité extrême est conditionnée par la nature du groupement X, mais qui, dans la plupart des cas, ne persistent pas²²⁻²³. Leur dégradation se produit en l'espace de quelques heures, avec une faible volatilité. Ces agents sont absorbés par voie respiratoire (inhalation) ou par pénétration cutanée, entraînant la mort

en l'espace de 20 minutes pour le tabun, 10 à 15 minutes pour le soman, et en 1 minute pour le sarin (en raison de sa forte volatilité) (**Figure 6**).

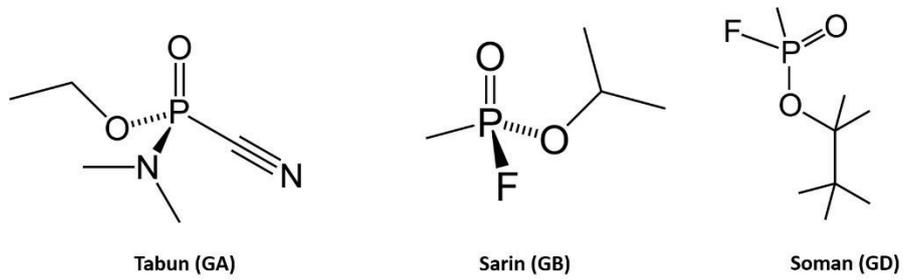


Figure 6 - Formules chimiques des NOPs de la classe G - Le tabun (GA), le sarin (GB) et le soman (GD).

Nom chimique	Tabun	Sarin	Soman	VX	VR ²⁴
	N-diméthylamino cyanophosphite d'éthyle	(RS)-propan-2-yl methylphosphono fluoauride	Méthylfluoro phosphonate de pinacolyle	S-[2-(diisopropylamino)éthyl]methyl phosphonothioate d'éthyle	S-[2-(Diéthylamino)éthyl] O-(2-méthylpropyl) methylphosphonothioate
Masse moléculaire (g/mol)	162,1	140,1	182,2	267,37	267,36
Densité liquide à 20°C (g/ml)	1,073	1,102	1,022	1,008	≈ VX
Solubilité dans l'eau à 25°C (g/L)	98	Miscible	21	30	≈ VX
Tension de vapeur (mmHg à 25°C)	0,07	2,10	0,40	0,0007	≈ VX
Volatilité (mg/m ³ à 25°C)	610	22000	3900	10,5	≈ VX
Persistance	24-36 heures	2-24 heure à 5-25°C	Relativement persistant	2-6 jours	≈ VX
Log P	0,38	0,3	1,78	2,09	≈ 2,15

Tableau 2 - Propriétés physico-chimiques des NOPs de la série G (tabun, sarin et soman) et de la série V (VX et VR)

Les agents de la série V, comme le VX, se distinguent des agents de la série G par la présence d'un atome de soufre (**Figure 7**). Cette particularité structurale leur confère une toxicité encore plus élevée que les agents de la série G (**Tableau 2**), et leur persistance est attribuable à leur faible volatilité. La contamination a généralement lieu par voie cutanée.

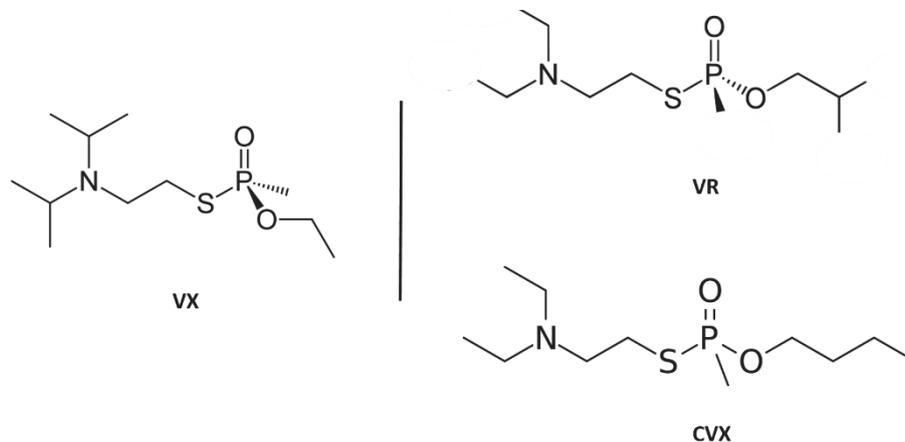


Figure 7 - Formules chimiques des NOPs de la classe V - VX, VR (l'agent russe) et le CVX (l'agent chinois).

La détermination de la dose létale médiane (DL_{50}) chez l'humain par voie percutanée permet de mettre en évidence la toxicité des NOPs. Il est à noter que le VX se distingue comme l'agent présentant la plus haute toxicité lors d'une exposition cutanée par rapport aux agents de la série G (**Tableau 3**).

	Tabun	Sarin	Soman	VX
DL_{50} percutanée (mg/kg)	21	24	5	0,071
(Sous forme liquide)				

Tableau 3 - DL_{50} percutanée des différents NOPs représentant la toxicité de celle-ci (Adaptée de Moyer *et al.*, 2005²⁵)

4. Mode d'action des NOPs

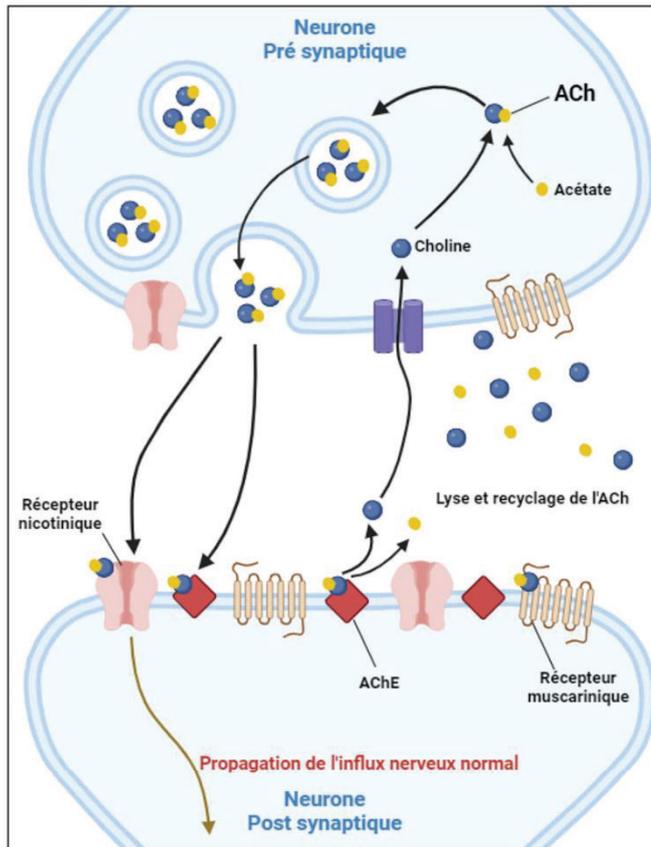
4.1. Physiologie et mécanisme d'action

Le système nerveux se compose d'un agencement de neurones en réseau, interconnectés par le biais de jonctions spécialisées appelées synapses. Le signal transmis à travers une synapse peut être de nature électrique ou chimique grâce à l'action de neurotransmetteurs. La réception de l'information au niveau de la cellule post-synaptique entraîne l'activation ou l'inhibition de récepteurs et/ou de canaux ioniques présents dans la membrane, engendrant ainsi la propagation de l'influx nerveux.

La toxicologie des composés organophosphorés a été étudiée de manière approfondie au cours des dernières décennies par diverses équipes de recherche, aboutissant à la détermination des mécanismes d'action de ces agents chez l'humain²⁶. Les NOPs sont connus pour cibler spécifiquement l'AChE, entraînant une perturbation de la transmission nerveuse cholinergique par le biais de son inhibition¹⁸. En l'absence de NOP, la dégradation de l'ACh par l'AChE s'effectue de manière extrêmement rapide, avec environ 10^4 molécules d'ACh hydrolysées par seconde par une seule molécule d'AChE²⁷. Une fois introduits dans l'organisme, les NOPs se lient de manière covalente à l'AChE, la rendant inactive. Cette inhibition induit par conséquent l'incapacité de l'AChE à dégrader les neurotransmetteurs tels que l'ACh (altération de son hydrolyse), ce qui provoque une accumulation croissante d'ACh au niveau de la fente synaptique. Les récepteurs post-synaptiques tels que les récepteurs nicotiques et muscariniques sont ainsi exposés à une stimulation excessive, amplifiant la transmission nerveuse (**Figure 8**)²⁸. L'effet de cette inhibition de l'AChE englobe plusieurs systèmes, incluant le système nerveux central, le système nerveux végétatif ainsi que les jonctions neuromusculaires, et peut déclencher une variété étendue de manifestations cliniques.

Il est important de préciser que les NOPs exercent leur action conformément à la description précédente sur le système nerveux central ou périphérique, sans interférer avec le système nerveux cutané local. Nous pouvons considérer que la peau est un moyen par lequel les NOPs pénètrent.

A) Fonctionnement normal de l'AChE



B) Perturbation du fonctionnement de l'AChE par les NOPs

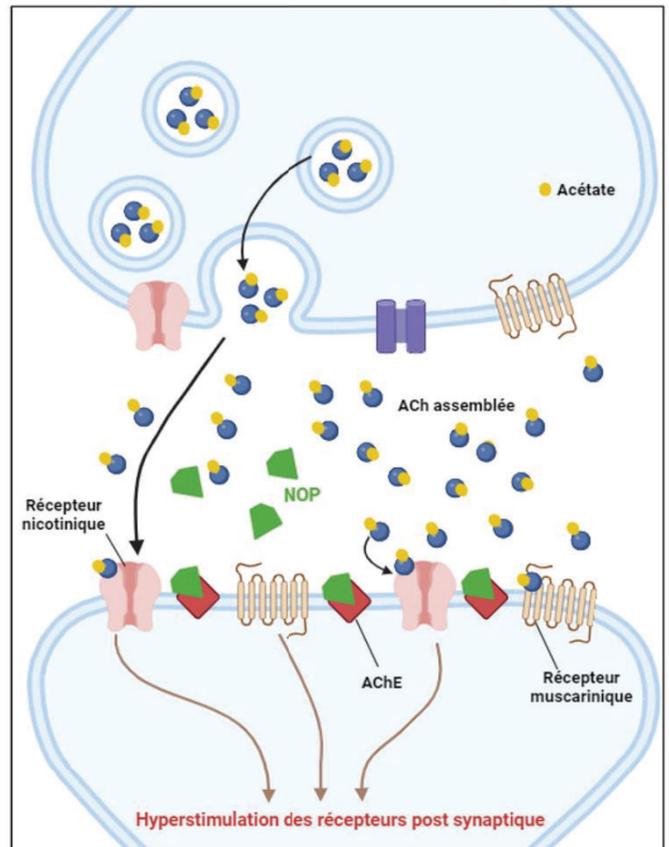


Figure 8 - Mécanisme d'action des NOPs sur les synapses du système nerveux – A) Système physiologique avec lyse et recyclage de l'ACh par les AChEs permettant un fonctionnement normal des synapses nerveuses, B) En présence d'un NOP, entraînent l'inhibition de l'AChE et donc une accumulation de l'ACh au niveau des fentes synaptiques induisant une hyperstimulation des récepteurs post-synaptiques (adaptée de Henretig *et al.*, 2019).

Au niveau moléculaire, les NOPs exercent leur inhibition sur les AChEs par le biais d'une liaison covalente formée entre le groupe phosphate du NOP et le site actif renfermant la sérine (OH) de l'AChE. Cette interaction entraîne une phosphorylation de l'AChE par un mécanisme de substitution nucléophile. Une fois inhibée, l'enzyme peut subir soit une hydrolyse spontanée conduisant à sa réactivation, soit une déalkylation partielle de la sérine (de l'AChE), ce qui établit une liaison irréversible avec le NOP. Dans ce dernier cas, seule la synthèse de nouvelles cholinestérases permet de rétablir la dégradation de l'ACh. Ce phénomène est désigné sous le terme de « vieillissement » ou encore « aging » (**Figure 9**)²⁹. La cinétique de ce processus de vieillissement dépend, entre autres, de la nature du NOP, variant de quelques minutes pour le soman (2 min), à une vitesse légèrement plus lente pour le sarin (3 h), pouvant atteindre jusqu'à 40 heures pour le VX²⁹.

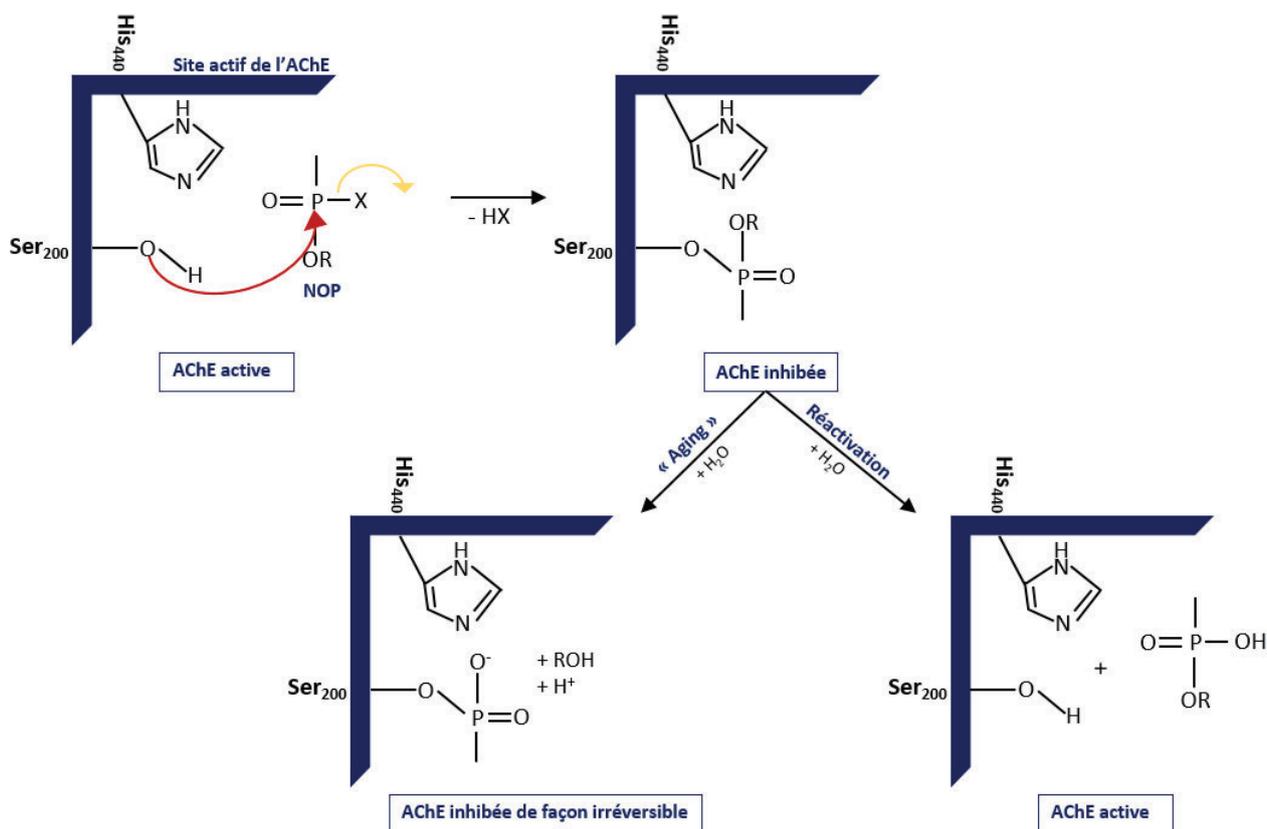


Figure 9 - Mécanisme moléculaire de l'inhibition de l'AChE par un NOP et processus de réactivation et d'aging de l'AChE entraînant soit sa réactivation soit son inhibition de façon irréversible.

Outre l'AChE, qui est la cible principale des NOPs et des OPs, d'autres sérine-estérases telles que la butyrylcholinestérase et la carboxylestérase présentes dans le plasma, les cellules gliales et le foie, peuvent également être soumises à l'inhibition. Alors que seule l'inhibition de l'AChE entraîne des effets toxiques aigus, ces deux enzymes peuvent jouer le rôle de bioscavengers endogènes en se liant à une quantité limitée de NOP incorporés, permettant ainsi la détoxification³⁵⁻³⁶.

4.2. Les signes cliniques d'empoisonnement aux NOPs

Les manifestations d'intoxication par les NOPs se divisent en symptômes nicotiques, localisés au niveau des terminaisons pré-ganglionnaires et des jonctions neuromusculaires, et en symptômes muscariniques, se situant au niveau des terminaisons post-ganglionnaires, des glandes salivaires, lacrymales et au niveau des nerfs crâniens. L'hyperstimulation des récepteurs muscariniques et nicotiques entraîne généralement une excitation du système nerveux central, du système nerveux sympathique, du système nerveux parasympathique ainsi que des muscles moteurs²⁸.

L'apparition, la séquence et la gravité de ces signes cliniques dépendent de la toxicité intrinsèque, de la dose des NOPs, ainsi que de la voie d'administration ou d'exposition³². Les signes et les symptômes énumérés dans le tableau **Tableau 4** peuvent se manifester quelques minutes après une exposition aux vapeurs de NOP par inhalation, et jusqu'à quelques heures après une exposition cutanée aux liquides³³. Les signes cliniques évoluent selon trois phases successives : tout d'abord, une crise cholinergique est observée, suivie d'un syndrome intermédiaire, puis ultérieurement d'une polyneuropathie³⁴.

La crise cholinergique implique les récepteurs nicotiniques et muscariniques, ou l'ACh agit en tant que neuromédiateur excitateur. Les symptômes résultant de l'hyperstimulation muscarinique se traduisent par une bradycardie (rythme cardiaque ralenti), une hypotension artérielle (tension artérielle basse), une bronchoconstriction intense (contraction des bronches), un myosis (rétrécissement de la pupille), une hypersialorrhée (sécrétion excessive de salive) accompagnée d'une surproduction de sécrétions des glandes salivaires et sudorales. En parallèle, le syndrome nicotinique se manifeste généralement plus tardivement, ce qui témoigne d'une intoxication sévère²². Ce stade peut engendrer des fasciculations, des crampes et une paralysie musculaire lorsque la dépolarisation de la jonction neuromusculaire persiste. D'autre part, une atteinte du système nerveux central peut provoquer des troubles de la conscience, des convulsions, des perturbations de la thermorégulation ainsi qu'une immunodépression³⁵⁻³⁶.

Le syndrome intermédiaire se manifeste généralement entre 1 et 4 jours après l'intoxication aux NOPs et survient après la crise cholinergique, avec une possible récupération complète dans un délai de 4 à 18 jours si une assistance ventilatoire est fournie³⁶. Durant cette période, les risques de faiblesse respiratoire augmentent progressivement, avec un taux de mortalité pouvant atteindre jusqu'à 60 %³⁷. La sévérité de l'atteinte causée par les NOPs est en grande partie attribuée à l'inhibition de l'AChE, par l'hyperstimulation des récepteurs nicotiniques³⁶.

La phase ultime, la polyneuropathie, se caractérise par une atteinte sensitivo-motrice distale, se manifestant une à trois semaines après l'intoxication par les NOPs. Elle est caractérisée, entre autres, par des crampes musculaires au niveau des membres inférieurs et par des troubles sensitifs. La phosphorylation de la « neuropathy target esterase » (NTE) au niveau des tissus nerveux est considérée comme responsable de la polyneuropathie. En raison de son activité catalytique estérasique, une modification structurale de cette protéine peut induire une polyneuropathie irréversible, suivant un mécanisme de vieillissement similaire à celui des AChEs. Néanmoins, le mécanisme physiopathologique sous-jacent demeure encore incertain à ce jour³⁴⁻³⁸.

Empoisonnement aux NOP		Signes et symptômes	
Léger (Activité AChE = 21-50 %)	Modéré (Activité AChE = 11-20 %)	Sévère (Activité AChE < 10 %)	Myosis/larmolement
			Fasciculations locales
			Hyper-salivation/transpiration
			Nausées
			Vomissement/défécation/éjection
			Bronchoconstriction/bronchorrhée
			Bradycardie
			Insuffisance respiratoire
			Arythmie/dépression circulatoire
			Convulsions
Coma/arrêt respiratoire/mort			

Tableau 4 - Signes cliniques typiques d'un empoisonnement aux NOPs (adaptée de Worek *et al.*, 2016³⁹)

4.3. Traitements et antidotes

A la suite d'une exposition aux NOPs, il revêt d'une importance primordiale d'initier le processus de décontamination dans le but d'éviter de prévenir une importante pénétration cutanée de l'agent en question et de garantir la protection des personnels médicaux. Les procédures de décontamination englobent en premier lieu le déshabillage des victimes, suivi de l'application des méthodes de décontamination visant la neutralisation et l'élimination de l'agent contaminant. Celui-ci fait l'objet d'une étude approfondie dans la section du Chapitre 2 consacrée à la décontamination cutanée.

Pour atténuer les symptômes de nature muscarinique, l'emploi de l'atropine se révèle fortement préconisé. Fonctionnant en tant qu'antagoniste compétitif des récepteurs muscariniques, ce composé restreint l'effet de l'ACh accumulée au niveau des fentes synaptiques, ciblant ainsi les récepteurs muscariniques⁴⁰. Par son action, il permet une diminution de divers symptômes tels que les sécrétions bronchiques et salivaires, la bronchoconstriction et la bradycardie. L'usage de l'atropine est généralement reconnu comme indispensable, toutefois, une controverse subsiste quant à la posologie à adopter, compte tenu de la capacité des NOPs à induire une tolérance vis-à-vis l'atropine. Par exemple, dans le cas de bronchorrhée, l'administration intraveineuse de l'atropine est préconisée (2 mg chez l'adulte ; 20 µg/kg chez l'enfant) avec une fréquence toutes les 5 à 10 minutes jusqu'à la diminution des sécrétions⁴¹. Pour les cas sévères, des doses très importantes d'atropine peuvent être administrées (**Tableau 5**).

Populations	Doses de charge	Doses d'entretien*	Durée prévisible du traitement
Adultes	2 mg 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).	1,5 à 6 mg/h	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).
Enfants	0,05 à 0,1 mg/kg , 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).	0,05 mg/kg.h	

(*) 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 5 - Traitement anticholinergique par l'atropine (d'après la fiche Piratox N°4 : Organophosphorés-neurotoxiques de guerre et pesticides de l'AFSSAPS)

Par ailleurs, la réactivation des AChEs est assurée par l'utilisation de la Pralidoxime, un antidote spécifique des NOPs. Ces oximes sont capables de corriger les syndromes d'ordre muscarinique et nicotinique en initiant une liaison préalable avec le site anionique de l'AChE,

suivie d'une interaction secondaire avec l'agent toxique. Cette séquence permet la libération de l'enzyme précédemment inactivée. Cette capacité de régénération par les oximes peut demeurer efficace même lorsqu'elle est employée tardivement, ce qui s'avère crucial pour contrecarrer le phénomène de vieillissement⁴². L'efficacité de la Pralidoxime varie selon le type d'agent impliqué, notamment lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec l'atropine. En situation d'urgence, l'administration par voie intraveineuse est recommandée. La quantité de Pralidoxime à administrer dépend de la sévérité des symptômes (mineurs, modérés ou sévères), et ces doses sont présentées dans le Tableau 6. Néanmoins, la faible toxicité de l'oxime est à prendre en considération lors de son utilisation.

Traitement par méthylsulfate de pralidoxime, Contrathion® selon la hiérarchisation des symptômes	Posologies(*) 1 flacon de Contrathion® contient 200 mg de pralidoxime base après reconstitution.
Formes Mineures (traitement optionnel)	Adulte (pralidoxime base) : 200-400 mg en IV lente ou en IM. Enfant (pralidoxime base) : 20 à 40 mg/kg IV en 15 min.
Formes modérées	Adulte (pralidoxime base): <ul style="list-style-type: none"> ❖ Dose initiale : 1 g (5 flacons) en IV lente ou en IM (jusqu'à 2 g). ❖ 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). Enfant (pralidoxime base): <ul style="list-style-type: none"> ❖ Dose initiale : 20 à 40 mg/kg IV en 15 min. ❖ Dose d'entretien = 10 mg/kg.h. A ajuster selon la clinique et les données biologiques.
Formes sévères	Adulte (pralidoxime base): <ul style="list-style-type: none"> ❖ Dose initiale : 2 g (10 flacons) en IV lente ou en IM. ❖ 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). Enfant : idem formes modérées

(*) Les posologies présentées dans le tableau correspondent à celles de la spécialité Contrathion® et à celle d'un document médical de l'OMS. L'analyse des données cliniques accumulées ces dernières années démontrent une nette tendance à l'augmentation des doses initiales et des doses d'entretien.

Tableau 6 - Traitement par le méthylsulfate de pralidoxime (d'après la fiche Piratox N°4 : Organophosphorés-neurotoxiques de guerre et pesticides de l'AFSSAPS)

Lors des formes sévères, une intoxication par les NOPs peut induire des épisodes de convulsions, souvent indicatifs d'une exposition à une forte dose. Dans de tels cas, l'administration de diazépam est entreprise dans le but de maîtriser les fasciculations et les convulsions. Elles agissent via son action agoniste en facilitant la liaison du neurotransmetteur inhibiteur GABA à des récepteurs au sein du système nerveux central. Pour faciliter une gestion simultanée des trois antidotes (atropine, pralidoxime et du diazépam), un dispositif d'auto-injection Ineurope bi-compartmenté (doté de 2 chambres) est employé (AIBC Europe).

De plus, la composition des chambres (3 molécules sous forme lyophilisé et d'eau PPI) permet une reconstitution du mélange homogène lorsque l'on percute la seringue (**Tableau 7**).

Populations	Traitement des crises épileptiques	
	Doses initiales ou doses de charge	Doses d'entretien
Adultes	<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.
Enfants (1-15 ans)	<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.

(*) Disponible dans les lots PSM.

Tableau 7 - Traitement des crises épileptiques par du diazépam (d'après la fiche Piratox N°4 : Organophosphorés-neurotoxiques de guerre et pesticides de l'AFSSAPS)

4.4. Dosage des COPs

Le degré de sévérité d'une intoxication aux COPs est initialement évalué au moyen d'un dosage enzymatique par spectrophotométrie, visant à mesurer l'inhibition de l'AcChE présente dans le sérum. Cette approche repose sur la méthodologie développée par Ellman *et al.*, en 1961, qui permet une évaluation indirecte de la quantité de COP non dégradé⁴³. Cette méthode présente l'avantage de fournir des résultats rapides, économiques, fiables et sensibles.

En parallèle, dans le domaine de la recherche, l'identification des COPs peut se faire par diverses approches :

- Par l'utilisation d'éléments radiomarqués dans le but de les quantifier par radiométrie à scintillation liquide. Les agents sont préférentiellement marqués au ¹⁴C^{44,45}.
- Par la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à une sonde UV, procurant la facilité de détection des COPs en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Elle consiste en une méthode fiable et sensible employée pour la quantification du POX dans le cadre de ces travaux de thèse⁴⁶.

5. Les simulants

Les agents chimiques de guerre sont connus pour leur extrême toxicité, ce qui rend leur utilisation impossible dans les laboratoires de recherche conventionnels non habilités. Par conséquent, l'utilisation de simulants est autorisée afin de permettre des avancées dans la recherche sur les agents chimiques de guerre. Les simulants doivent être sélectionnés selon des critères bien précis, tels que leur similitude en termes de propriétés physico-chimiques et toxicologiques, de manière à reproduire les mêmes effets physiologiques que les agents réels plus nocifs¹⁴. Une étude de décontamination menée sur des volontaires a permis de mettre en évidence que 3 simulants sur 17 étaient adaptés à une utilisation chez l'humain¹⁴. Les travaux de cette thèse se concentreront particulièrement sur l'agent VX, pour lequel plusieurs simulants sont employés dans la littérature. Les propriétés physico-chimiques de ces simulants sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 8**).

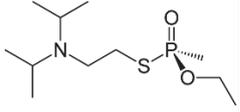
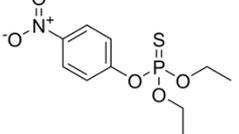
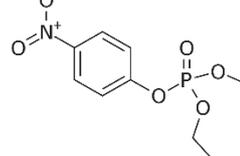
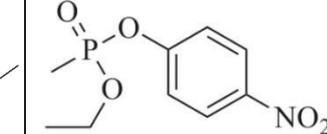
	VX	Parathion	Paraoxon	NEMP
Structure				
Poids moléculaire (g/mol)	267,4	291,3	275,2	323,3
Pression de vapeur à 25°C (mm Hg)	7×10^{-4}	$6,68 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$9,5 \cdot 10^{-7}$
Log P	2,09	3,83	1,98	4

Tableau 8 - Les différents simulants du VX et leurs caractéristiques physico-chimiques.

Le parathion, utilisé en tant que pesticide, possède une liaison P=S, ce qui modifie ses propriétés physico-chimiques et sa toxicité (beaucoup plus faible que celle du VX). Pour que la molécule soit active, une étape de métabolisation en oxon est nécessaire pour transformer la liaison P=S en P=O⁴⁷. Son délai d'action est caractérisé par une rapidité moindre, tandis que leur degré élevé de liposolubilité engendre une rétention du toxique au sein des tissus adipeux, suscitant ainsi des épisodes d'intoxications de longue durée ou des récives consécutives.

Le NEMP est une molécule synthétisée à partir de phosphite de triéthyle selon une procédure en deux étapes⁴⁸. Des tests enzymatiques d'Ellman ont permis de caractériser l'effet inhibiteur de l'AChE de la molécule afin de le valider comme simulant⁴⁹. Malgré son interaction avec l'AChE, le NEMP est une molécule beaucoup plus lipophile que le VX ou le POX, ce qui peut entraîner des variations sur les propriétés de pénétration à travers la peau.

Le POX, produit d'oxydation du parathion possède quant à lui une liaison P=O comme le VX. Avec des propriétés physico-chimiques, telles que son poids moléculaire et le Log P plus proches du VX, il présente un plus grand avantage comme simulant. Il entraîne des effets similaires aux effets obtenus avec le VX tels que des maux de tête, une faiblesse, des nausées, une gêne thoracique, des contractions musculaires et encore d'autres effets⁵⁰.

Un grand nombre d'études favorisent l'utilisation du POX comme simulant du VX pour l'évaluation de la pénétration à travers la peau (**Tableau 9**).

Auteurs	Simulants	Études
Qiao <i>et al.</i> , 1995 ⁵¹	POX	<i>In vivo</i> (porc)
Reifenrath G <i>et al.</i> , 1999 ⁵²	POX, acide benzoïque, parathion et DDT	<i>Ex vivo</i> (épiderme de porc) et <i>In vivo</i> (porc)
Vallet <i>et al.</i> , 2008 ⁵³	Demethon-S-methyl (DSM) et POX	<i>Ex vivo</i> (oreille de porc) et <i>in vitro</i> (membrane cutanée à épaisseur fractionnée)
Misik <i>et al.</i> , 2012-2015 ^{54,55}	POX, soman et VX	<i>In vivo</i> (rats)
Zenerino <i>et al.</i> , 2015 ⁵⁶	POX	<i>In vitro</i> (membrane en silicone)
Zhu <i>et al.</i> , 2015 ⁵⁷	POX, hydroquinone, clonidine et acide benzoïque	<i>Ex vivo</i> (SC et épiderme humain)
Salerno <i>et al.</i> , 2017 ^{58,59}	POX	<i>Ex vivo</i> (oreille de porc)
Pavlikova <i>et al.</i> , 2018 ⁴⁵	POX	<i>Ex vivo</i> (oreille de porc)
Danoy <i>et al.</i> , 2022 ⁶⁰	POX	<i>Ex vivo</i> (oreille de porc)

Tableau 9 - Quelques exemples de publications ayant utilisé le POX comme simulant du VX pour des études de pénétration cutanée *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo*.

L'intoxication par les COPs en général (OP et NOP), se caractérise par sa gravité et engage directement le pronostic vital. Leur développement depuis les années 30, et leur rapide évolution à travers les années, notamment en tant qu'armes de guerre et outils terroristes, en fait une préoccupation majeure. Leurs mécanismes d'action face aux AChEs peuvent rapidement conduire au décès en l'absence d'une intervention médicale d'urgence. Ces différents aspects seront abordés dans le chapitre à venir, qui se concentrera sur l'évaluation de la pénétration cutanée de ces agents ainsi que sur les méthodes de décontamination actuellement disponibles.

Chapitre 2 : La décontamination cutanée

1. Principale voie d'entrée des agents chimiques de guerre : la peau

La peau joue un rôle fondamental en tant que première barrière de protection contre les agents chimiques de guerre et les substances chimiques toxiques utilisées dans l'industrie. Lorsqu'il y a un contact direct avec la peau, ces composés ont la possibilité de pénétrer à travers les différentes couches de l'épiderme, du derme et d'atteindre la circulation sanguine, entraînant ainsi une absorption systémique⁶¹.

1.1. Structure et composition de la peau

La peau est le plus vaste organe de l'organisme humain avec une superficie qui s'étend jusqu'à 1.8 m² et un poids total de 5 kg. Son rôle est essentiel pour se prémunir contre une variété d'agents extérieurs tels que les pathogènes et les agressions environnementales⁶². La structure et la composition cellulaire de la peau collaborent en synergie pour faire face aux défis physiques et chimiques du milieu extérieur. Cette fonction protectrice est maintenue grâce à une organisation en plusieurs couches, à savoir l'épiderme, le derme et l'hypoderme, avec différents degrés de spécialisation au sein de chaque couche (**Figure 10**).

L'épiderme, couche la plus superficielle et biologiquement la plus active par sa composition en kératinocytes, se renouvelle en permanence au niveau de sa couche basale⁶³. On y trouve également d'autres types cellulaires tels que les cellules de Langerhans, qui jouent un rôle immunitaire en protégeant l'épiderme, les mélanocytes, responsables de la protection contre les rayons UV, ainsi que les cellules de Merkel, impliquées dans la sensation tactile. L'épaisseur de l'épiderme varie entre 75 et 150 µm selon les régions du corps.

Le mécanisme de différenciation des kératinocytes est un processus essentiel pour la stratification de l'épiderme, permettant la formation du stratum corneum (SC). Les kératinocytes prolifèrent dans la couche épineuse, puis se différencient et migrent vers la couche granuleuse de l'épiderme, changeant de type fonctionnel et de phénotype. Ce processus est régulé par certains facteurs de transcription, voies de signalisation et régulateurs épigénétiques⁶⁴. Ainsi, la structure épidermique évolue des cellules sous forme hexagonale présente dans la couche basale vers des cellules anucléées dans le SC⁶⁵.

Le SC qui constitue la couche la plus externe, est formé d'agrégats de cornéocytes morts, représentant la phase terminale de la différenciation des kératinocytes⁶⁶. La couche la plus externe du SC desquame progressivement, assurant ainsi un renouvellement constant de l'épiderme et l'élimination des micro-organismes nuisibles de la peau. La présence d'une

matrice lipidique au sein du SC joue un rôle crucial dans sa fonction de barrière cutanée. Cette matrice est composée de cholestérol, d'acides gras libres et de céramides⁶⁷, des lipides insolubles qui limitent le passage de composés étrangers à travers l'épiderme par la voie trans-cellulaire⁶⁸. Cette propriété de la barrière cutanée peut cependant être exploitée à des fins cosmétiques pour favoriser l'absorption de principes actifs à travers la peau en utilisant des tensio-actifs⁶⁹.

L'épiderme repose sur un tissu conjonctif sous-jacent appelé le derme, séparé par une jonction dermo-épidermique. Cette jonction est responsable de la cohésion et de l'adhésion entre le derme et l'épiderme grâce à la présence d'hémidesmosomes et d'intégrines au niveau des kératinocytes basaux, ainsi que des filaments de collagène de type VII au niveau du derme. Le derme est une structure fibreuse constituée de collagène, de fibres élastiques, de réticuline et d'autres composants extracellulaires. Il abrite le système vasculaire, les terminaisons nerveuses, les follicules pileux et les glandes sudoripares et sébacées. Avec une épaisseur allant de 1 à 2 mm (de 3 à 4 mm au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds), les fibroblastes constituent la population cellulaire prédominante du derme, et sont responsables de la production et de l'organisation de la matrice extracellulaire. Le derme compte également des macrophages, des adipocytes, des mastocytes, des cellules de Schwann et des cellules souches⁷⁰.

Le tissu sous-cutané, également appelé hypoderme, est situé en profondeur sous le derme. Ce tissu conjonctif innervé et vascularisé se caractérise par la présence d'adipocytes organisés en lobules. Ces adipocytes assurent le stockage de la graisse, qui peut être libérée sous forme de lipides lorsque le corps est en activité⁷¹.

Les annexes cutanées comprennent la glande sébacée, la glande sudoripare ainsi que le follicule pileux. Les glandes sébacées annexées au follicule pileux forment l'unité pilo-sébacée. Composé de sébocytes, ces cellules permettent la production de sébum (via une sécrétion holocrine) à la surface de la peau⁷². Le follicule pileux est ancré dans la peau sous la forme d'une invagination épidermique dans le derme. Sa structure et sa composition, notamment d'un muscle arrecteur, est responsable de la pousse du poil. Le cycle du follicule pileux comprend différentes phases telles que les phases anagène (phase de croissance active du poil), télogène (phase de repos) et catagène (phase de transition entre les phases de croissance et de repos). Les glandes sudoripares sont largement réparties dans la peau humaine. Parmi elles, les glandes sudoripares eccrines jouent un rôle essentiel dans la dissipation de la chaleur et la sécrétion de la sueur. Elles sont principalement localisées au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. D'autre part, les glandes sudoripares

apocrines sont associées aux follicules pilo-sébacés, et on les trouve principalement au niveau des aisselles et des régions uro-génitales.

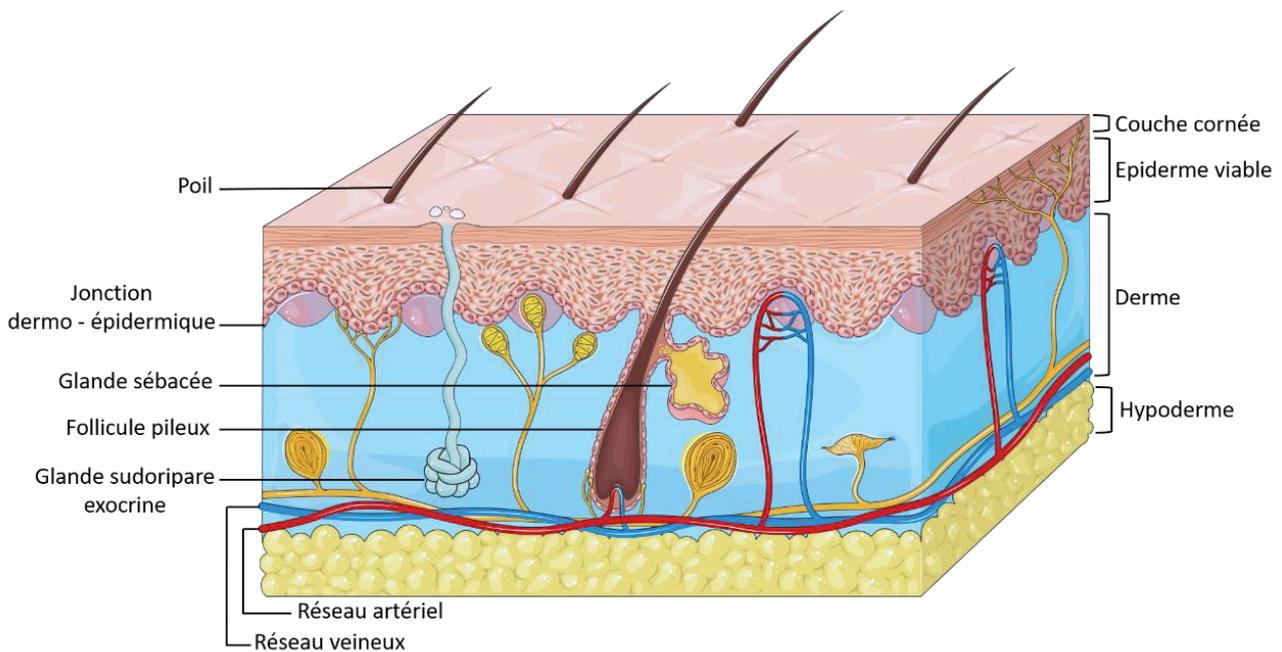


Figure 10 - Structure de la peau – Présentation des différentes couches de la peau et de ses annexes (réalisée sur Biorender).

1.2. Fonctions de la peau

La peau, avec sa structure multicouche, joue un rôle crucial en tant que barrière physique, immunologique et antibactérienne. Sa composition tissulaire et cellulaire lui permet de faire face aux diverses agressions (molécules exogènes) qu'elle rencontre quotidiennement. La matrice lipidique du SC, qui comprend des cholestérols, des céramides et des acides gras libres, est essentielle pour maintenir cette barrière physique. Elle limite la perte en eau, nécessaire pour certains processus biologiques, tout en maintenant l'hydratation des couches externes du SC⁷³.

Le derme, de son côté, assure des rôles importants de soutien, de protection et de thermorégulation⁷⁰. Contrairement à la simple fonction de remplissage qui leur a été initialement attribuée, les tissus conjonctifs du derme et de l'hypoderme confèrent à la peau une résistance mécanique aux forces de pression et de traction. Cette résistance est en grande partie due à l'organisation et à la composition des fibres de collagène (type I et III) et d'élastine. La peau doit être capable de résister et de se remettre des déformations et des dommages importants résultant de la croissance, des mouvements et des blessures potentielles⁷⁴. Sa composition en vaisseaux sanguins et lymphatiques implique que le derme possède des propriétés de barrière cutanée très limitée. Les composés étrangers diffusent à

travers le derme selon une vitesse (dépendante de la nature de la molécule et de l'épaisseur du derme) ou peuvent s'y loger afin de retrouver la circulation systémique via les vaisseaux sanguins microscopiques du derme⁷⁵.

Outre ses fonctions essentielles, la peau remplit d'autres rôles importants. Elle agit comme une barrière thermique grâce à la présence d'adipocytes, qui stockent l'énergie et contribuent à la thermogenèse⁷⁶. D'autre part, la peau assure une protection contre les rayonnements ultraviolets (UV) grâce aux cellules mélanocytaires qui absorbent les UV pour limiter leur impact sur l'ADN. En plus de sa fonction de barrière physique, la peau possède également une fonction sensorielle grâce à son réseau de neurones sensoriels, permettant la transmission de diverses informations.

2. Les mécanismes d'absorption cutanée

2.1. Voies et cinétique d'absorption

La pénétration percutanée est un processus passif qui peut survenir suite à une exposition à des produits chimiques utilisés dans l'agriculture, l'industrie, les produits pharmaceutiques et les cosmétiques. Lorsqu'une substance est appliquée sur la peau, elle peut être absorbée dans la circulation sanguine, ce qui est connu sous le nom d'absorption percutanée. Cette absorption peut se produire par diffusion à travers les différentes couches de la peau ou par le biais des annexes cutanées telles que le follicule pileux et les canaux sudoripares⁷⁷ (**Figure 11**).

Le passage de molécules à travers le SC, s'appelle pénétration au cours duquel il peut constituer un réservoir. La diffusion de ces composés d'une couche à l'autre se nomme la perméation.

Ainsi, le passage de ces molécules du derme vers la circulation sanguine constitue la résorption.

Une meilleure compréhension de la barrière cutanée et des mécanismes biologiques qui limitent l'absorption des substances topiques est cruciale pour faire progresser la recherche contre les contaminations aux agents chimiques de guerre⁶¹. Anatomiquement, il existe deux voies distinctes pour la pénétration des substances : la voie trans-annexielle, qui

implique les annexes cutanées, et la voie trans-épidermique, qui se produit à travers le SC (Figure 11).

1. Libération de la molécule

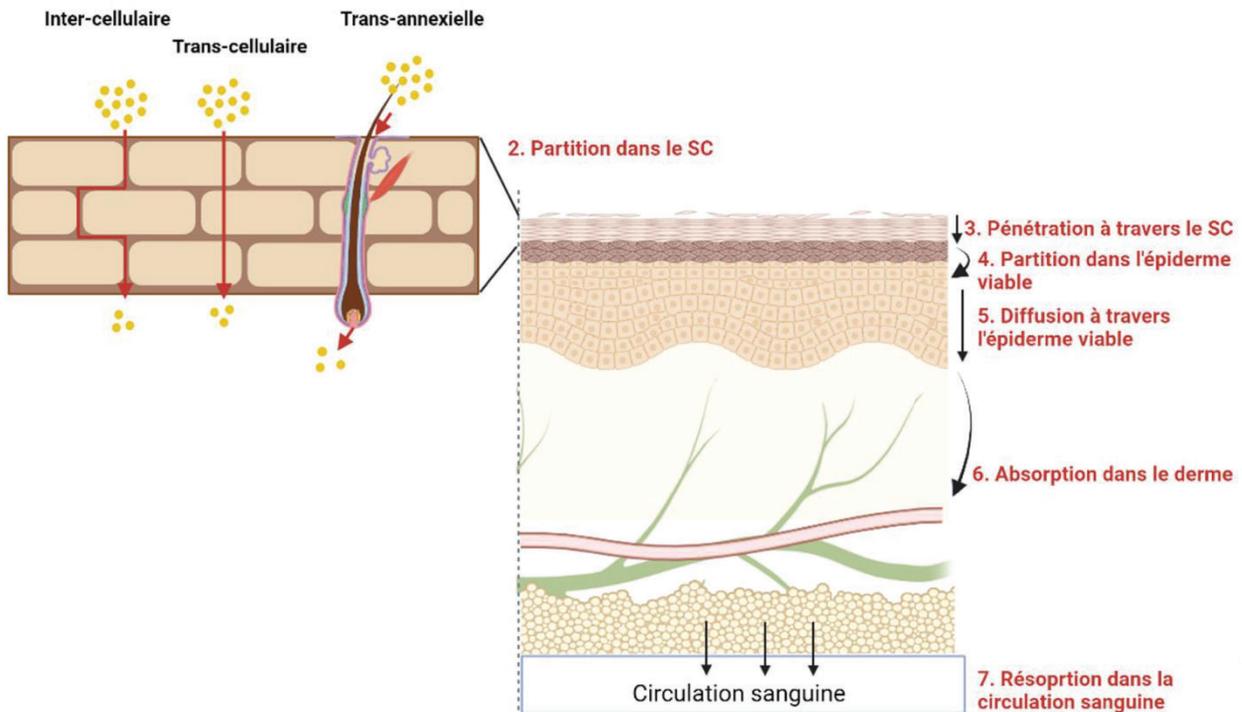


Figure 11 - Les différentes voies d'absorption cutanées ainsi que la cinétique d'absorption lors d'une application topique (réalisée sur Biorender)

Au sein de la voie trans-épidermique, plusieurs voies existent. Premièrement, la voie inter-cellulaire qui implique le passage des molécules au sein de la matrice lipidique, en évitant les cellules du SC appelées cornéocytes. Cela signifie que le trajet de diffusion est beaucoup plus long que l'épaisseur du SC lui-même ; environ 20 μm pour le SC et 300-900 μm pour la pénétration via cette voie⁷⁸. En revanche, la voie trans-cellulaire permet aux molécules lipophiles de petite taille de passer directement à travers les cornéocytes⁷⁹. En parallèle, la voie trans-annexielle empruntant principalement les follicules pileux a été décrite par Lademann *et al.*, ces derniers constituant une voie efficace pour l'absorption de substances appliquées par voie topique, en plus de la voie inter-cellulaire⁸⁰. Ils représentent l'une des surfaces les plus étendues pour l'absorption⁸¹, avec une capacité de stockage pouvant atteindre jusqu'à dix fois celle du SC. Cependant, ces valeurs peuvent varier en fonction de leur localisation anatomique⁸². D'autre part, la présence de glandes sudoripares et sébacées peut également influencer l'absorption dermique⁸³. Les zones de la peau richement vascularisées sont généralement les parties où la pénétration est plus importante, car leur passage dans la circulation sanguine peut entraîner des effets systémiques rapidement⁸¹. Cependant, la voie trans-annexielle constitue la voie la moins utilisée pour la perméation des

molécules⁸⁴ car elle favorise principalement la diffusion de substances de très haut poids moléculaire, telles que les nanoparticules⁸⁰.

2.2. Facteurs influençant la pénétration cutanée

Outre les différentes voies que les molécules peuvent emprunter pour pénétrer à travers la peau, cette perméation cutanée peut être influencée par des paramètres environnementaux spécifiques ou dépendre des caractéristiques intrinsèques des molécules en question.

Au cours de ces dernières années, Maibach *et al.* ont établi une liste de 20 facteurs qui met en évidence les paramètres influençant l'absorption percutanée, en se basant sur des observations provenant de comparaisons *in vitro* et *in vivo*⁸⁵⁻⁸⁶ (**Tableau 10**).

1	Propriétés physicochimiques (taille des particules/poids moléculaire, lipophilie, pH, pKa, Coefficient de partage)
2	Véhicule/formulation
3	Conditions d'expositions (dose, durée, surface, fréquence d'exposition)
4	Appendices cutanés (follicules pileux, glandes)
5	Sites d'application cutanée (variation régionale de la pénétration)
6	Variabilité de la population (prématurité, nourrissons et personnes âgées)
7	État de la surface de la peau (hydratation, température, pH)
8	Santé et intégrité de la peau (traumatismes, maladies de la peau)
9	Substantivité et liaison aux différents composants de la peau
10	Distribution et toxicité systémiques
11	Exfoliation
12	Lavage et rinçage
13	Frottement/massage
14	Transfert à d'autres personnes (d'humain à humain et de surface dure à humain)
15	Volatilité
16	Biotransformation métabolique/métabolisme cutané
17	Transformation photochimique et photosensibilité
18	Cinétique d'excrétion
19	Propagation latérale
20	Méthode chimique de détermination de l'absorption percutanée

Tableau 10 - Les facteurs influençant l'absorption cutanée (inspirée de R. M Law *et al.*, 202087)

Lorsque les entrées et les sorties de part et d'autre de la barrière cutanée s'équilibrent (flux constant), l'absorption percutanée est régie par la loi de Fick. Selon cette loi, la vitesse de pénétration est proportionnelle à la concentration de substance déposée, à la surface d'application et inversement proportionnelle à l'épaisseur de la peau⁸⁷. De plus, cette vitesse dépend des propriétés intrinsèques des molécules d'intérêt (telles que leur taille par exemple).

Selon les règles de Lipinski, seules les molécules répondant à certains critères peuvent pénétrer plus facilement dans la peau⁸⁸. Parmi ces critères, les molécules doivent :

- Posséder un poids moléculaire inférieur à 500g/mol
- Être lipophiles ($-2 < \log P < 5$) : les molécules amphiphiles auront plus de facilité pour pénétrer, car elles auront de l'affinité pour le SC hydrophobe et l'épiderme viable hydrophile. Avec un log P compris entre 1 et 3, les COPs pénètrent facilement dans la peau.
- Ne pas comporter plus de 5 donneurs de liaison d'hydrogène
- Ne pas comporter plus de 10 accepteurs de liaison hydrogène
- Posséder un nombre d'angles de rotation ≤ 5 (permet de mesurer la flexibilité moléculaire)

Certains facteurs les plus influents sur la pénétration cutanée sont décrits plus précisément ci-dessous :

- Influence selon la volatilité des molécules

La volatilité fait référence à la capacité d'une substance à s'évaporer spontanément dans l'air ou dans le cas d'un agent topique, à s'évaporer de la peau au cours du temps. Comme décrit dans le **Tableau 11** ci-dessous, on observe que la volatilité des agents chimiques de guerre varie d'une classe à l'autre, ce qui influence significativement leur capacité à pénétrer à travers le SC ainsi que leur toxicité. Plus un agent est volatil, plus sa DL₅₀ est élevée. Par exemple, les agents de la série V, caractérisés par une faible volatilité, présentent des valeurs de DL₅₀ inférieures à celles des agents de la série G, qui sont très volatils. Cette information souligne l'importance de considérer la volatilité des substances lors de leur utilisation.

	Tabun	Sarin	Soman	VX
Volatilité (mg/kg)	612	17000	3000	10
DL ₅₀ percutanée (mg/kg)	83	118	9,98	0,085

Tableau 11 - Volatilité et DL₅₀ percutanée des agents G et V chez des rats Wistar (adaptée de la Thèse d'Alicia Salerno, 2016)

- Influence selon la localisation anatomique d'application

Le processus d'absorption cutanée varie considérablement d'une région à l'autre du corps humain. En général, la pénétration est plus rapide dans les zones où les follicules pileux sont nombreux, et un peu plus lente dans les zones où le SC est épais. Les zones où le taux d'absorption est le plus élevé comprennent le front, le cuir chevelu et le cou, tandis que les zones où le taux d'absorption est le moins élevé incluent la paume des mains et la plante des pieds. Ces différences régionales sont en partie liées à l'épaisseur de la peau et au nombre de couches du SC.

Pour résumer, les molécules hydrosolubles pénètrent principalement par les voies trans-cellulaire et trans-annexielle, tandis que des molécules amphiphiles pénètrent par les voies inter-cellulaire et trans-cellulaire, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et en tenant compte des différents facteurs pouvant influencer cette pénétration. Le processus d'absorption cutanée est défini comme la somme de trois événements successifs : un contact avec le SC, une pénétration à travers chaque couche de la peau (SC, épiderme viable, derme et les annexes pilo-sébacées) et enfin une dernière phase de résorption dans la microcirculation dermique (**Figure 11**).

3. Modèles d'études d'absorption existants

L'évaluation de la pénétration cutanée de molécules ou substances peut être réalisée en laboratoire à l'aide de différentes approches. Selon les besoins et les objectifs de l'étude, plusieurs méthodes peuvent être utilisées telles que des études *ex vivo* à partir d'explants cutanés prélevés chez l'humain ou l'animal, des études *in vitro* utilisant des cultures de cellules 2D ou sur des modèles de peau reconstruite, ou encore des études *in vivo* sur des sujets humains ou des animaux vivants.

Le processus d'étude de la pénétration cutanée est réglementé par la norme NF X52-122 « Sécurité et protection du citoyen – NRBC – Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine » du 16 janvier 2016. Elle permet de

définir les protocoles de contamination et de décontamination *in vivo* et *ex vivo* pour évaluer l'efficacité des technologies de décontamination sur la peau saine dans le contexte des risques nucléaires, radiologiques, biologiques, chimiques et explosifs (NRBCE).

3.1. Modèles *ex vivo/in vitro* de pénétration cutanée

Les expérimentations *in vitro* présentent plusieurs avantages par rapport aux expérimentations *in vivo* sur des animaux ou des volontaires humains. Tout d'abord, elles sont économiquement avantageuses en termes de coûts et de temps, car elles nécessitent moins de ressources financières et peuvent être réalisées plus rapidement. De plus, elles offrent une meilleure reproductibilité des résultats, car les conditions expérimentales peuvent être contrôlées de manière plus précise. De même, la variation des paramètres est moins restreinte, permettant ainsi d'obtenir des données plus fiables et pertinentes⁸⁹. Les résultats préliminaires obtenus à partir de ces études *in vitro* permettent de prédire la pénétration cutanée chez l'humain, à condition que ces études soient correctement réalisées et que les modèles utilisés soient représentatifs de la peau humaine⁹⁰. Il est important de souligner que ces tests doivent être effectués conformément aux lignes directrices de l'OCDE pour les essais des produits chimiques, afin d'assurer leur validité scientifique et leur fiabilité.

3.1.1. La cellule de Franz

La cellule de Franz est un dispositif couramment utilisé pour étudier la perméabilité cutanée face à différents types de molécules, notamment celle des agents chimiques de guerre tels que le VX. Il existe deux types de cellules de diffusion : statique et dynamique, avec un prélèvement automatique durant la cinétique du test. Le système dispose d'un compartiment receveur qui simule le système physiologique sanguin, contenant un milieu tel que du PBS, des milieux de culture ou encore un mélange d'eau/éthanol, en contact avec le côté dermique de la peau⁶⁰. Le choix du milieu récepteur doit permettre de solubiliser la substance d'essai testée et maintenir un contact constant avec la partie inférieure du derme. La température de la surface cutanée doit être stabilisée à $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pour créer des conditions physiologiques appropriées. Le compartiment donneur est organisé de manière à ce que le SC soit en contact avec l'air, ou en contact avec la formulation à étudier⁸⁹ (**Figure 12**). Ce système permet de quantifier les molécules d'intérêt dans les différentes couches de la peau à la fin du protocole de pénétration, ainsi que celle recueillie dans la fraction du compartiment récepteur, en utilisant des méthodes d'identification appropriées. Grâce à cette technique, il est possible d'évaluer la capacité de pénétration cutanée de diverses substances et de mieux comprendre leur comportement à travers les différentes couches de la peau.

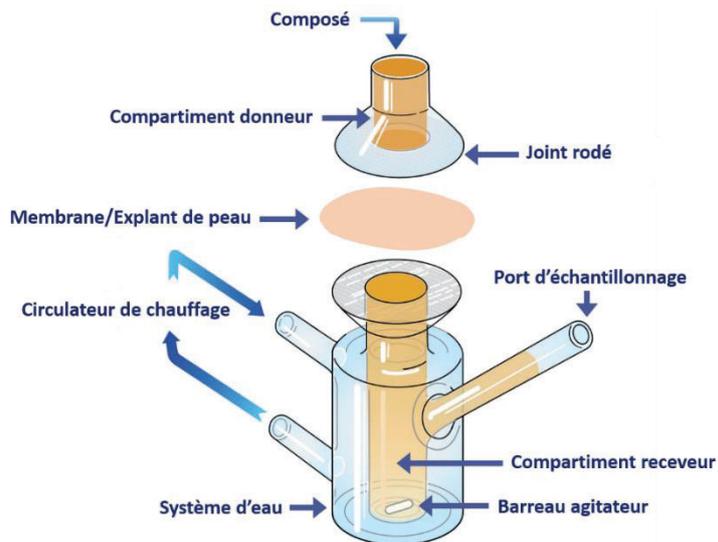


Figure 12 - Cellule de diffusion de Franz statique pour les études *ex vivo* de pénétration cutanée (Thèse d'Etienne Bourgart, 2019).

Lors de l'utilisation de dispositifs de diffusion tels que la cellule de Franz, plusieurs paramètres importants doivent être considérés afin d'obtenir des résultats fiables et scientifiquement significatifs. Parmi ces paramètres, on peut citer le choix du type de cellule utilisé, l'origine de la peau, sa viabilité, la préparation des échantillons cutanés et la composition du milieu récepteur⁹¹. Le choix de l'échantillon cutané dépend de l'objectif du test.

En ce qui concerne l'origine de l'échantillon cutané, il existe des réglementations et des considérations éthiques concernant l'utilisation de peau humaine provenant de chirurgies abdominales. Par conséquent, des alternatives telles que la peau porcine sont souvent recommandées par le « Scientific Committee on Cosmetic Products »⁹², en raison de leur coût moindre et de leur plus grande disponibilité. La peau porcine est considérée comme une option valide car elle présente des similitudes histologiques et physiologiques avec la peau humaine⁹³ (

Tableau 12). Récemment, Danoy *et al.* ont mené une étude comparant la pénétration du POX à travers la peau abdominale humaine à celle d'une oreille porcine. Bien qu'ils aient constaté des différences dans la pénétration du POX à travers les deux types de peaux, l'utilisation de la peau porcine reste le site anatomique le plus approprié pour prédire la pénétration cutanée humaine⁶⁰.

Couche de la peau	Abdomen humain	Oreille de porc
SC (µm)	13	6,5
Épiderme (µm)	60	52
Derme (µm)	1832	952

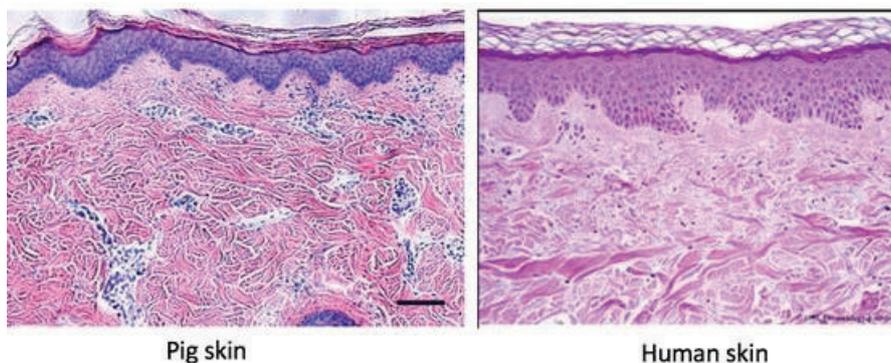


Tableau 12 - Comparaison des épaisseurs des différentes couches cutanées entre une peau abdominale humaine et l'oreille de porc (adaptée de In K., et al 201895)

L'évaluation de la qualité des explants de peau est essentielle pour déterminer leur pertinence et leur adéquation à l'usage prévu. Dans un premier temps, une évaluation visuelle est entreprise afin de déceler tout dommage physique éventuel. Par la suite, l'intégrité de la barrière cutanée est évaluée en mesurant la perte en eau trans-épidermique (TEWL). Lorsque l'accès à des peaux biologiques est limité, des membranes synthétiques sont employées comme alternatives⁹⁴. Ces modèles présentent l'avantage d'être faciles à obtenir et n'entraînent pas de variabilité entre les expériences. Cependant, il convient de noter que ces

modèles ne peuvent pas toujours prédire les résultats chez l'humain du fait de sa structure en couche simple⁹⁵.

3.1.2. Les peaux reconstruites

Ces dernières années, des efforts ont été consacrés à l'optimisation des modèles de peaux reconstruites afin de mieux reproduire la composition *in vivo* de la peau, permettant de limiter l'utilisation des explants cutanés et des expérimentations sur des animaux⁹⁶. Ces modèles, plus ou moins complexes selon les besoins, permettent de s'abstenir de l'extrapolation inter-espèce et de simplifier l'approvisionnement en peau. Malgré leur similitude avec la peau humaine, certains paramètres tels que l'hétérogénéité expérimentale, la provenance cellulaire, les substrats dermiques, le milieu de culture, et encore d'autres facteurs peuvent affecter la reproductibilité des données. Néanmoins, l'industrie cosmétique est le principal utilisateur de ces modèles pour le criblage des principes actifs.

3.2. Modèles *in vivo* de pénétration cutanée

Lorsque les résultats obtenus par les expérimentations *ex vivo* sont prometteurs ou ne suffisent plus à répondre aux besoins, des études *in vivo* peuvent être envisagées. Des études datant des années 60-70 ont pu étudier la pénétration percutanée du VX sur des volontaires humains⁹⁷. Cependant, de nos jours, de telles études ne sont plus autorisées. En France, l'expérimentation animale est très réglementée, notamment par des structures visant la protection de l'animal (comités d'éthiques). Des demandes d'autorisation préalables doivent être soumises auprès du comité d'éthique et les protocoles d'expérimentation sont vérifiés minutieusement avant d'être mis en œuvre. Cette approche vise à garantir le bien-être et le respect des droits des animaux utilisés dans la recherche scientifique.

Deux modèles animaux sont largement reconnus comme appropriés pour évaluer l'efficacité des systèmes de décontamination en raison des similitudes de ces peaux avec la peau humaine, notamment en termes de perméabilité : le porc et le singe rhésus⁹⁸. Cependant, l'utilisation de ces modèles soulève des problèmes tant sur le plan économique qu'éthique. En outre, certains modèles de rongeurs ont également été utilisés, tels que le cobaye sans poils ou des souris athymiques greffées avec de la peau humaine. Une étude menée de Bazire *et al.* a détaillé un modèle appelé « HuSki » dans lequel de la peau humaine est greffée sur des souris SKH-1. En raison de contraintes éthiques, le modèle HuSki peut être le modèle le plus proche de la peau humaine *in vivo* qui soit envisageable pour les études évaluant des composés toxiques⁹⁹.

D'autre part, les souris sans poils immunocompétentes SKH-1 représentent le modèle d'étude le plus fréquemment utilisé dans les laboratoires. Taysse *et al.* l'ont adopté comme

principal modèle pour étudier la décontamination de l'ypérite et du VX à l'aide du RSDL et la TF sous forme de poudre¹⁰⁰. Les deux systèmes ont montré une réduction des cloques induites par l'Ypérite trois jours après l'exposition. Néanmoins, les résultats obtenus chez la souris diffèrent de celle obtenue chez le porc. Outre les différences entre les espèces, l'évaluation des moyens de décontamination doit être précisément déterminée (dose toxique, le moment de la décontamination, les façons d'appliquer le décontaminant ...) car tous ces paramètres sont essentiels.

De façon générale, il serait souhaitable de standardiser des protocoles d'essais afin de permettre des comparaisons simplifiées entre les différentes études.

4. La décontamination de masse

Les incidents chimiques, qu'ils soient accidentels ou délibérés, exposent chaque année des dizaines de milliers de personnes¹⁰¹. Suite à ces incidents, l'intervention principale de santé publique consiste à mettre en œuvre des processus de décontamination, visant à réduire les dommages en limitant le nombre de personnes exposées et le risque de propagation de la contamination à d'autres individus. Malgré un manque de statistiques précises concernant les conséquences des actes NRBC (Nucléaires, Radiologiques, Biologiques, Chimiques) liés à la guerre ou au terrorisme, la gestion de ces risques engendre des coûts considérables en raison de la nécessité de prendre en charge les personnes touchées et de mettre en place des mesures à court et à long terme pour gérer ces situations sur le terrain.

4.1. Les intervenants

Le directeur des opérations de secours (DOS) et du commandant des opérations de secours (COS) composent les 2 entités du commandement. Le DOS est généralement le maire ou le préfet, qui représente l'Etat dans le département concerné. Le COS est désigné par le service départemental d'incendie et de secours (SDIS), à l'exception de certaines communes où les fonctions de COS sont exercées conformément aux règles d'emploi respectivement par le commandant du Bataillon des marins-pompiers de Marseille et celui de la Brigade des sapeurs-pompiers de Paris. Les premiers intervenants sur le terrain (services de secours, services de police, forces de gendarmerie, SMUR...) ont pour mission de limiter la dispersion des victimes potentiellement contaminées et contaminantes, ainsi que de réduire la durée d'exposition des victimes aux agents toxiques. L'organisation des actions des premiers intervenants et des services de secours est présentée dans la section 4.2.

Pour assurer la sécurité des intervenants, il est impératif que les agents impliqués revêtent des tenues de protection chimique de niveau 1 ou 2, qui sont étanches au gaz, similaires à des scaphandres. Ils doivent porter en complément un appareil respiratoire isolant (ARI) ainsi que des masques respiratoires filtrants, des gants et surbottes (**Figure 13**).



Figure 13 - Tenue de sécurité portée par les différents intervenants lors d'une attaque aux armes chimiques (Braue et al., 2008)

4.2. Gestion des victimes lors d'une attaque aux agents chimiques

Des études menées principalement au Royaume-Uni et aux Etats-Unis ont conduit à des modifications dans le système de décontamination lors de ces incidents chimiques. Initialement, il était déconseillé aux secouristes d'intervenir en cas d'incidents, et il était préconisé d'attendre l'intervention des services de secours spécialisés et de l'unité de décontamination de masse. Depuis, les modalités d'intervention ont évolué et ont permis de s'adapter aux différents types d'attaques chimiques.

En France, le système de sécurité est régi par la Circulaire relative à la doctrine nationale d'emploi des moyens de secours et de soins face à une action terroriste mettant en œuvre des matières chimiques (n° 700/SGDN/PSE/PPS du 2 octobre 2018). Cette circulaire s'applique en cas d'attentat chimique perpétré en zone urbaine à forte densité de population, à l'air libre ou dans un site semi-ouvert. Son principal objectif est le sauvetage et la préservation des vies humaines.

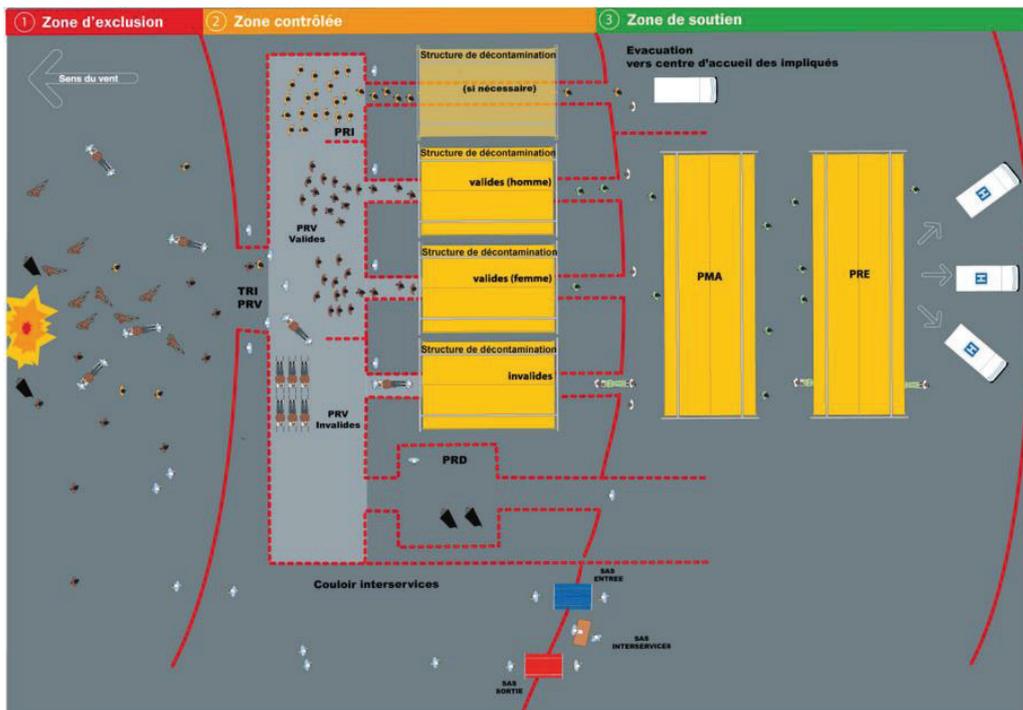


Figure 14 - Schéma général d'une intervention face à une attaque terroriste par des agents chimiques (Cirulaire 700/SGDN/PPS du 7 novembre 2008). PRV : Point de regroupement des victimes symptomatiques, PRD : Point de regroupement des personnes décédées, PRI : Point de regroupement des personnes impliquées, PMA : Poste médical avancé et PRE : Point de répartition des évacuations.

La prise en charge médicalisée des victimes vise à assurer leur survie et à stabiliser leurs détresses vitales avant une décontamination approfondie, sans engendrer de retard. L'intervention est soigneusement planifiée et se décompose d'une manière très précise en différentes zones (**Figure 14**).

La zone d'exclusion (ZE), qui correspond à la zone contaminée ou susceptible d'être contaminée, ou le port de la tenue de protection est obligatoire. Elle est subdivisée en deux parties : la zone de danger immédiat (avec une préconisation d'un rayon de 100m autour du point d'attentat) et la zone de danger sous le vent (avec une préconisation d'une zone s'étendant sur 500m pour un attentat à ciel ouvert). Une fois les victimes extraites de la ZE, une première étape de décontamination peut être réalisée en utilisant la terre de foulon (TF) et en procédant au déshabillage des victimes. La deuxième zone, dite contrôlée, est une allée qui sépare la zone d'exclusion et la zone de soutien. Elle est constituée d'une zone de décontamination où les victimes peuvent être regroupées (PRV) afin de prévenir et de réduire la contamination. Le port de la tenue de protection est également obligatoire en amont de la décontamination. La zone de soutien, située à l'opposé du vent, est conçue pour accueillir les services de secours et faciliter leurs opérations.

Les formations militaires de la sécurité civile sont équipées d'une chaîne de décontamination employée en cas d'agression chimique sur la population civile. Elle permet la décontamination et le rhabillage de 1000 personnes valides et assure un flux de 10 personnes par heure.

5. La décontamination humide

Avec les risques croissants d'exposition à des substances toxiques telles que les produits chimiques et les pesticides, une attention particulière a été accordée à la mise en place de stratégies de décontamination et plus précisément vis-à-vis de la décontamination cutanée. Ce processus de décontamination repose sur l'élimination et/ou la neutralisation des contaminants chimiques présents sur la peau¹⁰².

Pour développer des méthodes de décontamination efficaces, certains facteurs doivent être pris en compte :

- Les propriétés physico-chimiques du décontaminant
- La durée entre l'exposition à l'agent toxique et la décontamination
- Le protocole de décontamination

5.2. La décontamination à base d'eau

Historiquement, en raison de sa disponibilité, le rinçage rapide à l'eau seule ou à l'eau savonneuse à une température entre 30 et 40°C est la méthode de décontamination la plus couramment utilisée pour éliminer une variété de contaminants chimiques. L'utilisation de l'eau permet d'offrir certains avantages : elle permet la dilution du contaminant, un rinçage de la peau, la diminution du taux de réactions chimiques, la minimisation des effets hygroscopiques du chimique sur les tissus environnants ainsi qu'une réduction de l'impact sur la santé¹⁰³.

Le système de décontamination « Ladder Pipe » consiste à créer un couloir d'eau pulvérisée à haut volume et basse pression des deux côtés à l'aide de tuyaux et de pistolets par des camions. Le confinement des eaux de ruissellement contaminées doit être envisagé lors de tout incident de décontamination de victimes afin d'éviter la contamination des sols **(Figure 15)**.

Une étude sur la décontamination à l'eau du Salicylate de méthyle (MeS) sur des volontaires humains a montré une diminution significative de la teneur en contaminant dans la peau par rapport aux témoins non décontaminés¹⁰⁴. Des résultats similaires ont été obtenus par l'équipe d'Amlot *et al.*, qui montre que le rinçage à l'eau savonneuse à 5 % durant 2

minutes suivi d'un rinçage à l'eau claire pendant 1 minute, réduit significativement le contaminant sur le dos des volontaires par rapport à l'absence de décontamination¹⁰⁵. Cependant, des études réalisées par Maibach et Feldmann¹⁰⁶ ont permis de quantifier l'absorption percutanée du malathion et du parathion sur 24h après une administration topique sur des volontaires humains, et ont démontré que la décontamination à l'eau savonneuse conduisait seulement à une décontamination partielle, avec une résorption de 1.4 à 15.8 % du produit dans la circulation sanguine.

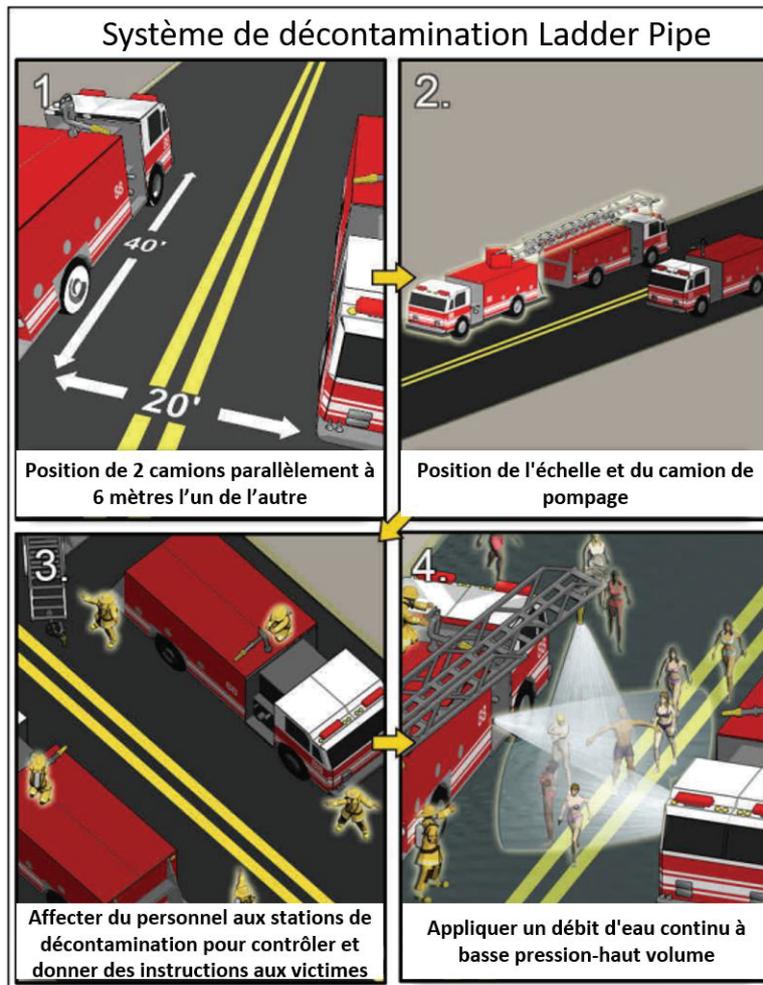


Figure 15 - Dispositif de lavage à l'eau sous forme de douche (Système Ladder Pipe), (adaptée de « Guidelines for mass casualty decontamination during an Hazmat/Weapon of mass destruction incident : Volume 1 and 2 »).

Certaines études ont révélé que le taux d'absorption était effectivement plus élevé après la décontamination par rapport aux groupes non décontaminés. Ce phénomène a été identifié et nommé effet "wash-in", dans lequel le processus de lavage de la peau améliore paradoxalement la pénétration cutanée et l'absorption systémique, comme le résume une étude de Moody *et al.*,¹⁰⁷. Le lavage à l'eau induit une augmentation du taux d'hydratation du

SC, ce qui modifie sa perméabilité. Elle peut être amplifiée par la pression du jet d'eau utilisé lors du lavage, en provoquant une altération des couches supérieures du SC¹⁰⁸.

5.2. La décontamination à base de RSDL

Afin de limiter les effets de la décontamination à l'eau ou à l'eau savonneuse, d'autres méthodes ont été développées au cours des années. La lotion « Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) », est devenue une référence en matière de décontamination. Mise au point par le gouvernement canadien en 1991, elle est désormais utilisée à l'échelle internationale comme moyen de décontamination humide. Initialement, le RSDL a été distribué aux troupes canadiennes lors de la première guerre du Golfe en 1991. Par la suite, il a été approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) des États-Unis, par « Health Canada », par la « Australian Therapeutic Goods Administration » (TGA) et par « Israel Ministry of Health » pour élargir son application dans d'autres pays.

Sous forme d'une éponge en polyuréthane imbibée d'une lotion basique, le RSDL est composé de **(Figure 16)** :

- Dekon 139 composé de 2,3-butanedione monoxime de potassium (KBDO) permettant de dégrader les agents chimiques
- Solvant à base d'éther monométhylque de polyéthylèneglycol (MPEG 550) et d'eau (90%) lui conférant des propriétés permettant de déplacer, retenir et enlever les toxiques de la surface cutanée



Figure 16 - Kit RSDL et son mode d'application sur la peau

Le RSDL possède une composition chimique qui lui permet de dégrader plusieurs types d'agents chimiques de guerre. Son mode d'action repose sur des réactions de type substitution nucléophile entre les sites sensibles des agents chimiques et les composants du RSDL (KBDO), entraînant la formation de produits non toxiques¹⁰⁹. Cette dégradation limite

les signes de neurotoxicité résultant de l'inhibition de l'AChE (**Figure 17**). L'action du RSDL sur les agents de type POX provoque la coupure de la liaison P-O et conduit à la formation du 4-nitrophenol (PNT) détectable en UV à une longueur d'onde de 314 nm.

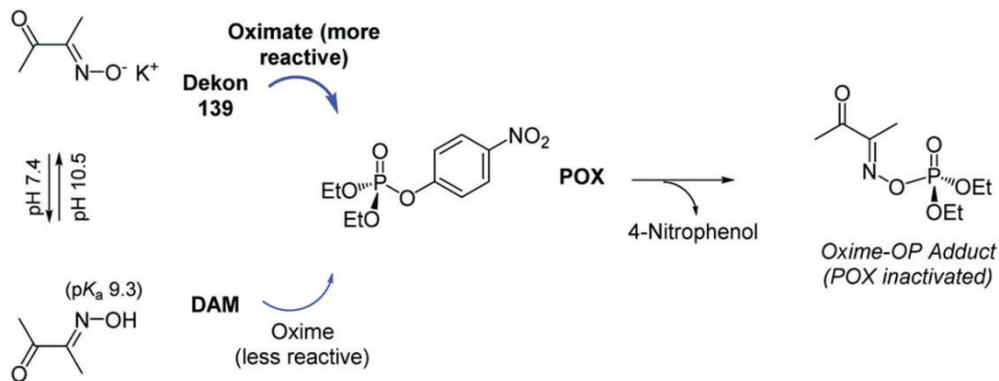


Figure 17 - Réaction de substitution nucléophile entre le POX et les produits composant le RSDL (Tank *et al.*, 2018).

Depuis son utilisation, le RSDL a été l'objet de nombreuses études qui ont permis de mettre en évidence son fort potentiel de décontamination. Une étude comparative publiée par A.M Feschuk *et al.*, a examiné l'efficacité du RSDL par rapport à d'autres méthodes de décontamination telles que la TF sous forme de poudre, une solution à 0.5 % d'hypochlorite et de l'eau savonneuse sur plusieurs agents chimiques de guerre et des simulants (

Tableau 13). Il existe 2 types de décontamination, la première dite urgente, qui intervient au bout de 5 min après la contamination, et la seconde dite approfondie qui intervient au bout de 30 minutes après la contamination par les agents chimiques. Les résultats des études sont donc dépendant du temps écoulé entre la contamination et la décontamination et de la méthode utilisée. Le protocole de décontamination, comme la quantité, la concentration, l'utilisation d'une éponge, peut influencer les résultats des études. Selon l'analyse de 17 publications examinées, 9 d'entre elles ont conclu que le RSDL était le décontaminant le plus efficace contre l'agent en question. Néanmoins, le RSDL n'a pas pu inactiver chimiquement l'agent fentanyl, pour lequel la décontamination à base d'eau savonneuse s'est montrée plus efficace¹¹¹. Il est important de noter que l'une des limites de la littérature sur la décontamination cutanée est le manque d'études chez l'humain pour imiter les composés toxiques. Les modifications structurelles de la peau et l'absence de flux sanguin peuvent avoir un impact sur la pénétration cutanée lors des études *in vitro*.

Étude	Toxique	Résultat
Taysse et al.	SM	Supérieure
Taysse et al.	VX	=
Taysse et al.	SM	Supérieure
Taysse et al.	VX	Inférieure
Bjarnason et al.	VX	Supérieure
Bazire et al.	VX	Supérieure
Braue Jr. et al.	GD	Supérieure
Braue Jr. et al.	VX	Supérieure
Josse et al.	VX	=
Rolland et al.	VX	Supérieure
Salerno et al.	POX	=
Cao et al.	DIMP	Inférieure
Cao et al.	CEES	Inférieure
Thors et al.	VX	Supérieure
Thors et al.	VX	Supérieure
Thors et al.	Fentanyl	Inférieure
Dachir et al.	VX	=

Tableau 13 - Récapitulatif des toxines utilisées et le résultat pour chaque article impliquant la comparaison quantitative entre le RSDL et d'autres méthodes (adaptée de A. M Feschuk *et al.*, 2022¹¹²). SM pour Sulfur mustard, VX pour Venomous Agent X, GD pour Soman, POX pour paroxon, DIMP pour diisopropyl methylphosphanate, CEES pour le 2-chloréthyl sulfide.

Bien que de nombreuses preuves soutiennent l'utilisation du RSDL comme agent de décontamination efficace contre les agents chimiques de guerre, il est important de reconnaître que les données disponibles peuvent présenter des limites et des lacunes. Ces limites, telles que son coût très élevé (60 € l'éponge) soulignent la nécessité de poursuivre les recherches dans ce domaine.

6. La décontamination sèche

La décontamination "sèche" est un terme général désignant les méthodes qui n'utilisent pas d'eau. Basées sur les propriétés adsorbantes des poudres, des farines ou des argiles, y compris la TF¹¹³, répandues sur une peau contaminée, elles peuvent adsorber les agents toxiques. Ces propriétés d'adsorptions sont en grande partie dues à leurs grandes surfaces et à leur sélectivité pour les molécules lipophiles¹¹⁴. Elle est aujourd'hui la référence en tant

qu'agent de décontamination sèche après une exposition aux agents chimiques en raison de son efficacité à déplacer et absorber le toxique chimique et de son faible coût. La TF est utilisée sous deux formes principales : en poudre libre, où elle est simplement répandue sur la peau contaminée, ou dans un gant poudreur à deux faces (l'une pour le dépôt de la TF et l'autre face pour la récupérer) (**Figure 18**).



Figure 18 - Gant poudreur contenant de la TF pour la décontamination cutanée face aux agents chimiques de guerre

A titre d'exemple, une étude de Chilcott *et al.*, a démontré qu'une décontamination sèche est aussi efficace voir généralement meilleure qu'une décontamination humide, face à une contamination aux agents neurotoxiques, des pesticides liquides, l'Ypérite et d'autres substances¹¹⁵. Cette méthode peut être préférée à la méthode humide pour de multiples raisons, notamment afin d'éviter l'hypothermie dans des conditions de températures extrêmes, et en raison de sa facilité pour récupérer les produits solides contaminés¹¹⁵.

Il y a néanmoins des considérations importantes à prendre en compte concernant l'utilisation de la poudre absorbante. Cette poudre est pulvérulente, ce qui signifie qu'en milieu clos, elle peut générer la formation de poussières toxiques dangereuses pour les voies respiratoires et favoriser la propagation de l'agent contaminant dans l'environnement. En comparaison au RSDL, la TF sous sa forme de poudre n'a pas de pouvoir de neutralisation vis-à-vis des agents chimiques, ce qui en fait un moins bon candidat. De plus, la TF sous forme libre n'est pas recommandée lorsque la peau est lésée (comme il est indiqué dans la fiche technique de l'ypérite du 17/05/2016 du ministère de la Défense préconisant l'emploi du gant poudreur aux abords de la plaie uniquement), celle-ci pouvant provoquer des nécroses cutanées au niveau des plaies et induire une toxicité supplémentaire.

7. Décontamination de peaux lésées et du cuir chevelu

7.1. Les peaux lésées

La rupture de la barrière cutanée lors d'une blessure expose le corps à une pénétration plus facile des substances, augmentant ainsi le risque d'accès direct au système sanguin. La décontamination des plaies est essentielle dans de telles situations, en utilisant des méthodes adaptées pour retirer les contaminants de manière efficace et sans altérer le processus de cicatrisation¹¹⁶. Actuellement, l'utilisation d'une solution saline physiologique est la seule conseillée, mais celle-ci n'est pas optimale pour les blessures de type hémorragique, qui sont souvent présentes sur le champ de combat¹¹⁷. En outre, les systèmes de décontamination actuels sont contre-indiqués pour une utilisation à l'intérieur des plaies. Le RSDL, qui fonctionne bien sur une peau saine, est déconseillé pour l'utilisation sur les plaies contaminées. Le produit entraîne des défauts de cicatrisation, une diminution de l'élasticité et une perte importante d'eau trans-épidermique, ce qui constitue son principal désavantage¹¹⁸. Il serait important à l'avenir de déterminer les éventuels effets toxiques du RSDL afin de déterminer son spectre d'applications. Par conséquent, un produit capable d'arrêter les saignements et de décontaminer les plaies ou la peau endommagée serait d'une grande utilité clinique.

Depuis, des traitements hémostatiques tels que le système WoundStat™ ont été développés par Dalton *et al.*, pour décontaminer la peau tout en réduisant les hémorragies. Composé de granule de smectite, ce système permet de réduire les hémorragies grâce à ses propriétés adsorbantes, son gonflement et ainsi que son adhésion au niveau des tissus (haute plasticité de la substance argileuse). L'absorption en eau permet de concentrer les facteurs de coagulation et les cellules sanguines sur les lieux. De plus, les granules chargées négativement peuvent activer la voie d'hémostase intrinsèque et accélérer le processus de coagulation du sang¹¹⁹. Plusieurs études ont été menées en utilisant le système WoundStat sur différents modèles de peau lésée et de contaminant, avec des résultats prometteurs pour diminuer la pénétration des agents à travers la peau *ex vivo* ou encore pour avoir un impact positif sur la survie des porcs, en limitant l'hémorragie et en facilitant la coagulation (**Tableau 14**). Cependant, le pansement hémostatique WoundStat™ présente également des inconvénients qu'il est essentiel de prendre en compte. Parmi ceux-ci figurent :

- La possibilité d'induire une inflammation locale lorsque tout le décontaminant n'est pas retiré de la plaie, qu'il est difficilement retirable nécessitant plusieurs lavages et qui persiste malgré tous les efforts
- Son pouvoir activateur des voies de coagulation peut provoquer des lésions endothéliales et une dissémination du caillot, entraînant une thrombose¹²⁰

Des résultats *ex vivo* prometteurs utilisant des nanoemulsions chargées en agents chélateurs spécifiques de l'uranium tels que le Calixarene développés par Grives *et al.*, montrent qu'elles sont capables de décontaminer jusqu'à 94% l'uranium sur des peaux lésées¹²¹. Parmi ces modèles de plaies superficielles, trois techniques ont été utilisées sur des explants de peau d'origine porcine : (1) une lésion imitant une piqûre superficielle par l'utilisation de micro-aiguilles de 0,7 mm de longueur, (2) une incision induite par le système Surgicutt^R pour imiter une coupure superficielle à l'aide d'une lame de 1 mm et (3) une technique utilisant l'excoriation pour enlever la couche cornée pour imiter une égratignure superficielle. Ces nanoemulsions peuvent constituer une bonne alternative pour la décontamination de la peau saine ou blessée superficiellement, surtout qu'elles n'induisent pas d'irritation cutanée.

Malgré les efforts actuels pour le développement de telles méthodes pour les peaux lésées, aucune d'entre elles n'est applicable chez l'humain. Ceci souligne donc le besoin de développer de nouvelles méthodes de décontamination répondant à tous les critères de biocompatibilité.

Auteurs	Model d'étude	Décontamination	Méthode de décontamination	Temps écoulé entre l'exposition et la décontamination	Contaminants testés	Conclusions
<u>Lydon et al., 2017</u> ¹²²	<i>In vitro</i> peau d'origine porcine lésée (100µm supérieurs de l'épiderme retiré)	Système WoundStat	Application simple sur la surface cutanée	30 secondes (200 mg)	GD, VX et HD	Décontamination équivalente à celle de la TF sous forme de poudre
<u>Dalton et al., 2017</u> ⁴⁴	<i>In vivo</i> modèle porcin (100µm supérieurs de l'épiderme retiré)	Système WoundStat	Application simple sur la surface cutanée	30 secondes (200 mg)	GD	Signe d'intoxication + mortalité. Séquestration 70% du GD avec diminution jusqu'à 10% du taux de l'ACHé 15 minutes post traitement
<u>Crosera et al., 2018</u> ¹²³	<i>In vitro</i> peau d'origine humaine endommagée (par abrasion)	Laureth-sulfate de sodium	Application simple sur la surface cutanée	15 minutes	Palladium (Pd)	Décontamination précoce réduit la perméation du métal

<u>Mauro et al., 2019</u> ¹²⁴	<i>In vitro</i> peau d'origine humaine endommagée (par abrasion)	Nanoparticules de Cérium Oxyde	-	-	-	Absorption plus importante du cérium au sein de la peau lésée
<u>Grives et al., 2015</u> ¹²¹	<i>Ex vivo</i> peau d'origine porcine lésée (piqûres, coupures superficielles et excoriation)	Calixarene-Loaded Nanoemulsion comparé à l'eau savonneuse	Application simple sur la surface cutanée	Immédiatement post contamination	Uranium	Décontamination allant jusqu'à 94 % sans effet secondaires des nanoémulsions
<u>Hall et al., 2017</u> ¹¹⁶	<i>In vivo</i> modèle porcin endommagé (plaie superficielle non hémorragiques)	Système WoundStat	Application simple sur la surface cutanée	30 secondes post contamination et laissé pendant 1 heure	Ypérite	Empêche l'ulcération dû à l'ypérite et améliore le flux sanguin au site d'exposition. Moins de contaminant dans le sang (réduction de 45%) et beaucoup plus récupéré à la surface de la peau.
<u>Mannis et al., 2015</u> ¹¹⁷	<i>Ex vivo</i> modèle porcin avec Incision lisse, coupure	1) Spray nettoyant de plaie non ionique	Spray sur la peau pour 1) et 2) : 8 psi	15 minutes post contamination	Co-chloride (CoCl)	Spray nettoyant et de solution saline plus

	irrégulière et traumatisme via un objet contondant	2) Spray de solution saline physiologique 3) Solution saline physiologique	Versement sur la peau pour 3)		efficace que la solution saline versée sur la peau
--	--	---	-------------------------------	--	--

Tableau 14 - Résumé des publications sur les différentes méthodes de décontamination des peaux lésées publiées jusqu'à ce jour

7.3. Le cuir chevelu

Les cheveux et le cuir chevelu sont des zones du corps relativement peu protégé qui peuvent être facilement exposés lors d'un incident chimique. Les contaminants peuvent se fixer et s'accumuler facilement au niveau des cheveux¹²⁵, bien que ceux-ci constituent une barrière pour le cuir chevelu¹¹⁴. Il est recommandé en première instance d'effectuer une décontamination complète par un shampoing et une douche⁴⁵. Il convient de noter que la décontamination du cuir chevelu est peu documentée dans la littérature scientifique. Des études *in vitro* ont montré que l'utilisation de l'eau suite à une exposition au VX, au MeS et au CEES n'est pas satisfaisante. En revanche, La décontamination à la TF sous forme de poudre et du RSDL en amont du lavage à l'eau réduit considérablement la quantité des agents dans les cheveux, avec des taux de réduction allant jusqu'à 27 % et 50 %, respectivement¹¹⁴⁻¹²⁶⁻¹²⁷. La valeur ajoutée de la TF ou du RSDL avant la douche a été calculée et montre en d'autres termes que, pour la décontamination des cheveux par le VX, l'utilisation de la TF ou du RSDL avant la douche présente un avantage certain (**Tableau 15**). L'efficacité du RSDL peut être expliquée par son pH basique qui entraîne la détérioration de la structure des cheveux et une perte des molécules absorbées, avec toutefois un risque d'irritation cutanée due à son pH élevé¹²⁸. Néanmoins, Spiandore *et al.*, ont mis en évidence une désorption du contaminant assez rapidement dans l'environnement, qui constitue un risque permanent pour les victimes contaminées, les secouristes et le personnel d'intervention¹²⁵⁻¹²⁹.

	VX (%Q0) extracted from hair	DE	DF	Added value of FE or RSDL
CTRL	97 ± 16 (17)			
SHOWER (a)	27 ± 20 (12)	72%	3.5	
SHOWER DET (b)	17 ± 15 (12)	82%	5.6	
FE + SHOWER (c)	2 ± 2 (7)	98%	41.3	11.7 (c/a)
FE + SHOWER DET (d)	5 ± 7 (7)	95%	19.7	3.5 (d/b)
RSDL + SHOWER (e)	9 ± 6 (7)	90%	10.5	3.0 (e/a)
RSDL + SHOWER DET (f)	4 ± 5 (7)	96%	23.3	4.2 (f/b)

Tableau 15 - Efficacité des procédures de décontamination sur des cheveux. La quantité de VX extraite des cheveux à la fin de l'exposition (CTRL) ou après décontamination selon les procédures (a) à (f). DE et DF signifie efficacité et facteur de décontamination, respectivement. La valeur ajoutée de la TF ou du RSDL par rapport à la douche a été calculée à partir du ratio de DF (d'après D. Josse *et al.*, 2015128).

Bien que le domaine de la décontamination des cheveux soit relativement peu exploré dans la recherche scientifique, les méthodes actuelles telles que le RSDL et la TF montrent des résultats encourageants. Constituant un site de fixation de ces agents chimiques de guerre, le

cheveu ainsi que le cuir chevelu représentent un point important de réflexion lors de développements de nouvelles méthodes de décontamination.

8. La décontamination des surfaces

Les surfaces contaminées peuvent présenter un risque de propagation des agents toxiques à d'autres personnes, et favoriser sa dispersion, ce qui peut augmenter le risque d'exposition et de contamination. Une décontamination rapide et efficace des surfaces est essentielle pour éviter les risques pour l'environnement et la faune locale et donc éviter des dommages écologiques importants. Pour cela, quelques méthodes de décontamination existent en fonction du type d'agent toxique et du matériau contaminée. Il convient de faire preuve de prudence lors de l'utilisation de certaines méthodes, car elles peuvent impliquer l'utilisation de produits agressifs pour l'environnement et les matériaux. Toutefois leur usage est proscrit sur des surfaces plus sensibles. L'utilisation d'eau et de détergent, comme que du savon dans des pulvérisateurs portables ou des nettoyeurs à haute pression est une méthode efficace pour nettoyer et décontaminer rapidement les surfaces et les équipements. Cette approche est particulièrement adaptée aux équipements solides et résistants aux produits chimiques et corrosifs. Dans l'armée française, plusieurs systèmes de décontamination sont en dotation, tels que les solutions SDCM F1, F2 ou encore F3 (véhicules et armement de bord pour le F1 ; petits matériels, tenues de décontamination, véhicules légers pour les F2 et F3), spécifiquement conçues pour décontaminer différentes surfaces (**Figure 19**). Ces systèmes se présentent sous forme de bidons pulvérisateurs de 2,5 L et permettent de neutraliser, de façon polyvalente, les agents toxiques, notamment les organophosphorés et l'ypérite, offrant ainsi une protection maximale à la population.



Figure 19 - Appareil de décontamination chimique de 2.5 L à recharge F1 (D'après « Les matériels et équipements de défense N.B.C – TTA 601 bis)

D'autres produits existent comme le DeconGel, créé en 2011 par la société « CBI Polymers » aux États-Unis, qui est utilisé pour décontaminer plusieurs types de surface. Conçu sous forme de gel, il est appliqué sur diverses surfaces solides telles que le béton, l'acier, les plastiques, le bois et de nombreuses autres surfaces solides en cas d'accident nucléaire ou chimique (**Figure 20**). Il peut cependant provoquer une corrosion de certains métaux à cause de sa capacité à se lier aux métaux lourds. L'efficacité de ce gel a été prouvée sur la plupart des isotopes radioactifs, mais également pour un large éventail de produits chimiques et matériaux industriels toxiques. Son efficacité a été prouvée dans des situations d'urgence, y compris lors de l'accident nucléaire de Fukushima. Cependant, l'inconvénient du DeconGel est que son temps de séchage est relativement long, qui peut atteindre 24 heures en fonction de l'épaisseur de la couche appliquée, de la température ambiante et de l'humidité. De plus, il ne permet pas la neutralisation des agents NRBC, mais uniquement l'encapsulation des agents toxiques. Une fois sec, le gel contaminé doit être éliminé conformément aux réglementations en vigueur.



Figure 20 - Système de décontamination DeconGel (d'après le site marchand DeconGEL)

Pour la décontamination des petites surfaces et les équipements sensibles (contenant de l'électronique ou des matériaux fragiles comme les appareils de détection et de mesure) ne pouvant pas résister aux produits chimiques corrosifs, des systèmes sous vide peuvent être utilisés, mais leur inconvénient majeur est la difficulté de mise en place ainsi que leur coût très élevé. La décontamination de ce type de surface reste un enjeu majeur dans la gestion du risque NRBC. Il existe ainsi un grand intérêt à développer des méthodes alternatives permettant de décontaminer (déplacer, absorber et neutraliser) efficacement les toxiques sans détériorer le matériel, car aucune ne semble pleinement satisfaisante à l'heure actuelle.

Au cours de ce chapitre, les différentes notions de décontaminations ont pu être abordées permettant d'élucider les différents moyens existants à ce jour. La peau constitue en elle-même une voie d'entrée pour les agents chimiques de guerre, d'où l'importance de se focaliser sur les méthodes permettant de limiter leur absorption cutanée. Parmi celles-ci, la TF sous forme de poudre et le RSDL constituent le gold standard actuel. Le coût du RSDL (60€ l'éponge), l'impossibilité de l'utiliser sur tout le corps ainsi que sur une peau endommagée présentent les inconvénients majeurs de cette méthode. En parallèle, la TF entraîne la formation de poussières re-contaminantes impliquant une attention particulière à son utilisation sur le terrain.

En considérant ces diverses contraintes, il devient impératif de concentrer nos efforts sur ces problématiques afin de concevoir de nouvelles stratégies de décontamination face aux COPs. La réflexion se portera particulièrement sur des critères tels que : sa facilité d'utilisation (quelle que soit la surface à décontaminer), la minimisation des risques de recontamination en se portant notamment sur les pouvoirs d'adsorption et la gestion du contaminant par un outil adapté à la séquestration et/ou la dégradation du COP. Le but serait de pouvoir proposer cet outil de décontamination à moindre coût afin de les rendre accessibles à un large public.

Le prochain chapitre de ce manuscrit permettra de mettre en lumière le potentiel de certains outils pour l'élaboration de nouvelles méthodes de décontamination.

Chapitre 3 : Développement d'un nouvel outil de décontamination

Malgré leurs désavantages, les méthodes actuelles de décontamination demeurent les seules solutions envisageables en cas d'incidents induits par des NOPs. Comme synthétisé dans le chapitre précédent, le développement de nouvelles méthodes innovantes fait l'objet de nombreuses recherches qui visent à élaborer de nouvelles stratégies novatrices afin de combler les lacunes inhérentes aux procédés existants.

Au cours de ce chapitre, nous identifierons les thèmes les plus pertinents pour le développement de nouvelles méthodes de décontamination. Nous aborderons dans un premier temps les phyllosilicates en tant qu'outils potentiels permettant leur utilisation en tant que composant de décontamination. Ensuite, nous expliquerons notre choix concernant la forme galénique du biomatériau sélectionné pour la décontamination.

1. Utilisation des phyllosilicates pour la décontamination

1.1. Structure des phyllosilicates

Selon le Joint Nomenclature Committee (JNC) et la «Nomenclature Committee of International Association for the Study of Clays» (AIPEA) et la Clay Minerals Society, le terme « argile » se réfère à des matériaux naturels principalement constitués de minéraux à granulométrie fine, des poudres essentiellement, possédant des propriétés plastiques quand ils contiennent suffisamment d'eau, ou au contraire devenant durs lorsqu'ils sont séchés. Les argiles qui se présentent sous forme de feuillets de silicates, sont souvent assimilées aux composés phyllosilicates. Les argiles sont largement répandues à la surface de la planète, jouant un rôle central en tant que composants dominants des sols, particulièrement dans les zones climatiques favorables à la décomposition des minéraux. Ces minéraux se forment principalement au sein des couches superficielles de la croûte terrestre, résultant en grande partie de l'altération des roches ignées. Ces phyllosilicates, abondants et facilement accessibles, ont toujours été des ressources privilégiées. Parmi eux, les phyllosilicates hydratés caractérisés par leur taille très réduite ($< 2 \mu\text{m}$) et leur structure cristalline unique, ont été utilisés depuis les premiers stades de l'Histoire humaine pour la construction, la poterie et la fabrication de briques.

La structure des argiles est constituée de feuilles de phyllosilicates qui s'organisent en couches stratifiées. Chaque couche est formée par un empilement de feuilles tétraédriques et octaédriques, qui forment l'armature de tous les minéraux argileux^{130,131}. L'agencement de

ces couches peut aboutir à la formation d'agrégats visibles à l'échelle macroscopique^{132,133}. Cette formation d'agrégats met en évidence la présence d'espaces inter-particulaires et inter-agrégats (**Figure 21**). Le feuillet « T » est constitué de cations liés à quatre atomes d'oxygène et reliés aux tétraèdres adjacents par le partage de trois sommets, formant ainsi une maille hexagonale bidimensionnelle. Les cations présents dans les tétraèdres sont généralement des ions Si^{4+} , Al^{3+} et le Fe^{3+} . D'autre part, le feuillet octaédrique « O », est composé de six atomes d'oxygène étroitement liés les uns aux autres, accompagnés d'ions hydroxyles dans lesquels les cations sont disposés de manière à former une coordination octaédrique par une arête de partage. Les cations typiques dans les octaèdres sont l' Al^{3+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} ou Fe^{2+} . Les feuillets de phyllosilicates sont interconnectés en partageant l'atome d'oxygène apical ou des hydroxyles, ce qui résulte en un réseau hexagonal. Chaque feuillet possède une structure fondamentale propre dans ce réseau¹³⁴.

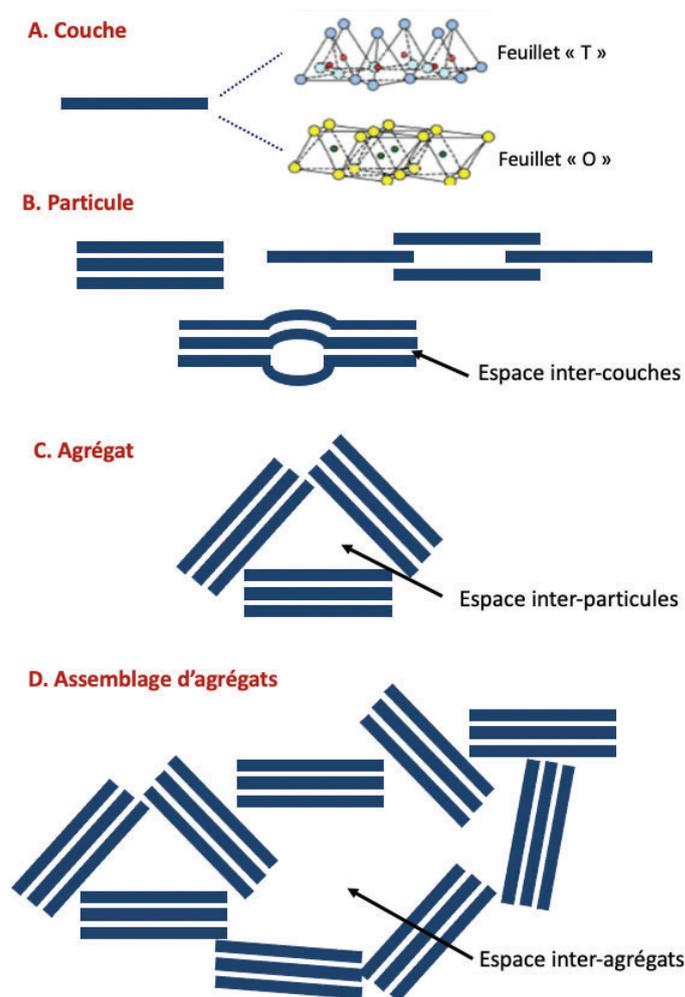


Figure 21 - Différentes forme des argiles – A) Couches qui sont constituée par des feuillets T et O, B) Empilement de multiples couches, conduisant à la formation de particules, C) Agencement de multiples particules pour former un agrégat, mettant en évidence des espaces inter-particules, D) Assemblage d'agrégats créant des espaces inter-agrégats (d'après Bergaya *et al.*, 2006¹³²)

On distingue 3 groupes d'argiles selon la classification de l'AIPEA (**Figure 22**):

Type 1:1 : constitué d'une feuille de tétraèdres SiO_4 reliée à une feuille d'octaèdres d'aluminium ou de magnésium, avec une charge proche de zéro au niveau des couches. Parmi les représentants figurent la kaolinite, la dickite et l'hallocite. Le kaolin, en raison de ses liaisons fortes Al-OH et O-Si-OH ainsi que des interactions dipôle-dipôle et de Van der Waals, présente une absence de couches intermédiaires et une absence d'expansion entre les couches en présence d'eau¹³⁵.

Type 2:1 : Dans ce groupe, une feuille de tétraèdres de SiO_4 est reliée à une feuille d'octaèdres d'aluminium ou de magnésium avec une épaisseur de 1 nm lorsqu'elle est fermée. Les minéraux tels que la smectite, la montmorillonite, la saponite, la nontrite et la beidellite appartiennent à ce groupe. Ces argiles présentent une densité de charge, une surface et une capacité de gonflement plus élevées. La capacité de gonflement résulte de la structure qui permet à l'eau de pénétrer les couches intermédiaires de surface malgré les forces électrostatiques et de van der Waals qui maintiennent les couches ensemble. Cette pénétration entraîne l'hydroxylation des atomes d'aluminium et de silicium en aluminol (AlOH) et silanol (SiOH), provoquant ainsi une expansion¹³³.

Type 2:1:1 : Ce groupe est caractérisé par une structure de base en 2:1 avec une feuille intercalaire de brucite (avec des cations Mg^{2+} ou Fe^{2+}) ou de gibbsite (cation Al^{3+}). Les chlorites sont des exemples de ce type de phyllosilicate. Ils ne présentent pas d'absorption d'eau dans l'espace intercalaire et sont considérés comme non expansifs¹³⁶.

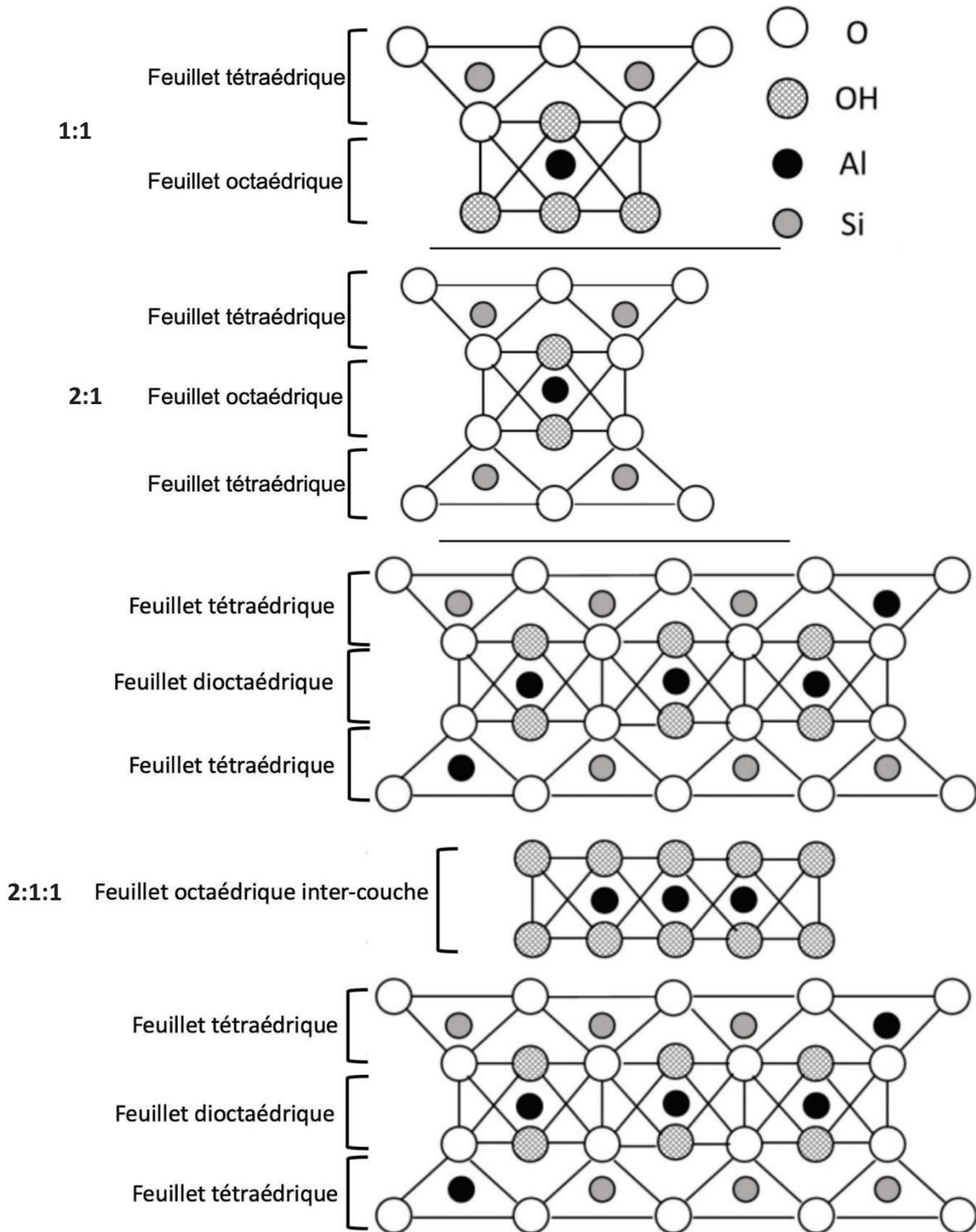


Figure 22 - Structures des différents types de phyllosilicates – Types 1:1, 1:2 et 2:1 1 (d'après Nadziakiewcza *et al.*, 2019¹³⁷ – O pour le groupe oxygène, OH pour le groupe hydroxyle, Al pour l'aluminium et Si pour le silicium)

Certaines argiles, telles que la sépiolite et la palygorskite, se distinguent par l'absence de feuillets O continus. Leur structure de base est similaire à celles des argiles de types 2:1, mais elles se présentent sous forme de rubans reliés entre eux par une inversion des tétraèdres SiO_4 ¹³⁸. Cette inversion des feuillets T confère à cette famille une apparence fibreuse en créant des canaux structuraux parallèles, formant ainsi une structure en ruban (**Figure 23**). En raison d'une plus grande densité de groupes silanols couvrant la surface externe, les argiles fibreuses peuvent avoir de meilleures performances telles que leur pouvoir d'adsorption dû à leur grande surface spécifique¹³⁹. La palygorskite, également connue sous le nom d'attapulgite, partage une architecture similaire à la sépiolite, mais les dimensions des canaux peuvent varier, avec une largeur plus importante pour la sépiolite. La longueur de ces fibres peut ainsi varier de 1 à 2 μm et différer selon le gisement naturel dont elles proviennent¹⁴⁰.

Le terme "terre de foulon" est employé pour désigner à la fois la palygorskite et les argiles smectiques qui présentent une teinte jaune et une granulométrie fine. Ces matériaux sont utilisés pour le blanchiment des huiles et comme adsorbants. Il correspond au phyllosilicate le plus fréquemment utilisé à des fins de décontamination cutanée en cas d'une attaque chimique et est devenu un outil essentiel pour les forces armées dans la gestion de ses conséquences^{141,142}.

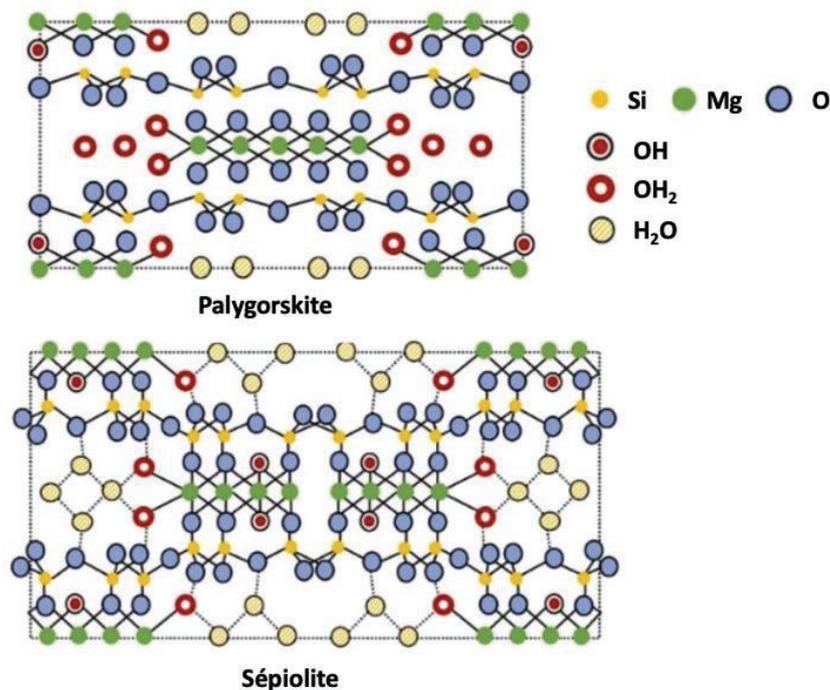


Figure 23 - Structures des différents types de phyllosilicates – Les argiles fibreuses (d'après Galan *et al.*, 1996¹³⁸ – exemple de la palygorskite et de la Sépiolite)

L'absorption est liée à la pénétration de molécules dans un liquide/solide absorbant, ce qui implique un contact entre les deux. Les produits tels que les serviettes et le coton sont des absorbants.

Tandis que **l'adsorption** se caractérise par des interactions de molécules avec la surface du solide sans pénétration à l'aide de forces attractives faibles et peu spécifiques. Les phyllosilicates sont des adsorbants.

1.2. Propriétés des phyllosilicates

Les différences de structures au sein des phyllosilicates leur confèrent des propriétés variées :

- Physique : Au niveau de la distribution des charges négatives et positives sur les surfaces et le type de liaison entre les atomes et les molécules
- Chimique : au niveau des atomes associés, le type d'ions et leur échangeabilité

1.2.1. Surface spécifique des phyllosilicates

L'une des propriétés fondamentales des minéraux argileux réside dans leur surface spécifique. Cette caractéristique permet aux minéraux argileux d'adsorber l'eau, des molécules organiques telles que le glycérol ou l'éthylène, ainsi que d'autres polluants environnementaux¹⁴³. En général, deux types de surfaces spécifiques sont distinguées : la surface externe, qui correspond à celle entre les particules, et la surface interne, qui se situe entre les couches. La somme de ces deux surfaces spécifiques définit la surface spécifique totale, exprimée en mètres carrés par gramme (m^2/g). La surface spécifique de chaque type d'argile met en évidence ses propriétés d'adsorption. En d'autres termes, une surface spécifique étendue s'accompagne de capacités d'adsorption renforcées. Les minéraux argileux de type 2:1, tels que la smectite et la vermiculite possèdent une surface spécifique plus élevée que les minéraux argileux de type 1:1 en raison de leur capacité à gonfler¹⁴⁴.

Plusieurs auteurs ont indiqué que la surface spécifique totale des argiles minérales peut être augmentée par des modifications visant à améliorer leurs fonctionnalités dans divers domaines d'application. Hua *et al.*, en 2015 ont rapporté une augmentation de la surface de la bentonite-Na, passant de 34,1 à 77,2 m^2/g après une modification avec des oxydes de Mn¹⁴⁵. Cette augmentation de la surface spécifique peut être attribuée au gonflement de l'argile bentonitique durant sa modification. De même, Mishra et Paride., ont

également rapporté une augmentation de la surface spécifique de la bentonite recouverte d'oxydes de manganèse à une température de 500°C¹⁴⁶. Cette augmentation est attribuée à la décomposition de l'oxyde de manganèse dans la bentonite sous l'effet de la température, créant ainsi des micropores vides à l'intérieur. Les argiles fibreuses, quant à elles, se caractérisent par leur surface spécifique remarquable. Ces propriétés permettent à ces argiles fibreuses de former des liaisons hydrogène et de s'associer avec des matrices de polymère. Cette caractéristique les rend potentiellement plus résistantes, et les rend utiles dans les formulations médicamenteuses¹⁴⁷.

1.2.2. Capacités d'échange de cations (CEC)

L'une des autres propriétés importantes des minéraux argileux réside dans leur capacité à contenir des cations échangeables, qui peuvent être substitués par n'importe quel cation en vue d'équilibrer la charge électrique. Les cations échangeables sont maintenus à l'extérieur des unités structurales des minéraux argileux, et ces échanges n'affectent pas la configuration des unités silice-alumine¹⁴⁷. Le phénomène de capacité d'échange de cations est mesuré en milliéquivalents par gramme ou par 100 g, et elle reste constante indépendamment du degré d'hydratation de l'argile. Parmi les cations couramment utilisés pour évaluer cette capacité d'échange de cations, on retrouve Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , H^+ et NH_4^+ . Les différents minéraux argileux présentent une capacité cationique différente en fonction de la substitution au sein de la structure du réseau¹⁴⁷. Par exemple, les minéraux argileux de type 1:1, comme la kaolinite, présentent une substitution limitée dans leur réseau par rapport aux minéraux argileux de type 2:1, tels que la smectite, la vermiculite et la sépiolite. De ce fait, les premiers affichent une capacité d'échange de cations plus faible¹⁴⁸. Celle-ci peut être altérée par des modifications induites par des espèces inorganiques¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

1.2.3. Gonflements des argiles

Cette caractéristique est généralement attribuée aux argiles smectiques, également connues sous le nom « d'argiles gonflantes », qui ont la caractéristique de gonfler en présence d'eau. La capacité à absorber une grande quantité d'eau est attribuée à deux facteurs majeurs : premièrement, la grande surface spécifique qui offre un grand nombre de sites de fixation pour des cations hydrophiles ; deuxièmement, la flexibilité des feuillets qui crée des espaces poreux au sein des feuilles, des particules et des agrégats (**Tableau 16**)^{152,153}.

Lorsqu'une poudre d'argile smectique sèche entre en contact avec de l'eau, trois étapes de gonflement successives ont lieu :

1) Au premier contact avec l'eau, les molécules d'eau pénètrent dans l'espace intercalaire, hydratant les cations par le biais d'une liaison cation-dipôle. Les molécules d'eau sont

également adsorbées à la surface des feuilles, formant ainsi successivement une première, une deuxième, puis une troisième pseudo-couche d'eau adsorbée. Cette adsorption contribue à définir les distances inter-couches. A mesure que la quantité d'eau augmente, un processus de gonflement osmotique se produit, provoquant une séparation des particules et entraînant ainsi une augmentation de la distance entre les couches. Cette zone entre les deux couches est désignée comme la zone de "transition osmotique".

2) La deuxième étape concerne la formation de la pâte argileuse, caractérisée par une augmentation constante de la distance entre les couches à mesure que la quantité d'eau augmente.

3) La troisième étape du gonflement survient lorsque la pâte d'argile évolue du stade de "gel rigide" à celui de "gel mou". En revanche, lorsque le "gel mou" se transforme en une suspension, il ne s'agit plus du processus de gonflement, mais plutôt d'une transition dite « Sol-gel ». Cette dernière est un aspect important à prendre en compte dans l'étude et les différentes applications de l'argile¹⁵⁴.

Les propriétés physico-chimiques des différents types d'argiles sont indiquées dans le **Tableau 16**.

Phyllosilicates	CEC (meq/100 g par argile calciné)	Surface interne (m ² /g)	Surface externe (m ² /g)	Surface spécifique totale (m ² /g)	Gonflement
Kaolinite	5-15	0	10-30	10-30	+
Illite	10-40	20-55	80-120	100-175	
Smectites	80-150	600-700	80	700-800	
Vermiculite	100-150	700	40-70	760	
Chlorite	10-40	-	100-175	100-175	
Sépiolite	10-45	-	-	150-900	-
Palygorskite	5-30	-	-	150-900	

Tableau 16 - Comparaison de la CEC, de la surface spécifique et du gonflement de différents phyllosilicates (types 1:1, 2:1, 2:1:1 et les argiles fibreuses) – « + » pour les argiles possédant des propriétés de gonflement et « - » pour ceux qui ne gonflent pas^{132,155-157}.

1.3. Domaines d'utilisation des phyllosilicates

1.3.1. Détoxifiants

Les phyllosilicates jouent un rôle prépondérant en tant que détoxifiant en raison de leur aptitude à se lier et à neutraliser divers contaminants environnementaux. Parmi ces phyllosilicates, la montmorillonite, membre du groupe des smectites, se distingue par sa structure poreuse stable, sa grande capacité d'expansion, sa surface spécifique et ses capacités d'échanges de cations bien équilibrées, ce qui la rend utile en tant que détoxifiant. Leur capacité d'adsorption leur permet d'interagir fortement avec les herbicides tels que le glyphosate et l'acide aminométhylphosphonique, facilitant ainsi l'élimination de ces substances. Par ailleurs, l'idée d'une détoxification adaptative de l'organisme par le biais de la géophagie est étayée par des données historiques et de terrain liant la consommation d'argile à cette fonction. Des expérimentations *in vitro* ont mis en évidence l'efficacité de quatre types d'argiles comestibles dans l'adsorption du glycoalcaloïde et de la tomatine, en conditions de simulation gastro-intestinale. Ceci suggère que la pratique de la géophagie pourrait constituer une réponse face aux impasses engendrées par les intoxications chimiques.

Initialement, les phyllosilicates ont été utilisés dans le traitement et la décontamination des eaux usées polluées par divers contaminants, notamment les pesticides organochlorés, via des interactions hydrophobes et des interactions charge-dipôle¹⁵⁸. Leur coût abordable et leur grande disponibilité en font des agents de choix pour le traitement des eaux. Des études ont confirmé l'efficacité de la bentonite en tant qu'agent détoxifiant, attribuée à sa polyvalence cationique qui lui permet d'adsorber les toxines à charge négative comme la mycotoxine T2 produit par les champignons¹⁵⁹. Des essais sur des rats ayant ingéré de la bentonite durant deux semaines ont montré des signes positifs de guérison, illustrant ainsi l'effet curatif de la bentonite contre la toxine T2.

Actuellement, des études réalisées tant chez l'animal que chez les humains, ont confirmé l'innocuité de la bentonite alimentaire¹⁶⁰. De plus, elle n'affecte pas les concentrations sériques de vitamines essentielles et de minéraux nutritifs chez l'humain, ce qui la positionne comme un adsorbant potentiel pour atténuer les effets des toxines sur l'organisme.

1.3.2. Agent texturant

Les phyllosilicates sont fréquemment employés dans des compositions en tant qu'agent épaississant pour induire la gélification ou pour assurer la stabilisation par le biais de leurs propriétés rhéologiques. Leur présence est courante dans divers produits tels que les peintures, les adhésifs, les produits d'étanchéité ainsi que les suspensions d'engrais.¹⁶¹

1.3.3. Produit dermatologique et cosmétique

Les applications les plus courantes de l'argile en dermatologie se concentrent sur le traitement de l'acné et l'incorporation dans des préparations thermales ou cosmétiques. Les propriétés d'adsorption ont été exploitées dans diverses formulations cosmétiques et pharmaceutiques. Traditionnellement, les minéraux argileux subissent une hydratation pour former des matrices gélifiées ou pâteuses pouvant être appliquées topiquement à des fins cosmétiques ou de protection cutanée¹⁶². Les capacités d'adsorptions élevées, la capacité d'échange de cations, ainsi que la taille extrêmement fine des particules de certaines argiles, telles que les smectites et le kaolin, expliquent leur utilisation pour éliminer le sébum, les sécrétions, les toxines et les contaminants de la peau. Les phyllosilicates jouent également un rôle dans la purification de la surface cutanée, favorisant la cicatrisation des imperfections et agissant comme barrière protectrice contre les facteurs environnementaux agressifs extérieurs. Par conséquent, leur emploi est recommandé pour limiter les processus inflammatoires tels que les furoncles, l'acné, les ulcères. De plus, ils sont également incorporés dans des formulations telles que des crèmes, poudres et émulsions pour leurs propriétés anti-transpirantes et leur capacité à conférer l'opacité à la peau.

1.4. Des suspensions de Terre de Foulon pour la décontamination cutanée

Comme décrit dans les sections 1.1 et 2, les phyllosilicates tels que la TF possède des propriétés d'adsorption qui les rendent utiles pour la décontamination cutanée contre les agents chimiques de guerre. Cependant, certaines limites entravent leur utilisation dans des conditions optimales. A partir de ces données, une nouvelle forme galénique peut être proposée à l'utilisation pour les militaires. Dans cette optique, les travaux menés par Roul *et al.*, ainsi que par Danoy *et al.*, ont consisté à développer une nouvelle formulation galénique sous forme de suspension aqueuse de TF, combinant les avantages de la décontamination sèche et humide^{60,113}. La capacité d'adsorption de la TF a d'abord été évaluée sur des solutions aqueuses de 4-cyanophénol (simulant du VX) afin de déterminer l'efficacité de décontamination (DE) *in vitro* d'une suspension aqueuse de 10g de poudre de TF dispersés dans 100 ml d'eau sur de la peau d'oreille de cochon. La suspension aqueuse de TF présentait une DE plus élevée que la poudre de TF libre et l'eau (88.1 % d'efficacité de décontamination contre 71 % pour la TF sous forme de poudre et 53,6 % pour l'eau) (Tableau 17).

En se basant sur les travaux réalisés par Roul *et al.*, Danoy *et al.*, ont formulé différentes suspensions aqueuses avec des concentrations variables en TF : 5 %, 9.1 % et 15 %. L'objectif était toujours de déterminer les avantages de l'usage des suspensions par rapport à la poudre de TF pour la décontamination du POX, et observer un éventuel potentiel décontaminant de la concentration des suspensions (**Tableau 17**). Les résultats ont montré que la DE est plus

faible lorsque les argiles sont utilisées sous forme de poudre. En revanche, lors de la décontamination humide avec les suspensions de TF, la DE est homogène, quelle que soit la concentration des suspensions. La mise en suspension de la TF permet d'accroître la DE de cette dernière d'un facteur 1,2 par rapport à la poudre libre. Cette observation est renforcée par le calcul du facteur d'amélioration du pronostic fonctionnel (FP), qui évalue la capacité du décontaminant à capturer le contaminant à la surface de la peau. En effet, le FP était significativement augmenté lorsque la décontamination est assurée par les suspensions de TF par rapport à l'usage de la poudre⁶⁰ (**Tableau 17**).

La même étude a également permis de démontrer que les surnageants des suspensions de TF (toutes concentrations comprises) n'induisent pas de toxicité *in vivo* chez le poisson-zèbre et *in vitro* sur des cultures de fibroblastes primaires d'origine humaine. Cependant, il est apparu que ces suspensions ne pouvaient pas être utilisées pour la décontamination des peaux lésées, ni pour la décontamination de surfaces. Cette limitation découle de la forme physique de la suspension, qui rend difficile la gestion des déchets contaminés dans de tels scénarios d'utilisation.

Modèle d'étude	Explant de peau d'origine porcine					Explant de peau d'origine porcine			Explant de peau d'origine humaine			
Contaminant	4-cyanophénol					POX						
Décontaminant	Eau déminéralisée	TF poudre libre	TF sur une surface adhésive	TF chargé sur la face palmaire d'un gant	10 g de TF dans 100 ml d'eau	Eau	TF poudre libre	Suspension de TF à 5 - 9.1 et 15 %	Eau	TF poudre libre	Suspension de TF à 5 - 9.1 et 15 %	
Dose de décontaminant	23 ml/cm ² min ⁻¹	0,15 g/cm ²	0,03 g/cm ²	0,02 g/cm ²	0,65 g/cm ²	102 µl/cm ²	0,16 g/cm ²	102 µl/cm ²	102 µl/cm ²	0,16 g/cm ²	102 µl/cm ²	
Méthode de décontamination	Lavage sous forme de jet	Recouvrement total de la surface avec les différentes méthodes de décontamination					Recouvrement total de la surface avec les différentes méthodes de décontamination					
Temps	15 s	1 min	15 s	30 s	1 min	2 min						
DE (%)	53,6 ± 10,2	71,3 ± 20,3	72 ± 14,3	60,8 ± 22,1	88,1 ± 8,3	87,11	75,81	91,04	96,55	85,32	96,36	
FP			-			48,71	23,18	53,19	25,10	4,86	22,33	
								53,10			28,84	
								71,5			31,6	

Tableau 17 - Évaluation de différentes suspensions de TF comme méthode de décontamination sur des explants de peau d'origine humaine et porcine avec 2 simulants du VX : le POX et le 4-cyanophénol.

2. Élaboration de méthode de décontamination innovante via l'utilisation de biomatériaux

2.1. Les besoins actuels en termes de décontamination : un cahier des charges

Les méthodes existantes, en particulier la TF et le RSDL, présentent un potentiel considérable en matière de décontamination. Toutefois, leur efficacité est limitée dans certains domaines d'applications. Les restrictions incluent l'inaptitude de ces composés à être utilisés sur des peaux lésées (altération du processus de cicatrisation et incompatibilité d'utilisation sur des plaies ouvertes), les désavantages de la TF (formation de poussières recontaminantes) sous forme de poudre ainsi que les coûts élevés du RSDL (impossible d'équiper un grand nombre de personnes et donc inadapté à pour la décontamination de masse), qui sont parmi les principaux inconvénients des normes actuelles.

S'appuyant sur les conclusions issues de la thèse du Dr. Alix Danoy, menée au sein de notre laboratoire et portant sur l'efficacité de décontamination des suspensions de TF, nous avons entrepris de concevoir une nouvelle formulation galénique de décontaminant visant à pallier toutes les limites susmentionnées.

Les biomatériaux constituent actuellement l'une des thématiques les plus prometteuses au sein des laboratoires, dans l'optique de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques, notamment pour la régénération tissulaire. Ces matériaux qui englobent des structures vivantes ou des dispositifs médicaux, contribuent à améliorer ou à remplacer des fonctions naturelles, afin d'améliorer la qualité de vie des patients¹⁶³. Les biomatériaux peuvent être regroupés en quatre catégories majeures : ceux issus de matériaux d'origines naturelles, les alliages métalliques, les céramiques et les polymères¹⁶⁴. Le **Tableau 18** récapitule les avantages, les limites et les domaines d'applications potentiels. La majeure partie des biomatériaux, utilisés aujourd'hui sont les métaux et les polymères. Ces biomatériaux trouvent fréquemment leur application dans le remplacement des articulations, au niveau des plaques osseuses, pour produire des ligaments et tendons artificiels, pour des implants dentaires, pour des prothèses de vaisseaux sanguins et des valves cardiaques, pour la réparation de la peau (brûlure, cicatrisation) ou encore dans des lentilles de contact¹⁶³ (**Tableau 18**).

Biomatériaux	Avantages	Limitations	Applications
Matériaux d'origines naturelles (Cellulose, chitine, fucanes, collagène)	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatible • Biodégradable • Confèrent rigidité et résistance • Promeut et accélère la migration et différenciation cellulaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Risque de dégradation 	<ul style="list-style-type: none"> • Membrane de dialyse • Fils de suture, chirurgie reconstructive • Produit de substitution et régénération osseuse
Métaux (Ti et ses alliages, Ag, Au, acier inoxydable)	<ul style="list-style-type: none"> • Assez robuste • Assez rigide • Importante résistance • Efforts de traction et de compression suffisant • Super élastique 	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilité d'être détruit par la rouille • Complexe à préparer 	<ul style="list-style-type: none"> • Chirurgie orthopédique • Implantologie dentaire • Stimulateurs cardiaques • Implant articulaire, plaques et vis d'ostéosynthèse
Céramiques (Alumine, céramique de phosphate de calcium, Zirconium, Hydroxyapatite)	<ul style="list-style-type: none"> • Respectueux de l'environnement et des tissus vivant • Assez de vigueur et de fermeté • Résistance suffisante à la rouille et à l'usure + haute température • Moins dense 	<ul style="list-style-type: none"> • Dur • Peu flexible • Moins de fatigue • Résistance mécanique variable 	<ul style="list-style-type: none"> • Prothèse orthopédique (hanche, genou, épaule) • Prothèse dentaires (couronnes, bridges) • Substitution osseuse en chirurgie maxillo-faciale • Neurochirurgie • Réparation osselets de l'oreille
Polymères (Nylon, Silicone, polyester)	<ul style="list-style-type: none"> • Respectueux de l'environnement et des tissus vivant • Résilience suffisante • Simple à développer • Haute résistance à la rouille 	<ul style="list-style-type: none"> • Variation de la forme • Risque de dégradation 	<ul style="list-style-type: none"> • Dispositif médicaux (tubes, sondes, cathéters, sondes, poches à sang) • Implants vasculaires

- | | | | |
|--|--|--|--|
| | | | <ul style="list-style-type: none"> • Lentilles de contact rigides |
|--|--|--|--|

Tableau 18 - Catégories et domaines d'applications des différents biomatériaux ainsi que leur avantages et limitations dans leur utilisation (d'après Bharadwaj *et al.*, 2021)

Lorsque l'on envisage l'utilisation d'un biomatériau à des fins médicales chez l'humain, plusieurs paramètres clés doivent être pris en considération pour élaborer le dispositif le plus approprié. Pour cela, nous avons identifié les paramètres les plus pertinents à étudier dans le développement d'un biomatériau destiné à la décontamination cutanée :

La biocompatibilité : le biomatériau développé doit présenter une biocompatibilité optimale lors de son contact avec les tissus, lorsqu'il est appliqué sur des peaux lésées. Cela englobe l'évaluation de la biocompatibilité de l'ensemble des composants pour éviter toute altération des tissus environnants.

La cytotoxicité : le biomatériau doit être formulé d'une manière à ne pas défavoriser la prolifération et la différenciation des cellules en contact avec celui-ci.

Méthode d'utilisation : le biomatériau doit être facilement produit, utilisable et retirable de la surface cutanée, qu'il s'agisse de peau saine ou lésée. Dans cette optique, l'utilisation d'un polymère de type filmogène pourra être un choix judicieux, tout comme l'emploi d'un poloxamère thermosensible capable de subir une transition Sol-Gel à 32°C, soit la température cutanée.

Propriétés mécaniques : la rigidité ainsi que les propriétés d'adhérence (tel que le pelage) doivent être prises en compte. Ces caractéristiques doivent être compatibles avec une utilisation cutanée, impliquant des niveaux de résistance, de déformation et de retrait conciliable pour ce type d'utilisation.

Un pouvoir de décontamination : le biomatériau doit présenter un pouvoir de décontamination au moins équivalent aux méthodes existantes. Cette capacité pourrait être obtenue par l'incorporation de molécules adsorbantes ou neutralisantes, sans altérer les propriétés intrinsèques du biomatériau.

Séquestration du contaminant : l'objectif du biomatériau est de pouvoir séquestrer le contaminant en son sein une fois que la surface traitée a été décontaminée. Cette approche vise à résoudre les problèmes rencontrés par les méthodes actuelles, en facilitant la gestion des contaminants sans propagation sur d'autres surfaces ni risque pour le personnel, tout en optimisant la gestion des déchets contaminés.

La stabilité : le biomatériau formulé doit répondre à des exigences de stabilité. Les variations de température et d'humidité sur les différents types de terrains peuvent impacter considérablement les propriétés des formulations, tant mécaniques que de décontamination.

Coût : le biomatériau conçu doit être reproductible et économique. Étant donné l'impact financier élevé du RSDL, il est nécessaire de limiter au strict minimum le nombre de composants et de choisir judicieusement les matériaux. Le développement devrait permettre une utilisation à grande échelle.

Conformément aux critères énoncés précédemment, le développement de ce biomatériau doit répondre à une multitude d'exigences en vue de proposer une nouvelle méthode de décontamination cutanée suite à une contamination aux agents chimiques de guerre et plus particulièrement aux COPs. Pour cela, nous avons opté pour le modèle de l'hydrogel en raison de ses propriétés intéressantes en tant que biomatériau de base pour l'élaboration de cette nouvelle approche :

- Flexibilité : en termes d'utilisation et domaines d'application
- Similitude avec les tissus vivants : hautement hydratés, les hydrogels miment très bien l'environnement physique et chimique de la MEC et sont donc un microenvironnement idéal pour la prolifération et la différenciation cellulaire
- Versatile : des propriétés mécaniques et viscoélastiques flexibles (résistance à la traction, déformation), dégradation et stabilité
- Formulation : facilité d'incorporation des molécules, principes actifs, particules

Depuis sa première apparition dans la littérature en 1984 et de son utilisation à partir des années 1960 par Wichterle et Lim en tant que lentilles de contact, les hydrogels sont couramment utilisés en tant que système de délivrance contrôlé d'agents actifs¹⁶⁵. Depuis, l'intérêt pour les hydrogels n'a cessé de croître, touchant divers domaines tels que l'agriculture, l'industrie alimentaire, l'ingénierie tissulaire et la médecine régénérative¹⁶⁶. En conséquence, les hydrogels sont d'excellents candidats pour le développement de notre méthode de décontamination cutanée, en pouvant répondre aux nombreux critères rigoureux que nous avons définis.

2.2. Les hydrogels comme modèle de biomatériaux pour la décontamination

2.2.1. Structure des hydrogels

Les hydrogels se présentent sous forme de réseaux tridimensionnels de polymères hydrophiles, constitués de polymères d'origine naturelle, synthétique ou hybride, assemblés par réticulation physique ou chimique. Ces hydrogels ont la capacité d'absorber jusqu'à mille fois leur poids sec en eau tout en conservant leur structure intacte. Lorsque les hydrogels

contiennent plus de 95 % d'eau, ils sont qualifiés de super-absorbants. Leur biocompatibilité est élevée en raison de leur grande capacité de rétention d'eau et de leur similarité physico-chimique avec la matrice extracellulaire native. Cette similitude s'étend à la fois à la composition et aux propriétés mécaniques de la matrice¹⁶⁷. Deux catégories d'hydrogels peuvent être distinguées en fonction des interactions impliquées dans la formation de leur structure : les hydrogels physiques et les hydrogels chimiques (**Figure 24**).

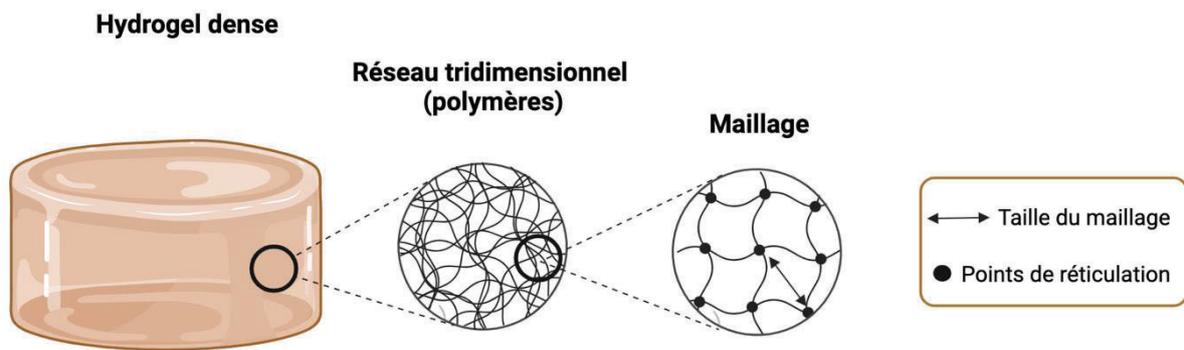


Figure 24 - Représentation d'un hydrogel et de son réseau tridimensionnel – Formation du réseau tridimensionnel par la réticulation des polymères composant l'hydrogel dans une solution aqueuse. La taille des mailles entre les deux points de réticulation varie entre 1 et 100 nm (réalisée avec Biorender).

Les hydrogels physiques réversibles résultent de la formation d'un réseau structural au moyen de réticulations non covalentes, mettant en jeu des interactions de faible énergie telle que les interactions ioniques, les liaisons hydrogène, l'empilement π - π , les forces de Van der Waals et les interactions hydrophobes. Inversement, les hydrogels chimiques sont le plus souvent obtenus à partir de biopolymères assemblés par de multiples interactions covalentes plus fortes au niveau des points d'intersections. Ces caractéristiques leur confèrent des propriétés mécaniques supérieures, se traduisant par une stabilité accrue par rapport aux hydrogels physiques, qui eux possèdent des propriétés mécaniques moins robustes et une stabilité moindre dans le temps¹⁶⁵. Les structures des hydrogels physiques et chimiques adoptent une configuration en forme de maille. La distance entre les mailles et les points de réticulation peut varier de 1 à 100 nm, une valeur qui peut être influencée par la nature et la concentration des polymères, ce qui a un impact sur leurs propriétés mécaniques¹⁶⁸.

Les réseaux de polymères des hydrogels proviennent principalement de trois catégories de matériaux : les polymères synthétiques, les polymères naturels et les matériaux hybrides qui intègrent des composants à la fois synthétiques et naturels^{169,170}. Parmi les polymères synthétiques couramment utilisés dans la recherche sur les hydrogels, on trouve le poly (oxyde d'éthylène), le poly (méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) (polyHEMA), l'alcool poly(-

vinyle) (PVA) et le poly(acrylamide) (PAAm)^{171,172}. En raison de leur reproductibilité et de leurs propriétés mécaniques flexibles, ces hydrogels à base de polymères synthétiques sont commercialisés pour des applications biomédicales. D'autre part, les hydrogels de polymères naturels incluent des protéines tels que le collagène, le chitosan, la gélatine¹⁷³, les polysaccharides, l'agar et l'alginate^{174,175}. Ces polymères d'origine naturelle possèdent des propriétés particulièrement intéressantes, notamment des capacités cicatrisantes, des effets antitumoraux, ou hémostatiques¹⁷⁶.

Compte tenu de leur facilité de production et de leur biocompatibilité, les hydrogels se révèlent des choix pertinents pour la décontamination des NOPs. Leurs caractéristiques leur confèrent la capacité d'offrir des propriétés mécaniques modulables ainsi que le potentiel de séquestrer les NOPs. De plus, lorsqu'ils sont appliqués sur des zones cutanées lésées, les hydrogels ne devraient pas induire de réactions néfastes, tout en favorisant éventuellement le processus de cicatrisation des plaies.

2.2.2. Les polymères/hydrogels filmogènes

Les propriétés filmogènes de certains polymères se sont avérées être une solution appropriée pour la base de notre hydrogel. Dans notre cas, la dissolution de ces polymères filmogènes en solution peut constituer une formulation dite « polymères en solution » car aucune méthode de réticulation (physique ou chimique) n'est utilisée ou alors « hydrogel » si les propriétés rhéologiques de cette solution correspondent à celle d'un hydrogel (telles que les modules de viscoélasticité).

Ces propriétés filmogènes faciliteront notamment l'application ainsi que le retrait de la formulation de la surface cutanée. Pour cela les solutions de polymères développées riche en eau, peuvent après application au contact de l'air, sécher et ainsi former ce que l'on appelle des « films ». Ces films dépourvus d'eau peuvent se retirer facilement post-application grâce au maintien de leur propriétés mécaniques (notamment de résistance à la tension et leur force d'adhésion). Parmi les polymères filmogènes les plus couramment utilisés, on retrouve :

Polyvinyl pyrrolidone (PVP) : l'utilisation du PVP se révèle avantageuse en raison de sa capacité à se dissoudre à la fois dans des solvants organiques et dans l'eau, favorisant ainsi la formation d'un film¹⁷⁷. Le PVP présente divers avantages, tels qu'un caractère hygroscopique élevée, une biocompatibilité et la capacité à augmenter la force bioadhésive, s'expliquant par la formation de liaisons hydrogène et de forces de Van der Waals (**Figure 25**).

Alcool polyvinylique (PVA) : l'utilisation du PVA a été décrite la première fois en 1924 comme un polymère synthétique linéaire soluble dans l'eau, produit par la polymérisation radicale de l'acétate de vinyle en poly (acétate de vinyle), puis par hydrolyse des fonctions

acétate en groupements alcools¹⁷⁸. Le degré d'hydrolyse, généralement compris entre 85 et 100 %, influence les propriétés du PVA, telles que la cristallinité et la solubilité aqueuse, qui influent sur les caractéristiques de l'hydrogel. Les hydrogels à base de PVA sont principalement préparés par réticulation chimique¹⁷⁹. Ces solutions de polymères peuvent aussi subir des cycles de congélation – décongélation répétés pour renforcer la structure macromoléculaire.

L'utilisation de solutions aqueuses de PVA pur sans moyen de réticulation (chimique ou physique) est très peu documentée dans la littérature. Cependant Jayasekara *et al.*, et Finch *et al.*, montrent que les solutions aqueuses ne font que de simples liaisons inter – intramoléculaires. Des analyses plus approfondies par des techniques d'IRTF et de CMR ont permis de mettre en évidence qu'au sein des solutions composées de PVA, amidon et de chitosan comme modificateur de surface n'induit pas la formation de nouvelles liaisons entre les composants, bien que la présence de tous les composants soit validée^{180,181}. Il est fréquent d'opter pour des mélanges de PVA afin d'améliorer ses caractéristiques en le combinant, par exemple, avec du PVP. Cette approche permet d'optimiser les propriétés mécaniques par la formation de liaisons hydrogène entre les groupements carboxyle (C=O) du PVP et les groupements hydroxyle (OH) du PVA^{182,183} (**Figure 25**).

Chitosan : Il s'agit d'un polysaccharide naturel dérivé de la chitine¹⁸⁴. Grâce à sa biocompatibilité et à ses activités biologiques spécifiques, le chitosan a été exploité dans diverses applications, dans l'administration de médicaments et de la médecine régénérative¹⁸⁵. Son caractère muco-adhésif et la présence de groupes fonctionnels disponibles dans sa structure chimique en ont fait un polymère propice à de nouvelles applications. On le retrouve couramment dans la fabrication de pansements en raison de sa capacité à s'adapter aux tissus environnant les plaies et de ses propriétés biologiques, telles que ses effets cicatrisants et antibactériens. Selon son degré d'acétylation, le chitosan peut être pratiquement insoluble dans l'eau ainsi que dans la plupart des solvants organiques¹⁸⁶ (**Figure 25**).

Les dérivés de cellulose : parmi les dérivés de cellulose, l'hydroxypropylcellulose et l'éthylcellulose se démarquent. Tandis que l'hydroxypropylcellulose est soluble dans l'eau, l'éthylcellulose est insoluble dans ce même solvant¹⁸⁷. Elle permet d'obtenir des hydrogels ayant de bonnes propriétés filmogènes et de stabilité. Les propriétés mécaniques de ces films dépendent du poids moléculaire et de la viscosité¹⁸⁸(Figure 25).

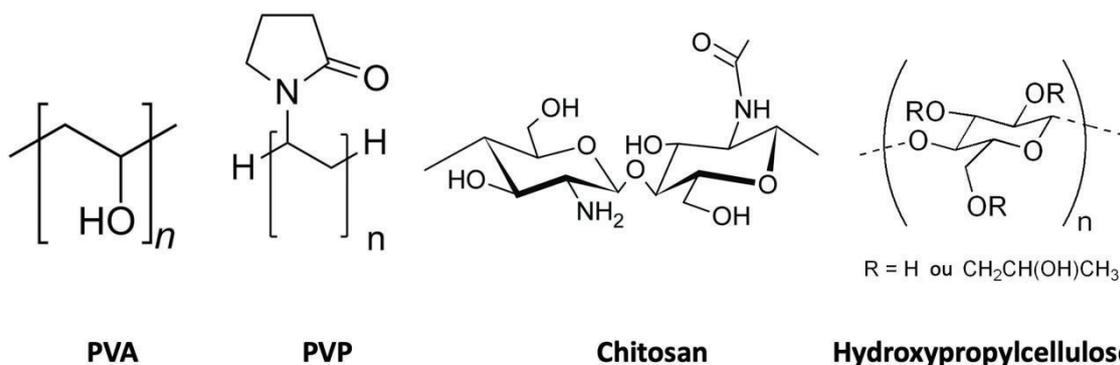


Figure 25 - Structure chimique des polymères à caractère filmogène – PVA, PVP, chitosan et l'hydroxypropylcellulose

Polymères	Applications	Études
PVA + activateur de perméation cutanée + agent adhésif	Administration transdermique de testostérone – formation d'un film sous 2 à 3 min	Na-Mi <i>et al.</i> , 2003 ¹⁸⁹
PVA/PVP/Propylène glycol/éthanol/eau	Formation de film en 4 min + adhésion - Pour la cicatrisation de plaies chez les rats avec forte libération de principes actifs	Dong <i>et al.</i> , 2001 ¹⁹⁰
PVA/Chitosan	Propriétés antibactérienne et anti-biofilm pour faciliter la cicatrisation des plaies	Yang <i>et al.</i> , 2018 ¹⁹¹
Chitosan/PVP/Nanocellulose	Cicatrisation des plaies – maintien d'un environnement humide sur la plaie et antibactérien	Poonguzhali <i>et al.</i> , 2017 ¹⁹²
PVP/ Eudragits®/ Ketorolac	Formulation transdermique permettant d'assurer un effet analgésique rapide et accru	Ammar <i>et al.</i> , 2013 ¹⁹³
PVP/Carboxyméthylcellulose (CMC)	Utilisation comme pansement pour la cicatrisation des plaies – Meilleurs résultats pour la combinaison de PVP/CMC que les polymères seuls	Wang <i>et al.</i> , 2007 ¹⁹⁴
PVA/Héparine/	Propriétés anticoagulantes qui permet d'inactiver les facteurs de coagulation sanguine	

Glycérol/ Formaldéhyde/ Glutaraldéhyde		Goosen <i>et al.</i> , 1983 ¹⁹⁵
PVA/Alginate/ Nitrofurazone	Utilisation comme pansements au niveau des plaies – Diminution de la taille des plaies <i>in vivo</i> chez les rats	Kim <i>et al.</i> , 2008 ¹⁹⁵

Tableau 19 - Quelques exemples d'hydrogels composés de polymères filmogènes supplémentés ou non de principes actifs et de leurs applications

Tous les travaux énumérés dans le **Tableau 19** montrent que ces hydrogels composés de polymères de type filmogène sont principalement développés pour des applications cutanées, notamment dans le contexte des traitements de cicatrisation. Les propriétés de ces hydrogels permettent d'assurer un rôle important en favorisant la fermeture des plaies. Souvent, ces propriétés sont améliorées par l'incorporation de molécules actives visant à améliorer son action, notamment avec des molécules de types anticoagulants, antibactériens et analgésiques. En plus de leur efficacité thérapeutique, ces hydrogels ne présentent aucun effet toxique sur les tissus voisins, ce qui les positionne comme des outils prometteurs en termes de biocompatibilité.

2.2.3. Les hydrogels thermosensibles

Les hydrogels thermosensibles sont particulièrement captivants en raison de leur capacité à subir une gélification et un changement d'état, tel que le gonflement, en réponse à des changements de température¹⁹⁶. Dans le contexte biomédical, il est également envisageable d'augmenter la température ambiante jusqu'à atteindre la température physiologique pour permettre la gélification de l'hydrogel (**Figure 26**). Ces systèmes permettent la formation d'hydrogels *in situ*, où l'hydrogel peut être délivré sous forme de solution de manière peu invasive et se solidifier dans l'organisme lorsque la température de gélification de cet hydrogel est atteinte. Cette transition, appelée Sol-Gel, s'opère instantanément. Il s'agit cependant d'un processus réversible, qui offre la possibilité de retrouver la forme initiale de la formulation, soit une solution injectable, lorsque cette même formulation se trouve sous la température de transition. L'avantage de ce système, dont le stimulus est la température, et qu'il ne nécessite plus l'utilisation d'agents initiateurs de réticulation. Cela permet d'obtenir des hydrogels par des procédés plus simples et moins agressifs. La détermination de cette phase de transition Sol-Gel peut être déterminée à l'aide de diverses méthodes, telles que la calorimétrie différentielle à balayage et via des études de rhéologie^{197,198}.

Plusieurs polymères démontrent des caractéristiques thermosensibles. Parmi eux, on peut citer des polymères naturels tels que le N-isopropylacrylamide (NIPAAm), le tri-bloc de poly éthylène oxide – poly propylène oxide (PEO-PPO-PEO), des copolymères de polyester biodégradables à base de poly(éthylène glycol), de poly (organophosphazènes) et du 2-(diméthylamino) éthylméthacrylate (DMAEMA). Si l'on s'intéresse plus particulièrement aux poloxamères amphiphiles, ces polymères sont des copolymères triblocs synthétiques de poly (oxyde d'éthylène)-b-poly(oxyde de propylène)-b-poly (oxyde d'éthylène)(PEO-PPO-PEO) (**Figure 26**). Ils sont obtenus par l'addition séquentielle de monomères PO hydrophobes et EO hydrophiles, ce qui influe sur leur solubilité dans l'eau en fonction du rapport entre ces deux composants. Ces polymères sont aujourd'hui commercialisés sous les appellations Pluronic[®], Lutrol[®], Kolliphor[®] (BASF), AntaroX[®] (Rhodida) et Synperonics[®] (Croda). Selon la nomenclature de BASF, le nombre indiqué après la lettre P donne des informations sur le poids moléculaire du bloc PPO (le premier ou les deux premiers) et la fraction pondérale du bloc PEO (le dernier) (**Tableau 20**).

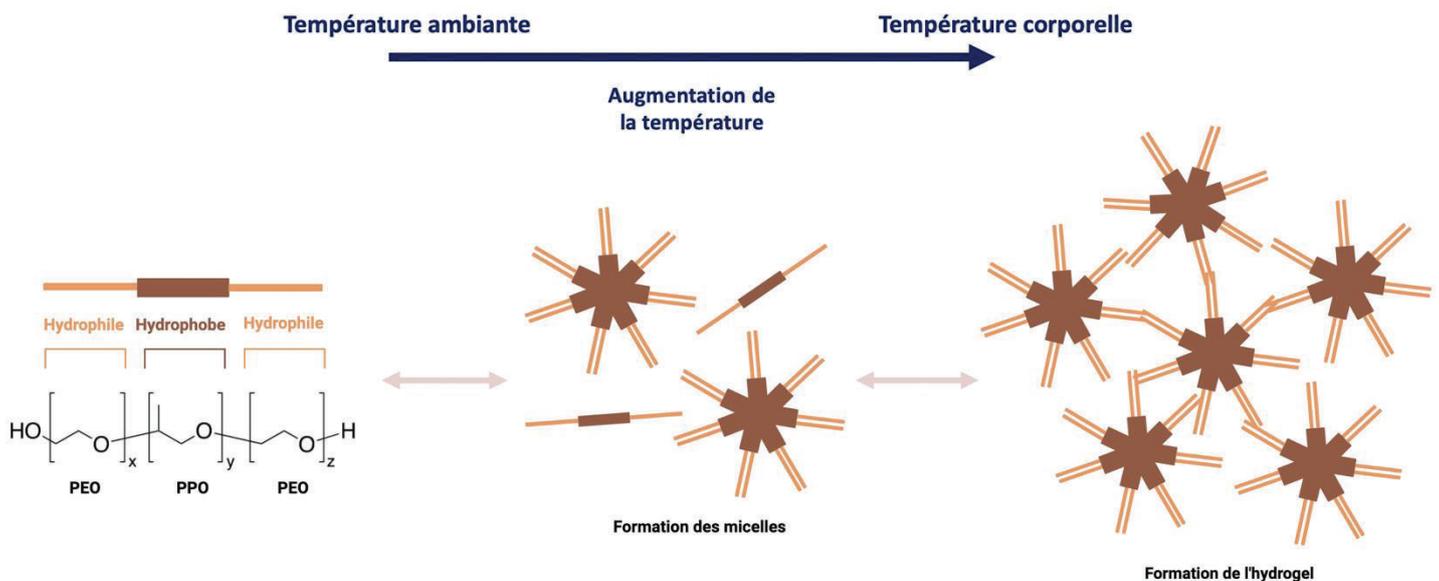


Figure 26 - Représentation d'un tri-bloc de poloxamères et de la formation d'un hydrogel thermoréversible par l'assemblage en micelle lors de l'augmentation de la température

Leur biocompatibilité en fait des candidats prometteurs non seulement pour le traitement de certaines pathologies cutanées, mais aussi pour une utilisation sous forme injectable pour de la régénération tissulaire par la libération de molécules actives. La thermo-réversibilité de ces hydrogels simplifie leur manipulation, car ils peuvent être manipulés et administrés sous forme de solution, améliorant ainsi leur stockage^{199,200}.

Poloxamères	Température de trans Sol-Gel	Domaines d'applications
P407	<ul style="list-style-type: none"> • Gélifie à partir de 12,6 % (w/v) • 26°C pour 12,6 % w/v • 19°C pour 18,9 % w/v • Température dépend de la concentration en P407 	<ul style="list-style-type: none"> • Brûlures • Solution ophtalmologique
P188	<ul style="list-style-type: none"> • Haute par rapport au P407 • > 40°C pour 20 % w/v • Température dépend de la concentration en P188 	<ul style="list-style-type: none"> • Formulation pour injection intraveineuse • Formulation pour voie orale

Tableau 20 - Quelques exemples de poloxamères (P407 et P188) et de leurs propriétés de gélification et utilisation dans le domaine biomédical

2.3. Les méthodes de décontamination sous forme d'hydrogel

Il y a quelques années, l'équipe de Maibach *et al.*, ont breveté un gel de décontamination dermique, nommé DDGel (brevet WO 2017/053594 A1). Ce gel est constitué de polymères tels que du Kollidon SR, du lutrol et du carboxyméthylcellulose. Il est également enrichi en phyllosilicates tels que la TF et la bentonite, ce qui lui confère des propriétés d'adsorptions vis-à-vis des NOPs. De plus, sa composition inclut des polymères filmogènes tels que le PVA et le PVP, ce qui lui permet de former un film après séchage, facilitant ainsi son retrait. Les résultats de leur étude, menée sur des explants de peau *ex vivo*, suggèrent que le DDGel présente une meilleure DE que le RSDL face à différents simulants d'agents toxiques de guerre tels que le CEES (simulant du gaz moutarde) et le méthylphosphonate de diisopropyle (DIMP, simulant du sarin) (**Tableau 21**)^{201,202}. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que le DDGel élimine une partie du toxique du SC et forme une liaison avec le contaminant à la surface de la peau, empêchant ainsi sa pénétration.

Méthode de décontamination	Facteur d'efficacité de décontamination
Sans décontamination	1
DDGel	10,1
RSDL	4,4

Tableau 21 : Comparaison du facteur d'efficacité de décontamination du DDGel et du RSDL sur des explants de peau d'origine humaine face au CEES (d'après Cao, Hui et al., 2018)

Néanmoins, en raison de l'absence d'informations concernant ses propriétés mécaniques, sa facilité d'utilisation (biocompatibilité, filmogénicité) et sa composition détaillée, le DDGel n'est actuellement pas employé en tant que méthode de décontamination.

Présentation du projet de recherche

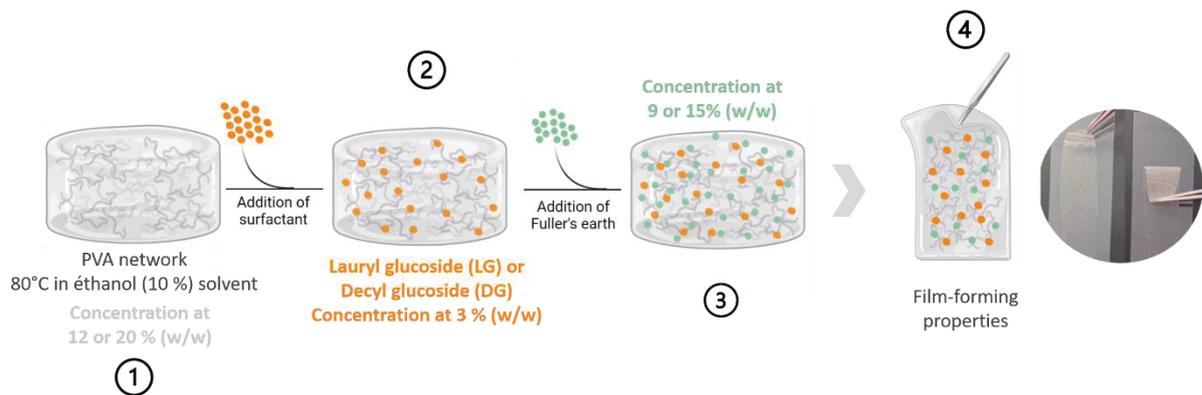
L'absence de traitement ou de moyens de décontamination lors d'un incident impliquant des composés chimiques tels que les OPs et les NOPs peuvent engendrer des conséquences potentiellement létales pour les individus concernés. Malgré leur interdiction établie par l'OIAC, ces composés continuent d'être employés dans de nombreux conflits, notamment lors de guerres récentes ou d'attaques terroristes. La peau représente la principale voie d'entrée pour ces COPs, en raison de leurs propriétés physico-chimiques qui leur confèrent la capacité de pénétrer à travers cette barrière, induisant ainsi une résorption au niveau sanguin. Afin de limiter les effets toxiques associés aux COPs, diverses méthodes de décontamination ont été développées. La décontamination sèche implique l'utilisation de la TF dotée de capacités d'adsorption considérables, sous forme de poudre libre ou incorporée dans un gant. Toutefois, cette méthode peut engendrer des risques de contamination croisée par inhalation de la TF contaminée en raison de sa granulométrie fine et de sa volatilité. En parallèle, la décontamination humide à base d'eau ± surfactant peut entraîner des risques tels qu'une gestion inadéquate des déchets contaminés due à la propulsion de grandes quantités d'eau, ainsi que des effets « wash-in » induisant une augmentation de la pénétration cutanée des COPs. Actuellement, le RSDL détient le standard d'excellence en matière de décontamination humide. Son action désactivante/neutralisante, attribuable à sa composition en oxime, permet une décontamination efficace. Néanmoins, son prix onéreux rend impossible l'équipement de toutes les forces armées, et ces effets néfastes sur le processus de cicatrisation limitent son utilisation sur les peaux lésées.

L'objectif de ce projet de thèse est donc de développer une nouvelle formulation de décontamination qui combine les méthodes actuelles efficaces contre les OPs, et plus particulièrement le POX. Cette nouvelle forme galénique consistera en une formulation filmogène composée de TF ou d'autres phyllosilicates tels que la Terre de Sommières (TS) et de surfactant.

1- Conception et caractérisation d'une formulation filmogène pour la décontamination cutanée contre le POX

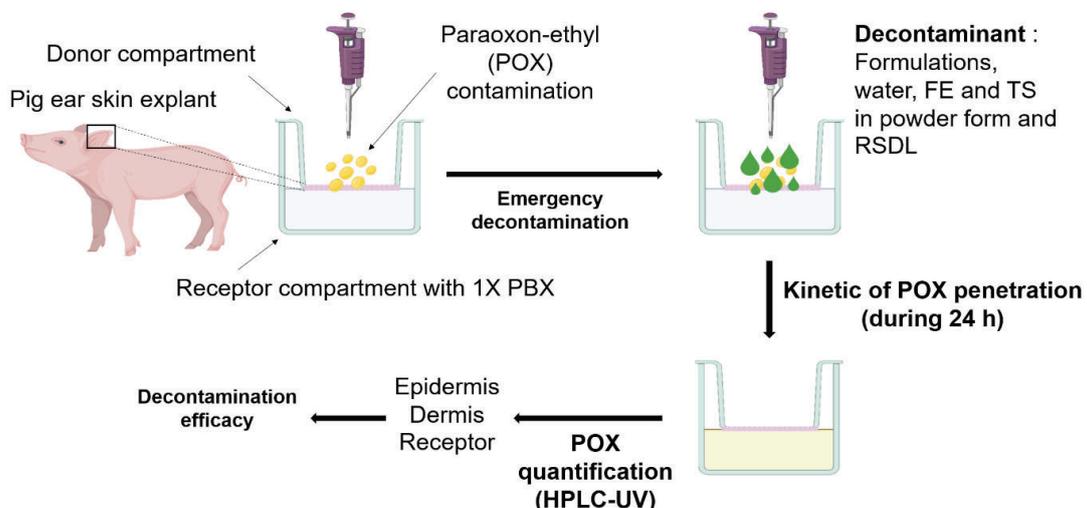
Dans ce chapitre, nous aborderons la conception de ce nouvel outil de décontamination sous la forme d'une formulation filmogène composée de PVA, de TF et de surfactant. Plusieurs formulations seront développées puis sélectionnées afin de déterminer celles qui présentent le plus d'avantages pour une application cutanée. Les formulations les plus prometteuses seront caractérisées dans le but de définir leurs propriétés d'utilisation.

Cette caractérisation inclut l'analyse structurale des formulations, la mesure de leur rigidité, leurs propriétés rhéologiques, l'évaluation de leurs propriétés d'adhésion et de filmogénicité, leur capacité à décontaminer des surfaces ainsi qu'à séquestrer le POX et leur stabilité sous différentes conditions de conservation. Cette partie permettra de valider le principe de formulation du système de décontamination filmogène avec la TF, afin de l'appliquer à d'autres phyllosilicates, dont la terre de Sommières (TS). Enfin, elle permettra de définir 4 formulations filmogènes stables, applicables et efficaces face au POX afin de pouvoir évaluer leur efficacité de décontamination *ex vivo* sur la peau.



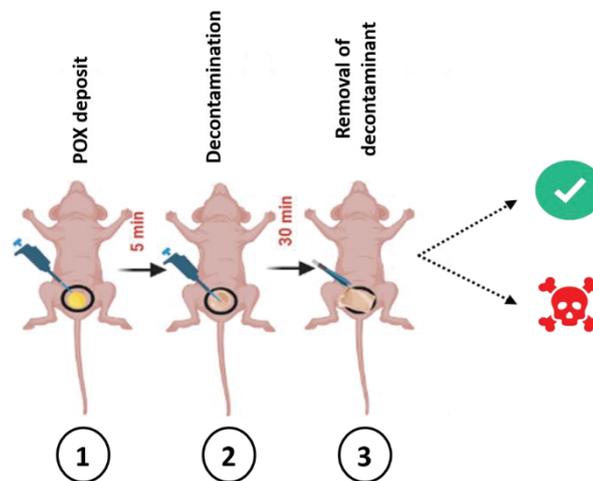
2- Comparaison de l'efficacité de décontamination des formulations filmogènes de TF et TS face au POX sur des explants de peau d'origine porcine

La pénétration cutanée du POX (simulant du VX) et l'efficacité de décontamination des formulations filmogènes composées de TF, ainsi que de TS, seront étudiées sur des explants de peau d'origine porcine afin de déterminer les formulations les plus efficaces. Préalablement, la toxicité des formulations sera évaluée sur des cellules cutanées, telles que des fibroblastes primaires afin de valider leur potentiel utilisation.



3- Évaluation *in vivo* des capacités de décontamination des formulations chez les souris SKH1

Au cours de ce chapitre, la biocompatibilité de deux formulations précédemment validée *ex vivo* seront évaluées sur un modèle de souris SKH1 en comparaison à celle du RSDL. Après avoir déterminé la DL_{50} percutanée du POX, les capacités de décontaminations des formulations et du RSDL seront évaluées au moyen de tests de contamination et de décontamination en réalisant un suivi de la survie des souris sur une période de 72 heures. Ce travail sera mené à l'aide d'un expérimentateur animal au PBES (Plateau de biologie expérimentale de la souris - Lyon, France) selon une procédure validée par un comité d'éthique et par le ministère de la recherche sous le nom de 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 ».



Tous ces résultats seront finalement discutés en vue de déterminer le potentiel des formulations innovantes pour la décontamination cutanée des agents neurotoxiques. Par ailleurs, nous nous intéresserons à leur intérêt dans d'autres domaines d'application, ainsi qu'aux perspectives quant à l'optimisation de la formulation en vue de son utilisation sur les peaux lésées, les surfaces et d'autres agents chimiques de guerre.

Matériels & Méthodes

1. Matériels

Les échantillons de terre de foulon (TF) ont été gracieusement fournis par NBC-Sys (France). Le PVA (poids moléculaire de 31 000 à 50 000 avec un taux d'hydrolyse de 87 à 89 %), le paraoxon-éthyl (POX), la solution de 'presto blue', la thermolysine, le PBS 10X, la collagénase et le diméthyl sulfoxyde ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich (France). Le decyl glucoside (DG) et le lauryl glucoside (LG) ont été achetés chez Greenweez (France). La Terre de Sommières (TS) a été fournie par la droguerie écologique (France). De l'éthanol pharmaceutique à 96 %, du méthanol de qualité HPLC et de l'acide acétique glacial ont été obtenus auprès de Carlo Erba (Italie). Le masque peel-off a été acheté chez Uriage (France), l'eau pure chez Otec®-Aguettant (France), le filtre à membrane en polycarbonate (0,2 µm) chez Merck Millipore (États-Unis) et le paraformaldéhyde à 16 % chez Electron Microscopy Sciences (États-Unis). Les fibroblastes dermiques humains normaux extraits de prépuce ont été obtenus des Hospices civils de Lyon (France). Les échantillons de peau d'oreille de porc congelée ont été acquis auprès d'un abattoir (Proviskin, France) et les éponges RSDL ont été obtenues auprès de l'Institut de recherche biomédicale des armées (IRBA) (Brétigny-sur-Orge). Les souris SKH1 femelles ont été livrées par Charles River Laboratory (Italie), les kits de dosage ELISA ont été acquis auprès d'Invitrogen (France) et le kit « Acetylcholinesterase assay » chez Abcam (France).

2. Préparation des formulations décontaminantes

2.1 Formulations à base de TF

Les formulations ont été obtenues en dissolvant le PVA (12 ou 20 wt%) dans une solution d'éthanol à 10 % à 80 °C, sous agitation pendant 1 heure. Ensuite, le tensioactif (decyl glucoside, DG ou du lauryl glucoside, LG à 3 wt%) a été ajouté pendant une heure supplémentaire, suivi de l'addition de la TF (9,1-15 wt%) et d'un chauffage pendant 30 minutes. Enfin, les formulations ont été homogénéisées pendant 2 heures à température ambiante. Des informations détaillées sur toutes les formulations testées sont fournies dans le **Tableau 26**. Pour faciliter la lecture, une nomenclature spécifique a été utilisée, où P correspond au PVA, F à TF, D à DG et L à LG.

2.2 Formulations à base de TS

Les formulations à base de TS ont été formulés selon le même procédé que ceux composés de TF (Cf 2.1). La TF a été substituée par de la TS.

3. Propriétés rhéologiques des formulations

Les propriétés rhéologiques de chaque formulation ont été évaluées à l'aide d'un rhéomètre (Elastosens, France). À cet effet, des porte-échantillons ont été remplis avec 6,5 mL de chaque formulation et analysés pendant une durée de 2 minutes à température ambiante, avec un point de mesure pris toutes les 3 secondes. Les valeurs de G' (module d'élasticité) et de G'' (module de viscosité) ont été déterminées en calculant la moyenne de tous les points pour chaque module ($n= 1$ pour chaque formulation).

4. Procédure de sélection des formulations

4.1 Propriétés filmogènes des formulations

Pour évaluer la capacité de formation des films, 50 μ l de chaque formulation ont été uniformément étalés sur des lames de verre à l'aide d'un applicateur manuel de film (Brant Industry, France) réglé à une épaisseur de 150 μ m. Après séchage, les films formés ont été enlevés à l'aide de pinces et leur capacité à rester intacts sans se briser a été notée ($n=3$ pour chaque formulation).

4.2 Temps de séchage à 32°C des formulations

Le temps de séchage des formulations à 32°C a été mesuré sur une plaque chauffante (Ascon Technologic, Italie) en appliquant 50 μ l de chaque formulation à une épaisseur de 150 μ m à l'aide d'un applicateur manuel de film. Le temps de séchage a été enregistré à l'aide d'un chronomètre, et les films ont été considérés comme secs lorsqu'ils pouvaient être facilement enlevés en une seule fois à l'aide d'une pince ($n=3$ pour chaque formulation).

4.3 Capacité de décontamination face au POX sur lames de verres

Conformément à la norme NF X52-122 et à la norme de l'OTAN AEP-65, des essais de décontamination ont été réalisés sur des lames de verre. Un volume de 1 μ L de POX a été déposé sur la surface en verre et laissé statique pendant 2 minutes. Ensuite, 72 μ L de chaque formulation et du masque peel-off ont été appliqués sur les lames de verre, recouvrant la zone contaminée par le POX. Après séchage, le film a été soigneusement enlevé avec une pince, et tout le POX restant sur la surface en verre a été récupéré en essuyant avec une compresse imbibée d'éthanol. Le POX provenant à la fois du film (fraction du film) et de la compresse imbibée d'éthanol (fraction de surface) a ensuite été extrait dans de l'éthanol à 96 % pendant 24 heures, suivi de 2 heures de traitement par ultrasons ($n=3$ pour chaque formulation).

5. Caractérisation des formulations

5.1 Analyse MEB/EDX

L'analyse structurale et élémentaire des films séchés, avec ou sans TF, exposés ou non au POX, a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage combiné à la spectroscopie de dispersion d'énergie (MEB/EDX, Quanta 250, TFI, Japon). Des films secs d'une épaisseur de 200 μm ont été initialement congelés dans de l'azote liquide avant d'être fracturés entre deux plaques d'acier inoxydable. Ensuite, les échantillons fracturés, ainsi que la poudre de TF, ont été métallisés au carbone pour les préparer à l'observation et à l'analyse. La tension a été réglée à 5 kV pour l'imagerie et à 20 kV pour l'analyse élémentaire EDX et la cartographie, avec une résolution de 256×196 pixels. Les particules denses de TF ont été mises en évidence dans les films par microscopie électronique à balayage par rétrodiffusion à 10 kV (BSE-SEM). Pour déterminer la localisation du POX, les films exposés ont été analysés à l'aide de la spectroscopie de dispersion d'énergie (EDX). À cette fin, 3,6 μl de POX ont été déposés à la surface d'une lame de verre, puis recouverts des différentes formulations à analyser. Une fois les formulations sèches, la surface contaminée par le POX et les sections fracturées ont été analysées.

5.2 Détermination de la surface spécifique et de la microporosité des poudres de phyllosilicates

Les isothermes d'adsorption-désorption de N_2 des poudres de TF et de TS ont été obtenues à 77 K à l'aide d'un instrument Micrometrics Triflex (Micrometrics, USA). La surface spécifique a été déterminée avec la méthode de Brunauer, Emmet et Teller (BET). Avant l'adsorption, les échantillons ont été dégazés à 373 K pendant la nuit sous une pression de vide secondaire ($n=3$ pour chaque formulation).

6. Tests mécaniques

6.1 Essai de résistance à la traction uni axiale

Des essais de résistance à la traction ont été réalisés pour déterminer les propriétés mécaniques des films secs à l'aide d'un banc d'essai de traction (Adamel Lhomargy, France), équipé d'une cellule de charge de 100 Newton. Les films utilisés étaient de forme rectangulaire, avec des dimensions (épaisseur, largeur et longueur), allant de 0,03 mm à 0,04 mm, de 13 mm à 14 mm, et de 21 mm à 24 mm, respectivement. Pendant les tests, les variations de longueur et de force ont été suivies en continu à une vitesse constante de 3 mm/min. Le module de Young (YM) a été calculé en fonction de la pente de la courbe obtenue à partir des essais de traction ($n=5$ pour P12D3 et $n=6$ pour les autres formulations).

6.2 Test de décollement à 180° des films séchés sur des explants de peau de porc

Les tests de décollement ont été effectués conformément à la norme ASTM D3330, 2018. Des explants de peau d'oreille de porc de 25 mm de largeur et 150 mm de longueur ont été préalablement fixés sur des lames de verre avec de la colle, puis enserrés sur le bord inférieur du banc d'essai de traction. 500 µl de chaque formulation ont été appliqués avec une spatule sur les explants de peau pour atteindre une épaisseur finale, une largeur et une longueur de 150 µm, 23 mm et 130 mm après séchage. 15 mm du film ont été décollés avec des pincettes depuis le bord inférieur de la surface de la peau pour le fixer à une cellule de charge de 10 Newton. Les variations de force ascendante et de déplacement tout au long du test ont été suivies à une vitesse de test de 180 mm/min. La valeur maximale collectée a été considérée pour déterminer la force d'adhérence maximale (n=4 pour chaque formulation).

6.3 Analyse histologique de l'intégrité de la peau

Les explants de peau d'oreille de porc utilisés pour les tests de décollement ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4 % pendant 24 heures avant d'être inclus dans de la paraffine. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été préparées à l'aide d'un microtome (Modèle 1212, Leica, Allemagne) et colorées à l'hématoxyline et à l'éosine pour évaluer l'intégrité de la barrière cutanée par observation sous un microscope (Microscope inversé Eclipse Ti-E, Nikon, Japon) (n=1 pour P12F15D3 et sans décollement).

7. Stabilité des formulations

Les propriétés filmogènes (Cf 4.1), les capacités de décontamination *in vitro* (Cf 4.3) et la stérilité des formulations ont été évaluées mensuellement sur une période de 6 mois, sous 3 différentes températures. Pour cela, les formulations ont été conservées dans des flacons en verre étanches à 4°C, 22°C et 37°C. Des récipients en verre spécifique pour l'analyse de la sédimentation de la TF ont été utilisés dans lequel les formulations ont été versées. L'analyse a été réalisée à l'aide d'un turbiscan (TurbiSoft MA 2000, France), la stérilité des formulations a été évaluée par 3 dépôts de chaque formulation sur des géloses d'agar durant 24 heures à 37°C (n=3 pour chaque test).

8. Cytotoxicité *in vitro* des formulations

8.1 Extraction et culture des NHDFs

Les fibroblastes dermiques humains (NHDFs) ont été obtenus par extraction à partir d'un prépuce. L'épiderme a été séparé du derme en incubant le tissu toute la nuit à 4°C avec de la thermolysine (20U/ml), puis les fibroblastes dermiques ont été extraits en incubant le derme

extrait pendant 2 heures à 37°C avec de la collagénase suivi d'une filtration à l'aide d'un tamis et d'une centrifugation à faible vitesse. Les cellules ont été cultivées dans des flasques pendant deux semaines pour assurer la prolifération des fibroblastes, avec des changements tous les 2 jours de milieu de culture (milieu de Eagle modifié par Dulbecco - DMEM) afin d'éliminer autant que possible les déchets de biopsie.

8.2 Procédure du test presto blue

Les tests de viabilité cellulaire ont été réalisés en utilisant des NHDFs, de passages 5 à 9, cultivés dans du DMEM complété de 10 % de sérum de veau fœtal et de 1 % de pénicilline-streptomycine (5000 U/ mL). Un total de 20 000 cellules a été ensemencées par puits dans des plaques de culture de 96 puits et incubées pendant 48 heures à 37°C dans une atmosphère de 5 % de CO₂. En parallèle, 20 µl des différentes formulations ont été incubées dans 1,5 ml de DMEM pendant 24 heures avant de procéder aux tests de viabilité cellulaire. 24 heures plus tard, les surnageants ont été filtrés à l'aide d'un filtre en membrane de polycarbonate à usage unique de 0,2 µm et 100 µl de chaque condition a été mis en contact avec les cellules (conformément aux directives de la norme ISO 10993-5). Le DMSO a été utilisé comme témoin de mortalité cellulaire. Après 30 minutes d'incubation, la viabilité cellulaire a été évaluée quantitativement en utilisant le réactif Presto Blue, selon le protocole du fournisseur (n=3 pour chaque condition).

9. Évaluation *ex vivo* de la décontamination cutanée

9.1 Préparation des explants de peau

La peau d'oreille de porc a été soigneusement rasée et dermatomée (Dermatome modèle Aesculap GA 630) jusqu'à une profondeur de 500 µm, et des disques circulaires de 2 cm² ont été découpés à l'aide d'un emporte-pièce. L'intégrité de ces explants a été évaluée visuellement avant d'être stockés à -20°C jusqu'à utilisation. Pour les expériences de diffusion, un dispositif VitroPharma® a été utilisé comme système de diffusion cellulaire statique (**Annexe 4**). Les explants de peau ont été positionnés entre les compartiments donneur et récepteur, la surface de l'épiderme faisant face au compartiment donneur. Une solution de PBS 1X (5 mL) a été utilisée comme fluide récepteur, qui était continuellement agitée et maintenue à 37°C ± 1°C conformément aux directives de l'OCDE 428 (**Annexe 3**)⁶⁰.

9.2 Procédure de décontamination

Selon la norme NF X52-122, 5 mg/cm² de POX ont été appliqués sur la peau. Après une exposition de 5 minutes (décontamination d'urgence), la décontamination a été réalisée selon deux méthodes. La décontamination humide impliquait l'application de 102 µL/cm² de chaque formulation (P12F15D3, P12F15L3, P20F9D3 et P20F9L3), de masque peel-off ou d'eau. La décontamination à base de RSDL a été réalisée par l'application de l'éponge sur la peau suivant les recommandations du fabricant c'est-à-dire 2 min. La décontamination sèche a été effectuée en déposant 0,16 g/cm² de poudre de TF. Pour les deux méthodes, le décontaminant a été retiré de la surface de la peau soit 2 minutes après l'application (pour les conditions de décontamination à base d'eau et de poudre de TF), soit 30 minutes après l'application (pour les formulations, le RSDL et le masque peel-off). Enfin, la surface de la peau a été séchée en tapotant avec une compresse non tissée (n=5 pour la décontamination à l'eau et n=6 pour les autres méthodes de décontamination).

9.3 Traitement des échantillons

Pour déterminer la cinétique de pénétration du POX à travers la peau, 500 µL du fluide récepteur ont été systématiquement collectés à intervalles réguliers (1, 2, 4, 6, 8, 10 et 24 heures) et remplacés par un volume équivalent de milieu frais (PBS 1X). Après 24 heures, la peau a été retirée des cellules de diffusion, et sa surface a été essuyée avec une compresse. Les couches de la peau ont ensuite été séparées en trois composants. Le SC a été séparé en utilisant la méthode de l'enlèvement de bande²⁰³, tandis que l'épiderme et le derme ont été obtenus par immersion dans du PBS 1X chauffé à 60°C pendant 1 minute. Pour chacune de ces couches, le POX a été extrait sur une période de 24 heures en utilisant de l'éthanol de grade HPLC.

9.4 Quantification du POX par HPLC-UV

La quantification du POX a été réalisée en utilisant la chromatographie liquide à haute performance avec un détecteur UV (HPLC-UV) sur un système LC Agilent Technologies 1260 Infinity II (Série 1200, Agilent Technologies). Des échantillons (10 µL) ont été injectés sur une colonne C18 Clipeus (5 µm, 100 x 40 mm) chauffée à 40°C, avec un débit de 0,7 mL/min. La phase mobile était composée de 55 % de méthanol (0,5 % d'acide acétique glacial) et de 45 % d'eau milliQ (0,5 % d'acide acétique glacial). Le POX a été détecté à 269 nm avec un temps de rétention de 5,9 minutes²⁰⁴. La linéarité de la méthode a été évaluée pour une concentration de POX dans la plage de 1 à 1000 µg/mL ($R^2 = 0,999$) avec une limite de détection (LOD) de 0,5 µg/mL et une limite de quantification (LOQ) de 1 µg/mL. Cette méthode de quantification a été utilisée pour quantifier le POX dans les essais de décontamination *in vitro et ex vivo*. Dans

le cadre des essais *in vitro* sur lames de verre, la quantité de POX détectée dans les films correspond à la différence entre la fraction totale et celle récupérée à la surface.

9.5 Évaluation de l'efficacité de décontamination *in vitro*

L'efficacité des différentes méthodes de décontamination a été évaluée en quantifiant leur efficacité de décontamination *ex vivo* respective (DE). Elle a été calculée à l'aide de l'équation suivante¹²⁶ :

$$DE(\%) = \frac{(Q3+Q4)_{control} - (Q3+Q4)_{decontaminated}}{(Q3+Q4)_{control}} \times 100$$

Avec Q3 = quantité de contaminant dans les couches cutanées à la fin d'exposition (SC + épiderme + derme) à la fin de l'expérimentation (après 24 heures); Q4 = quantité de contaminant dans le récepteur à la fin de l'exposition ; contrôle = absence de décontamination.

10. Évaluation des capacités de décontamination des formulations *in vivo* chez la souris SKH1

10.1 Animaux

Les souris femelles SKH1 ont été élevées par les laboratoires Charles River (Italie) et hébergées au sein du PBES. Tous les protocoles ont été approuvés par le comité local d'évaluation éthique des animaux (CECCAP_ENS_2018_035) conformément aux lignes directrices de l'Union européenne en matière de soins aux animaux et aux lois françaises. Les souris ont été livrées à l'âge de 7 semaines et acclimatées dans un environnement contrôlé durant 2 semaines afin que chaque souris s'adapte à son nouvel habitat. Les premiers prélèvements sanguins ont été réalisés à la fin de cette période d'acclimatation au niveau du sinus rétro-orbital, sous anesthésie par l'application de tétracaïne au niveau oculaire. Ceci avait pour but d'établir l'état basal du système immunitaire et de l'ACHé. Les essais de toxicité ont débuté lorsque les souris avaient atteint l'âge de 9 semaines, tandis que l'évaluation des capacités de décontamination des formulations a été réalisée lorsque les souris avaient atteint l'âge de 12 semaines. Un groupe distinct de souris SKH1, également âgées de 8 semaines, a été utilisé pour déterminer la DL₅₀ percutanée.

10.2 Évaluation de la biocompatibilité des formulations et du RSDL

Seule la toxicité des formulations P12F15L3 et P20F9D3, ainsi que celle du RSDL, a été évaluée, avec un groupe témoin négatif (PBS 1X). 20 souris ont été réparties en quatre groupes de cinq souris, correspondant chacune à une condition expérimentale. Chaque souris a été anesthésiée par inhalation d'isoflurane (3%) pendant toute la durée de l'expérimentation (30

minutes au total). Chaque condition a été appliquée sur la partie inférieure du dos des souris, couvrant une surface de 1,2 cm de diamètre (50µl pour les formulations). En ce qui concerne le RSDL, un carré de 2,5/2,5 cm de l'éponge a été tapoté durant 10 secondes sur le dos. Toutes les conditions expérimentales ont été retirées après 30 minutes d'application et la surface de la peau a été nettoyée à l'aide d'une compresse.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau du sinus rétro-orbital 1 et 72 heures après l'application des différentes conditions afin de doser le niveau de cytokines inflammatoires (6, 1β et TNF-α) dans le sérum par des tests ELISA. Le suivi des symptômes a été réalisé sur 72 heures en évaluant les critères suivants (**Tableau 21**) :

Symptômes	Score
Peau normale	0
Réaction cutanée mineure - rougeur légère	1
Réaction cutanée modérée - rougeur, desquamation et inflammation	2
Réaction cutanée majeure - saignement, induction d'une plaie, infection	3

Tableau 21 – Liste des symptômes et des scores correspondants pour le suivi clinique au niveau cutané

10.3 Détermination de la DL_{50} percutanée

La détermination de la DL_{50} percutanée du POX a été réalisée selon un protocole bien précis. Des souris SKH1 âgées de 8 semaines ont été exposées au POX durant 24 heures sur la partie inférieure du dos (sous la forme d'un seul dépôt). L'exposition a été réalisée avec des quantités décroissantes de POX sous anesthésie à l'isoflurane (3%) durant 30 minutes. Le but a été de déterminer les doses de POX nécessaires pour observer la mortalité des souris sur une période de 24 heures ainsi que celles qui ont conduit à leur survie. Les différentes doses qui ont été sélectionnées et appliquées étaient de 10 µl = 424.7 µg/kg, 6.6 µl = 280.3 µg/kg, 4.4 µl = 186.9 µg/kg et 2.9 µl = 123.2 µg/kg, valeurs qui ont été déterminées à l'aide de Mr Guilhem Calas du département de Toxicologie et Risques Chimiques – Unité Neurotoxiques à l'IRBA (

Tableau 22). Ces quantités ont été sélectionnées avec un pas de 1.5, respectant une limite de 10 µl pour la dose la plus élevée (un volume plus important n'aurait pas pu être adapté pour une application sur le dos des souris de petite taille) et de 2 µL pour la dose la plus faible (afin de minimiser toute erreur de pipetage).

		VX	POX
DL ₅₀ (µg/kg)	Sous cutanée	15	730.5
	Percutanée	40	1948 (estimation)

Tableau 22 - DL₅₀ sous cutanée et percutanée du VX et du POX au sein de l'IRBA (la DL_{50percutanée} du POX a été estimée selon le facteur entre la DL₅₀ sous cutanée et percutanée du VX)

Le suivi des symptômes a été effectué sur 24 heures. Une souris vivante après 24 heures a été considérée comme telle, tandis que si elle décédait avant ce délai, elle était comptée comme morte.

Le suivi des symptômes de chaque souris contaminée a été réalisé sous forme de score, attribuant un point pour chaque symptôme observé (**Tableau 23**) (n =1 pour chaque dose).

Symptômes	Score
Aucun signe	0
Chute du tonus musculaire	1
Hochement de la tête	1
Cyphose,	1
Fasciculation	1
Tremblements généralisés	1
Phénomène de straub	1
Sialorrhées	1
Détresse respiratoire	1
Lacrymation	1
Décès	10

Tableau 23 – Liste des symptômes correspondant à une crise cholinergique et du score correspond pour le suivi de la contamination des souris au POX

10.4 Contamination et décontamination

Pour la contamination, 8.3 µL de POX (DL_{50 percutanée} = 352.5 µg/kg) a été déposé sur la partie inférieure du dos de chaque souris sous la forme d'un seul dépôt (goutte) sous anesthésie à isoflurane (3%) durant 30 minutes. Le processus de décontamination a eu lieu 5 min après l'application du POX. La décontamination au RSDL a été réalisée par tapotement durant 10 secondes avec l'éponge sur la zone contaminée. Quant aux formulations, 50µl de chaque ont été déposés sur la zone contaminée. Au bout de 30 min après application du contaminant, et

avant le réveil des souris, les différentes méthodes de décontamination ont été retirées de la surface cutanée, suivies d'un nettoyage de la zone contaminée/décontaminée à l'aide d'une compresse. Chaque souris a été placée en cage individuelle durant 24 heures pour éviter toute contamination croisée.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau du sinus rétro-orbital 1 et 72 heures après l'application des différentes conditions afin de mesurer le niveau d'interleukines 6, 1 β et TNF- α dans le sérum par ELISA et le niveau de l'inhibition de l'AChE. Le suivi des symptômes a été réalisé sur 72 heures en évaluant les critères présents dans le **Tableau 23** .

11. Analyses statistiques

L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide de GraphPad Prism Version 9.5 (San Diego, CA, USA). Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Les tests statistiques spécifiques utilisés pour l'analyse sont indiqués dans les légendes de chaque figure. Les résultats ont été analysés statistiquement par des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis suivis de tests post-hoc, tels que le test de Dunn's.

RESULTATS

I. Conception et caractérisation d'une nouvelle formulation filmogène à base de TF comme outil de décontamination face au POX

II. Comparaison de l'efficacité de décontamination *ex vivo* des formulations filmogènes de TF et de Terre de Sommières face au POX sur des explants de peau d'origine porcine

III. Évaluation du pouvoir décontaminant face au POX des formulations filmogènes *in vivo* chez des souris SKH1

Résultats 1 : Conception et caractérisation d'une nouvelle formulation filmogène à base de TF comme outil de décontamination face au POX

1. Introduction

L'objectif principal de cette thèse est de développer une nouvelle méthode de décontamination cutanée face au POX, qui combine les avantages des méthodes existantes tout en limitant leurs désavantages. Le développement de telles méthodes de décontamination face aux COPs représente un enjeu important pour l'armée française. Une des approches avec un fort potentiel repose sur l'emploi de polymères filmogènes, tel que le PVA. Ces derniers sont couramment utilisés dans le domaine biomédical, notamment pour le traitement des plaies, en raison de leur biocompatibilité et de la possibilité d'intégrer des molécules pro-cicatrisantes²⁰⁵. Dans ce premier chapitre, nous nous sommes concentrés sur l'utilisation d'un agent filmogène tel que le PVA, afin d'obtenir une formulation qui, une fois sèche, forme des films facilement retirables d'une surface^{206,207}. L'intérêt de l'armée pour l'utilisation de la TF en tant qu'adsorbant trouve son application au sein de nos formulations pour la décontamination du POX.

En tenant compte des avantages et inconvénients des différentes méthodes de décontamination existantes (RSDL, eau savonneuse, TF sous forme de poudre), le développement de ces nouvelles formulations fait l'objet d'une sélection rigoureuse. Parmi les critères pris en compte, on trouve : la limitation au maximum du nombre de composants afin de concevoir un outil facile à produire et à moindre coût, qu'il soit facilement manipulable et utilisable pour une décontamination cutanée et posséder des capacités de séquestration contre le POX afin de mieux gérer les risques de nouvelles contaminations.

Dans ce premier chapitre de résultats, nous nous intéressons en particulier à la conception et à la sélection des formulations, ainsi qu'à leur caractérisation structurale et mécanique afin de valider leur potentiel d'utilisation. Leur compatibilité sur des explants de peau de porc permettra d'évaluer la capacité d'adhésion et de retrait de la surface cutanée.

Tous les résultats, à l'exception de l'étude rhéologique et de la stabilité des formulations, font l'objet d'une soumission dans le « Journal of Hazardous Materials ».

2. Résultats

2.1 Développement et sélection des formulations filmogènes

Dans un premier temps, plusieurs critères ont été évalués lors d'une étude préliminaire afin de restreindre le nombre de formulations à examiner dans cette étude. Une exploration de diverses concentrations de PVA, permettant la formation de films, de TF, pour atteindre des capacités de décontamination satisfaisantes, ainsi que de tensioactifs tels que le décyl glucoside (DG) ou le lauryl glucoside (LG), a donc été réalisée.

En ce qui concerne la concentration de PVA, les formulations ont montré une viscosité très faible et un manque de capacité à former des films en dessous de 12 wt% de PVA, tandis qu'elles sont devenues difficiles à manipuler (très haute viscosité) au-dessus de 20 wt%. Dans cette plage, les formulations à base de PVA ont été facilement manipulées, quelle que soit la concentration de PVA, et ont pu être appliquées et retirées de surfaces lisses telles que du verre en raison de leurs propriétés filmogènes (**Tableau 24 A**). La quantité de TF dans le mélange a été déterminée d'après les travaux de Danoy *et al.*, 2022, et a varié de 9.1 à 15 wt%⁶⁰. L'incorporation de TF dans ces formulations n'a pas donné de propriétés filmogènes satisfaisantes par rapport aux formulations contenant uniquement du PVA. Le retrait complet d'une surface lisse a été compliqué en raison de leur fragilité après séchage (**Tableau 24 B**).

Afin d'obtenir des formulations plus homogènes et filmogènes, des tensioactifs tels que le LG et le DG ont été choisis et ajoutés à la fois aux formulations de PVA pur et à celles supplémentées en TF. Les tensioactifs ont été utilisés à des concentrations très faibles, spécifiquement 3 wt% (concentration à laquelle ils sont utilisés dans les cosmétiques), afin de minimiser toute toxicité potentielle pour la peau lors de leur application. De façon nette, l'incorporation de tensioactifs a permis d'obtenir des films faciles à manipuler et à appliquer pour la majorité des formulations testées (**Tableau 24 C, D et E**). Cependant, les formulations les plus concentrées en PVA et TF sont restées difficiles à appliquer en raison de leur forte viscosité et de leur caractère cassant après séchage (**Tableau 24 F**).

Les temps de séchage des formulations à base de PVA seul et de PVA avec TF et tensioactifs variaient entre 4.8 et 7.2 minutes à 32°C (température physiologique de la peau). L'ajout de TF a permis de réduire considérablement le temps de séchage (5.2 min pour P12 contre 3.5 min pour P12F9D3) (**Tableau 24 A et E**).

La capacité de décontamination de ces formulations face au POX a été évaluée par un test simple de contamination et de décontamination sur des lames de verre, permettant de sélectionner celles avec une décontamination supérieure à 95 %. Il a été observé que toutes les formulations formant des films présentaient des capacités de décontamination, même

celles composées uniquement de PVA. Cependant, l'efficacité de la décontamination était étroitement liée à leur composition spécifique. L'ajout de TF et de tensioactifs (LG ou DG) a considérablement amélioré la capacité de décontamination du POX (plus de 95 %) par rapport aux formulations composées uniquement de PVA, qui n'atteignaient pas plus de 88 %. De même, l'augmentation de la teneur en TF a permis d'améliorer de manière significative la décontamination, avec 84.1 ± 1.2 % de POX dans la formulation pour P12F9D3 contre 97.9 ± 0.5 % pour la formulation P12F15D3. Une augmentation significative a été observée pour les formulations composées de LG. De manière intéressante, les formulations avec la concentration la plus élevée de PVA, supplémentées de 9.1 % de TF, ont montré des résultats de décontamination similaires à ceux avec des concentrations inférieures de PVA. L'utilisation d'un masque peel-off commercial a montré, dans ce contexte, un taux de décontamination de seulement 81 ± 1.4 %, ce qui était statistiquement inférieur aux formulations P12F15D3, P12F15L3, P20F9D3 et P20F9L3 (**Tableau 24 G**). De plus, les concentrations intermédiaires de PVA et de TF n'ont pas donné de résultats prometteurs en termes de décontamination.

	Formulation	Film-forming properties	Drying time (min)	Quantity of POX (%)	
				Film	Surface
A	P12	+	5,2 ± 0,9	80 ± 5,5 ^{**α,β}	20 ± 5,5
	P20	+	7,2 ± 0,4	84 ± 3,3	16 ± 3,3
B	P12F9	±	X	X	X
	P12F15	±	X	X	X
	P20F9	±	X	X	X
	P20F15	-	X	X	X
	P12D3	+	6,6 ± 0,4	82 ± 6,5 ^{**α,β}	18 ± 6,5
	P12L3	+	6,5 ± 0,4	87,8 ± 3,8	12,2 ± 3,8
C	P20D3	+	5,8 ± 0,3	76,8 ± 2,4 ^{**δ}	23,2 ± 2,4
	P20L3	+	6,1 ± 0,4	80,3 ± 3,8 ^{**δ}	19,7 ± 3,8
	P12F9D3	+	3,5 ± 0,3	84,1 ± 1,2 ^{*α}	15,9 ± 1,2
	P12F9L3	+	3,3 ± 0,04	85,8 ± 0,4 ^{*β}	14,2 ± 0,4
	P12F15D3	+	6,7 ± 0,4	97,9 ± 0,5^{*#}	2,1 ± 0,5
D	P12F15L3	+	6,3 ± 0,8	98,5 ± 0,4^{*#}	1,5 ± 0,4
	P20F9D3	+	4,8 ± 0,1	96,6 ± 0,2^{***}	3,4 ± 0,2
E	P20F9L3	+	6,5 ± 0,4	95,8 ± 0,3^{***}	3,4 ± 0,3
	P20F15D3	-	X	X	X
F	P20F15L3	-	X	X	X
G	Peel-off mask	+	3,7 ± 0,4	81 ± 1,4	20 ± 1,4

Tableau 24 - Développement et sélection des formulations en fonction de leurs propriétés filmogènes ("+" pour filmogène, "±" pour friable et "-" pour non filmogène), du temps de séchage (à 32°C) et de leurs capacités de décontamination contre le POX sur des lames de verre (n=3 pour chaque test). P = PVA, F = FE, L = LG et D = DG. Les résultats des capacités de décontamination ont été analysés statistiquement en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi de tests de comparaisons multiples de Dunn's. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Les différences statistiques sont indiquées par des symboles : "#" pour les conditions comparées au masque peel-off, "α" pour les conditions comparées à P12F15D3, "β" pour les conditions comparées à P12F15L3 et "δ" pour les conditions comparées à P20F9D3 et P20F9L3. * : p < 0,05, ** : p < 0,01.

En se basant sur les propriétés filmogènes, le temps de séchage et la capacité de décontamination, quatre formulations ont été sélectionnées pour évaluations ultérieures : P12F15D3, P20F9D3, P12F15L3 et P20F9L3, qui ont décontaminé respectivement à 97,9 ± 0,5 %, 96,6 ± 0,2 %, 98,5 ± 0,4 % et 95,8 ± 0,3 %.

2.2 Propriétés *rhéologiques* des formulations

Les propriétés rhéologiques des formulations développées ont été analysées afin de déterminer les modules d'élasticité (G') et de viscosité (G''). A l'exception de deux formulations (P20L3 et P20F9DL3), les résultats obtenus ont montré que les formulations présentent des propriétés viscoélastiques caractéristiques d'un hydrogel, avec un module élastique (G') supérieur au module de viscosité (G'') (**Tableau 25**). Ces résultats devront être répétés et complétés afin de valider les propriétés rhéologiques des formulations.

Formulation	Shear Storage G' (Pa)	Shear Loss modulus G'' (Pa)
P12	413,14	138,83
P20	314,47	292,23
P12D3	342,68	82,88
P12L3	487,1	102,8
P20D3	419,34	359,66
P20L3	291,54	291,54
P12F15D3	288,82	145,03
P12F15L3	277,66	183,93
P20F9D3	376,43	179,87
P20F9L3	902,62	903,10

Tableau 25 – Évaluation des propriétés rhéologiques des formulations par la détermination des modules d'élasticité G' et de viscosité G'' à température ambiante (résultats préliminaires, n=1 pour chaque formulation).

2.3 Structure et composition des formulations

Une analyse en microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence la composition et la structure de la TF (sous forme de poudre) ainsi que des quatre formulations sélectionnées. Leur composition chimique, établie par analyse EDX, a montré la présence de différents minéraux. Le Silicium (Si) était prédominant tandis que l'Aluminium (Al) et le Magnésium (Mg) étaient également présents en proportions élevées (

Figure 27 **A**).

La surface spécifique de la TF a été analysée par la méthode BET et a montré une surface spécifique élevée de 209.5036 m²/g, ainsi qu'une microporosité de 0.035117 cm³/g.

Indépendamment de la concentration de PVA (12 ou 20 wt%) et du tensioactif, les formulations testées présentaient une structure homogène (

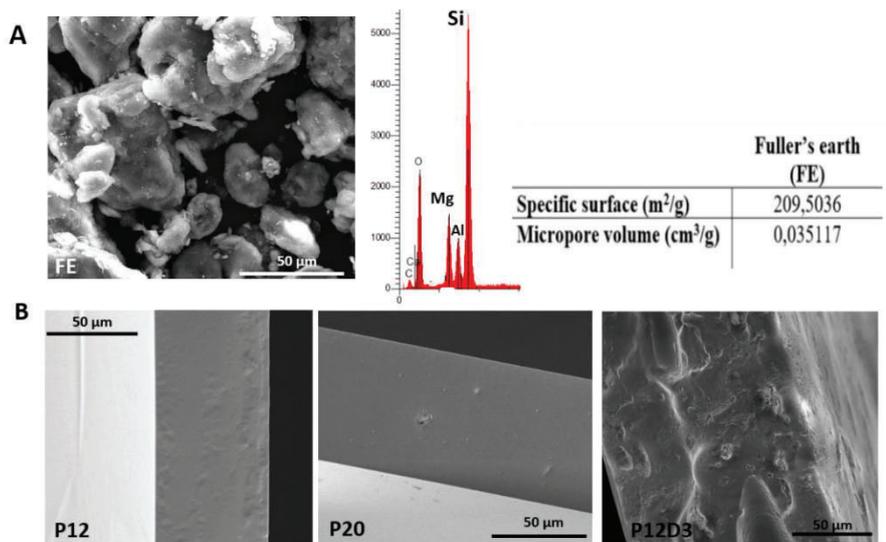
Figure 27 **B**). Dans les formulations composées uniquement de PVA, l'analyse élémentaire globale n'a révélé que la présence d'oxygène. L'ajout de tensioactif a induit la présence de cuivre dans les formulations (

Figure 27 **B**). L'incorporation de la TF dans les formulations était logiquement indiquée par la présence de Si, Mg et Al (

Figure 27 **C**).

La distribution des particules dans les films résultants a été confirmée par une analyse en rétro diffusion (

Figure 27 **D**). De manière intéressante, le type de tensioactif n'a pas induit de différences dans la répartition des particules de TF au sein des films résultants.



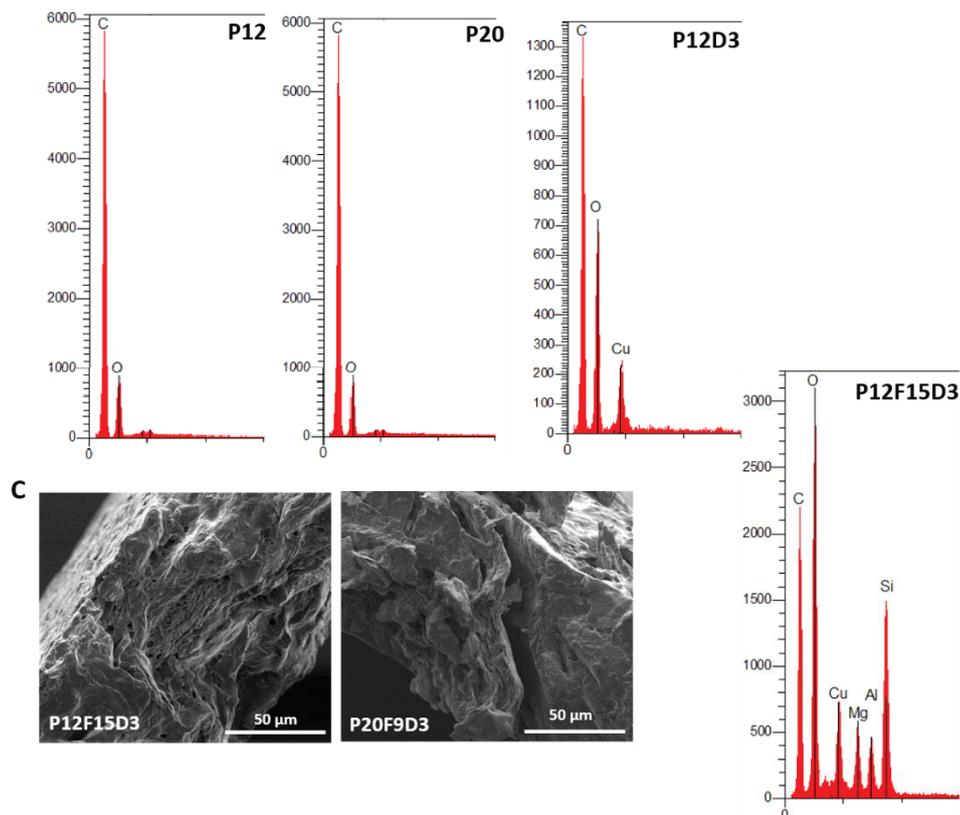


Figure 27 - Analyse de la structure et de la composition de la formulation par MEB couplée à un détecteur EDX. A) Images de la TF sous forme de poudre, spectre EDX et analyse de la surface spécifique et du volume de micropores des particules de TF, **B)** Images des formulations P12, P20 et P12D3 et leur spectre EDX, **C)** Images des formulations P12F15D3 et P20F9D3 et spectre EDX de P12F15D3, **D)** Images de rétrodiffusion de P12F15D3 (particules de TF indiquées par des flèches rouges). Mg pour le magnésium, Al pour l'aluminium, Si pour le silicium, Cu pour le cuivre, O pour l'oxygène, C pour le carbone. Barre d'échelle = 50 µm

2.4 Essai de résistance à la traction et de pelage

Les propriétés mécaniques des films ont été évaluées pour garantir leur facilité de manipulation après séchage. Le module de Young, qui reflète la rigidité globale, a été déterminé à partir des courbes de traction de chaque formulation. L'augmentation de la concentration en PVA a montré une augmentation statistiquement significative de la rigidité avec un module de $5,28 \pm 0,61$ MPa pour P12D3 et $10,7 \pm 0,72$ MPa pour P20D3, bien que cette augmentation n'ait pas été observée pour les mêmes formulations composées de LG (**Figure 28 A**). L'incorporation de la TF dans les formulations a conduit à une augmentation significative de la rigidité pour la formulation P20L3 supplémentée de 9.1 wt% de TF (**Figure 28 A**). De même, des différences significatives ont été observées entre les formulations

contenant de la TF et le masque peel-off commercial, avec un module de $0,18 \pm 0,02$ MPa. Les capacités d'allongement au point de rupture de chaque formulation ont été évaluées et ont montré que les formulations composées de TF (P12F15D3 et P20F9D3) présentaient des capacités d'allongement significativement plus faibles par rapport au masque peel-off ($93,91 \pm 9,07$ %), mais leur grande rigidité permettait aux films de ne pas se casser facilement (**Figure 28 B**).

Pour évaluer la capacité d'adhérence des formulations après application sur la peau, des tests de décollement ont été réalisés sur des explants de peau provenant d'oreille de porc (**Figure 28 C**). Les tests ont révélé que les formulations, avec ou sans TF, présentaient des forces maximales d'adhérence similaires sur la peau, avec des valeurs atteignant jusqu'à $1,4 \pm 0,3$ N pour la formulation P20F9D3 (**Figure 28 C**). Indépendamment des concentrations de PVA et de TF, les formulations pouvaient être facilement enlevées en une seule fois. De plus, les tests de décollement effectués sur le masque peel-off n'ont démontré aucune différence statistique par rapport aux formulations contenant de la TF, confirmant que l'application et le retrait des formulations sont compatibles avec l'application sur la peau. Il est important de noter que le retrait des formulations de la surface de la peau ne semble pas altérer l'intégrité de la barrière cutanée, y compris le SC et l'épiderme (**Figure 29**).

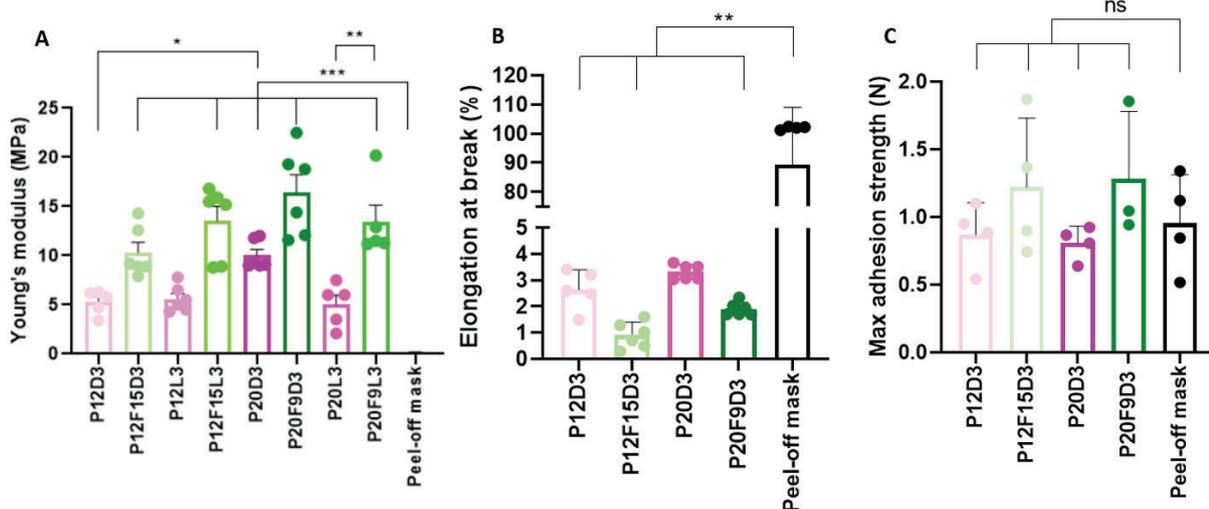


Figure 28– Résistance à la traction et tests de décollement des formulations. A) Détermination du module de Young de chaque formulation (n=5 pour P12D3 et n = 6 pour P12F15D3, P20D3, P20F9D3 et le masque peel-off) B) Allongement au point de rupture de chaque formulation (n=5 pour P12D3 et n=6 pour P12F15D3, P20D3, P20F9D3

et le masque peel-off), C) Détermination de la force d'adhérence maximale (N) de chaque formulation à l'aide du test de décollement à 180° (n=4 pour chaque formulation). Les résultats ont été analysés statistiquement en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi de tests de comparaisons multiples de Dunn's. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Pour les graphiques B et C, les conditions ont été statistiquement comparées au masque peel-off. ns: non significatif, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.005 and ****: p < 0,001

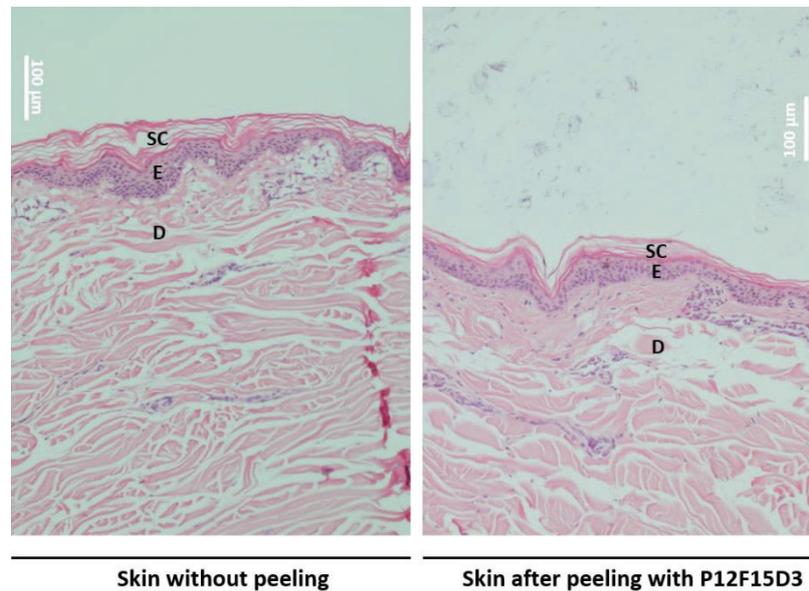


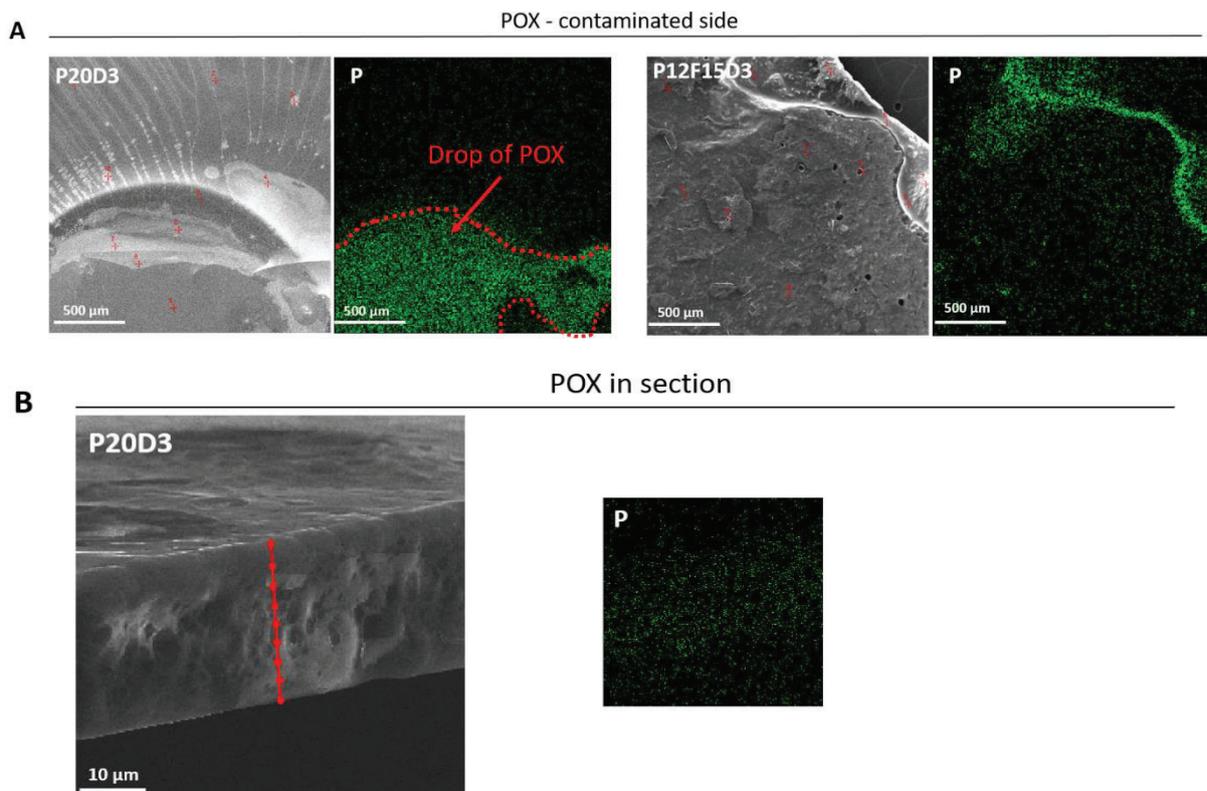
Figure 29- Coupes histologiques d'explants de peau d'origine porcine sans test de pelage (témoin) et après le test de pelage avec la formulation P12F15D3 (n=1). SC pour stratum corneum, E pour épiderme et D pour derme. Barre d'échelle = 100 μ m.

2.5 Pouvoir séquestrant des formulations

Le phosphore (P), qui est absent du PVA, de la TF et des différents tensioactifs (

Figure 27), a été utilisé pour tracer la présence et la distribution du POX à la surface et à l'intérieur des sections transversales des films ayant été utilisés pour décontaminer une surface, afin de déterminer leur pouvoir de séquestration. Dans les formulations composées de PVA et de tensioactif, le POX était présent sous forme de gouttes, en très grandes quantités (**Figure 30 A**). En revanche, les formulations contenant de la TF présentaient beaucoup moins de gouttes de POX, le POX étant plus précisément localisé au bord du film (**Figure 30 A**).

Les différents éléments composant la TF (Mg, Al et Si), ainsi que le phosphore, ont été détectés dans les analyses en coupe transversale (**Figure 30 B**). Fait intéressant, le phosphore était présent de façon homogène au niveau des coupes (c'est-à-dire à l'intérieur des films) dans les formulations contenant de la TF (P12F15D3), mais aussi dans les formulations sans TF (P20D3), bien qu'à des niveaux moins élevés (**Figure 30 B**). Ces résultats sont en corrélation avec les capacités de décontamination obtenues dans le **Tableau 26**, montrant que même les formulations de PVA permettent de décontaminer à un niveau basal en le séquestrant. En lien, les observations sur l'emplacement du POX ont montré qu'il ne coïncidait pas spécifiquement avec les différents minéraux indiquant la localisation de la TF (**Figure 30 B**).



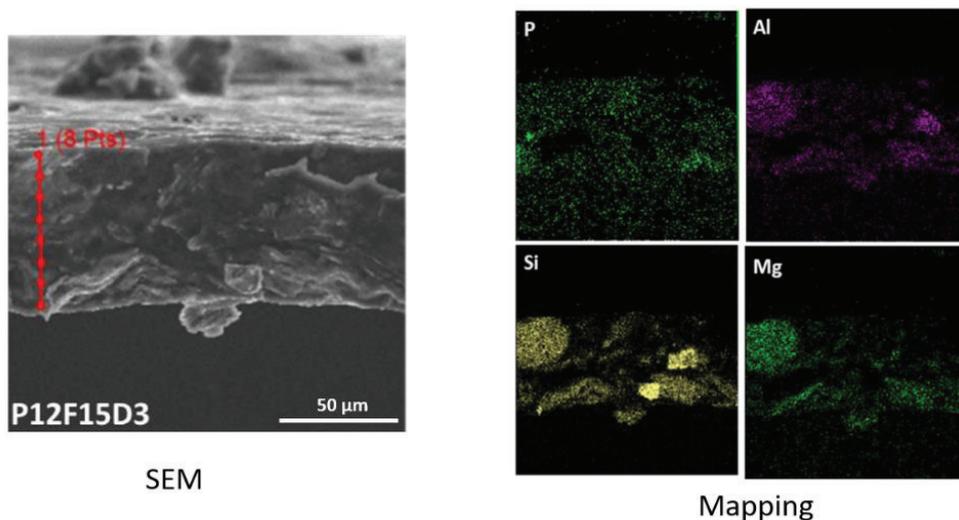
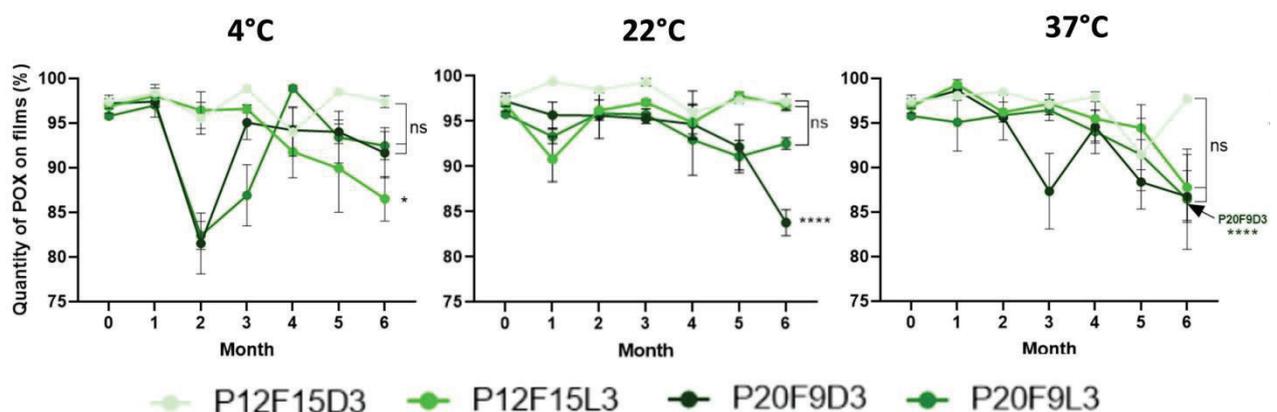


Figure 30- Micrographie et cartographie EDX des formulations contaminées. A) Localisation du POX à la surface contaminée des formulations P20D3 et P12F15D3, B) Localisation du POX à l'intérieur des formulations P20D3 et P12F15D3 en coupe transversale. P pour le phosphore, Si pour silicium, Al pour aluminium et Mg pour magnésium.

2.6 Stabilité des formulations

La stabilité de quatre formulations à savoir P12F15D3, P12F15L3, P20F9D3 et P20F9L3 a été étudiée sur une période de 6 mois à différentes températures (4, 22 et 37°C). Les propriétés filmogènes ainsi que leur stérilité ont été conservées au cours de cette période, quelle que soit la température de conservation (données non montrées).

En ce qui concerne leur capacité de décontamination, des disparités d'efficacité face au POX ont été observées pour de mêmes formulations au cours du temps (**Figure 31**). Au cours du deuxième mois, certaines formulations (P20F9D3 et P20F9L3) ont montré des diminutions importantes de leur capacité de décontamination (à 4°C), avec une récupération progressive au cours des mois suivants (**Figure 31**). Cependant, la même formulation P20F9D3 a montré une diminution significative à 22 et 37°C, tandis qu'elle a été stable à 4°C au bout des 6 mois.



A 4 °C, seuls les films de P12F15L3 ont présenté une diminution significative de leur capacité à capturer le POX après une période de stockage de 6 mois.

Figure 31 – Évolution des propriétés de décontamination *in vitro* des formulations à différentes températures (4, 22 et 37°C) sur une période de 6 mois (n= 3 pour chaque test). Les résultats ont été analysés statistiquement en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi de tests de comparaisons multiples de Dunn's. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Les résultats pour chaque formulation ont été comparés statistiquement au mois 0 et mois 6. ns: non significatif, *: p <0.05 et ****: p < 0,001

Les analyses de rétrodiffusions effectuées pour évaluer la sédimentation des formulations au cours du temps à différentes températures ont montré quelques différences entre les formulations (**Figure 32**). Alors que les courbes ont présenté des similitudes au cours du temps pour les formulations P12F15D3 et P20F9L3, des variations semblent apparaître pour les deux autres formulations. On note une augmentation de la sédimentation au cours du temps de P12F15L3 à 37°C. Parallèlement, quelle que soit la température de conservation du P20F9D3, une augmentation de la sédimentation des particules de TF a été visualisée au cours du temps (**Figure 32**).

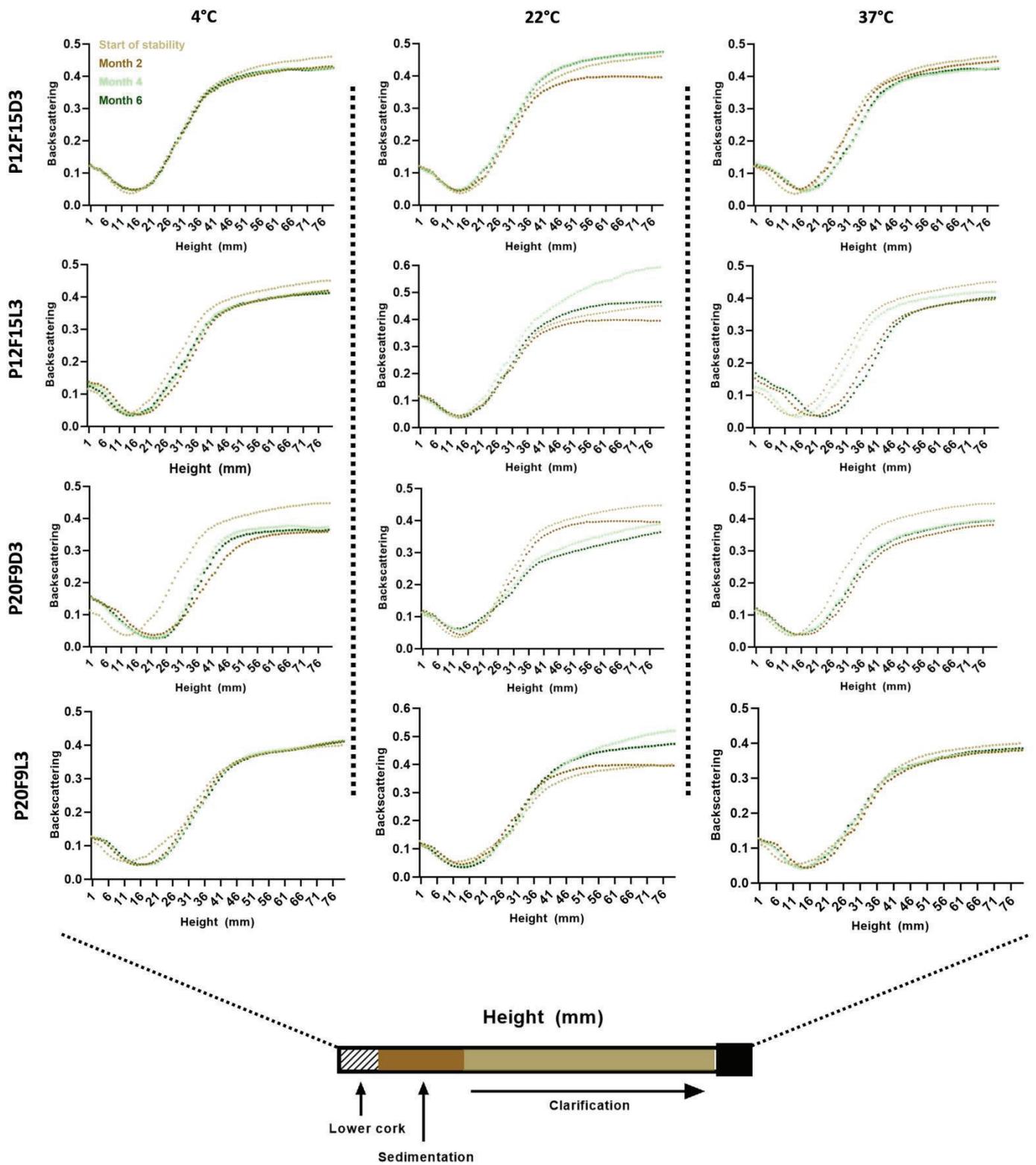


Figure 32 – Évolution de la sédimentation de la TF au sein des formulations à différentes températures (4, 22 et 37°C sur une période de 6 mois (n=3 pour chaque test).

3. Discussion

L'utilisation de polymères filmogènes tel que le PVA a connu une croissance significative au niveau mondial ces dernières années, notamment dans le domaine des applications cutanées^{205,206}. Ces avancées ont conduit au développement d'un nouvel outil de décontamination cutanée en réponse aux COPs. Les nouvelles formulations que nous décrivons, composées de PVA en tant qu'agent filmogène, permettent l'incorporation de la TF ainsi que d'un tensioactif pour conférer des propriétés décontaminantes. Comme illustré dans le **Tableau 24**, les formulations composées uniquement de PVA présentent déjà des capacités de décontamination non négligeables. Il est intéressant de noter que l'ajout d'un tensioactif (LG ou DG) ne conduit pas à une amélioration significative de ces capacités de décontamination (**Tableau 24 A et B**). Ces résultats sont surprenants, car les solutions de PVA pur sont intrinsèquement hydrophiles, tandis que les COPs sont principalement lipophiles. L'objectif initial de l'ajout de tensioactif était d'améliorer les interactions entre les deux composés grâce à leur structure amphiphile, réduisant la tension superficielle au contact du POX et des formulations^{208,209}. Néanmoins, les tensioactifs DG ou LG ont tout de même eu un effet positif sur les formulations, en permettant la création de formulations facilement manipulables, applicables avec des propriétés filmogènes satisfaisantes (**Tableau 24 B, D et E**). On peut suggérer que leur incorporation favorise la stabilisation des composés dans les formulations ainsi qu'une meilleure homogénéité des particules de TF, ce qui a été observé lors des essais de contamination et de décontamination.

Malgré les inconvénients associés à l'utilisation de la TF sous forme de poudre, sa capacité de décontamination est bien établie²¹⁰. La TF est bien connue pour ses propriétés adsorptives et est utilisée par le personnel militaire sur le terrain comme outil de décontamination à sec¹⁴¹. En plus de son efficacité contre les COPs, la TF a démontré une large gamme de capacités de décontamination de divers agents chimiques tels que les agents chimiques de type vésicant¹⁰⁰. L'objectif de cette étude est d'évaluer leur capacité adsorptive lorsqu'ils sont intégrés dans un environnement différent. L'incorporation dans le PVA, en combinaison des tensioactifs, a permis initialement la création de formulations facilement manipulables, tant en termes de viscosité que de propriétés filmogènes bien préservées (**Tableau 24 D et E**). De plus, les résultats montrent que leur application conduit à une décontamination accrue du POX. L'augmentation de la concentration de TF de 9.1 à 15 wt% a en effet amélioré les propriétés de décontamination dans les formulations de PVA moins concentrées (**Tableau 24 D**). Ces capacités de décontamination sont probablement renforcées par une quantité accrue de particules de TF, entraînant une plus grande surface spécifique capable d'adsorber des quantités plus importantes de POX. Cependant, l'augmentation de la concentration en TF n'a

pas pu être atteinte dans les formulations de PVA concentrées (20 wt%). De manière intéressante, nos résultats montrent également que l'inclusion de la TF dans une matrice de polymères n'affecte pas son potentiel d'adsorption du POX, tout comme cela a été le cas pour les suspensions de TF développées par Danoy *et al.*

L'avantage de séquestrer le POX au sein des films formés après application est double : il permet de piéger le contaminant, prévenant ainsi une nouvelle contamination (ce qui facilite la gestion des déchets contaminés et protège le personnel en contact), et limite autant que possible les formes de pneumonie dues à une exposition élevée (localisation des macrophages chargés de fer dans les tissus pulmonaires) et la génération de poussières recontaminantes^{117,142}. Nos résultats montrent que lorsqu'il est intégré dans des formulations filmogènes composées de PVA et de tensioactifs, la TF permet de séquestrer des quantités plus importantes de POX par rapport aux formulations composées uniquement de PVA et de tensioactifs (**Figure 30 B**). L'adsorption du POX par les particules de TF limite la présence du POX à la surface du film. En l'absence de TF, le POX a plus de chances d'être localisé sous forme de gouttes à la surface du film, probablement en raison de l'immiscibilité entre la phase lipophile du POX et hydrophile de la matrice de PVA (**Figure 30 A**). Ces résultats corroborent ceux obtenus dans le **Tableau 24**, où même si le POX se retrouve sous forme de goutte, les formulations peuvent permettre le retrait de celui-ci et, de façon surprenante, du POX peut se retrouver à l'intérieur des films, dispersés de façon homogène.

Au-delà de la teneur en TF dans les formulations, nos observations indiquent également que le recouvrement du POX par les formulations contenant de la TF lors du processus de décontamination conduit à son étalement sous-jacent, contrairement aux formulations ne contenant pas de TF. Cet étalement, associé à une forte adhérence attribuée aux propriétés filmogènes du PVA et à la viscosité des formulations, suggère que les capacités de décontamination ne sont peut-être pas uniquement dues au pouvoir adsorbant de la TF, mais également à un problème physique indéterminé.

Un des critères cruciaux pris en compte dans le développement de solutions de décontamination filmogènes est leur temps de séchage. Dans notre cas, les temps obtenus à 32°C (moins de 7 minutes) démontrent leur adéquation à une utilisation sur le terrain par les militaires. Cependant, il est important de reconnaître une limitation : les temps de séchage ont été évalués pour une épaisseur fixe de 150 µm, ce qui peut ne pas être représentatif des conditions réelles d'application sur le terrain et donc entraîner des temps de séchage différents.

La conception de nouveaux outils de décontamination pour une application cutanée doit également prendre en compte des paramètres assurant une utilisation facile et efficace, notamment un processus de pelage efficace et homogène. Bien qu'il soit reconnu que les formulations composées d'un seul polymère filmogène peuvent présenter une résistance mécanique limitée^{183,211}, celles élaborées à partir de PVA complété par de la TF et d'un tensioactif présentent des valeurs allant jusqu'à 16,45 MPa (**Figure 28 A**). Comme rapporté par Nomicisio *et al.*, les argiles fibreuses, peuvent aisément diffuser au sein de matrices polymériques en formant des liaisons hydrogène, évitant leur floculation au sein de ce réseau. Ceci permet d'obtenir un effet de renforcement mécanique important^{140,212}. Ces résultats garantissent leur utilisation appropriée, car ils peuvent être pelés d'une surface cutanée sans se casser ni s'effriter (**Figure 28 B**). L'avantage de cette rigidité est qu'il n'est pas nécessaire de considérer l'ajout d'autres composants, ce qui entraînerait des coûts supplémentaires et des effets toxiques associés.

Les conditions de stockage thermique ont un impact crucial sur la durée de conservation des produits, qu'ils relèvent des domaines biomédical, pharmaceutique ou encore en dermo-cosmétique. Les recommandations concernant la conservation du RSDL ont indiqué qu'il pouvait être préservé pendant au moins 4 ans, à une plage de température comprise entre 15 à 30°C. Des augmentations de température pouvant aller jusqu'à 46°C sur une journée n'ont pas eu d'incidence sur sa stabilité chimique. Cependant, un stockage persistant à des températures supérieures à 30°C a notablement réduit la durée de conservation²¹³. Comme nous l'avons vu, les différentes formulations ont démontré une stabilité variable à des températures distinctes sur une période de 6 mois, avec certaines formulations qui ne semblent pas perdre en stabilité au cours de cette période. Leur conservation devra être prolongée dans le temps afin de permettre une comparaison d'efficacité avec celle du RSDL.

Les nombreux effets de la température sur les propriétés de décontamination peuvent potentiellement être expliqués par le phénomène de sédimentation de la TF au sein des formulations. Il convient de noter qu'une altération du PVA due à l'élévation de la température ne semble pas plausible selon les données de la littérature. Seules des températures particulièrement élevées (>300 °C) sont susceptibles de provoquer une dégradation du PVA²¹⁴. En ce qui concerne la vitesse de sédimentation de la TF au sein des formulations, celle-ci peut dépendre de plusieurs paramètres tels que sa distribution particulière, sa concentration en particule au sein de la matrice, la viscosité du milieu et la température, pouvant compliquer la re-suspension des particules du TF. En effet, les résultats mettent en évidence une sédimentation plus prononcée pour certaines formulations à 37°C. Donc, une augmentation de la sédimentation pourrait, d'une part, entraîner des difficultés de re-suspensions de la TF

et par conséquent induire des prélèvements hétérogènes lorsque l'on souhaite évaluer les propriétés de décontamination. D'autre part, il est à considérer que la sédimentation de la TF pourrait mener à la formation d'agrégats, susceptibles d'influencer leurs caractéristiques, telles que leur surface spécifique, jouant ainsi un rôle important dans leurs capacités d'adsorption. Malheureusement, de simples analyses en turbidimétrie ne permettent pas de visualiser la présence de tels agrégats. Idéalement, des analyses plus approfondies, telles que la diffraction à rayon X^{215,216}, permettrait de visualiser la dispersion plus précise des particules de TF. Ces observations suggèrent l'importance de considérer tous ces paramètres lors de l'élaboration de ce type de formulation afin d'assurer leur applicabilité sous différentes conditions environnementales telles que les pays chauds, humides ou froids.

4. Évaluation critique

4.1 Hydrogel ou formulation ?

Au sein du chapitre 3 de notre introduction, nous avons exposé la démarche qui a conduit à la conception d'une nouvelle méthode de décontamination sous forme d'hydrogel, un biomatériau sélectionné pour sa compatibilité avec notre étude. L'objectif était de concevoir une méthode de décontamination innovante en limitant au maximum le nombre de composants, afin de maîtriser les coûts, de réduire les effets toxiques associés, et de faciliter leur développement, tout en obtenant des produits finaux adaptés à une application cutanée et efficace face au POX. Cette approche nous a amenés à élaborer des formulations constituées d'un unique polymère, le PVA, enrichi de surfactants et de TF en solution aqueuse. Aucun agent réticulant n'a été ajouté au sein des formulations, pouvant ainsi privilégier la formation d'un hydrogel physique.

Ceci nous amène à nous poser quelques questions sur la nature du réseau polymérique de nos formulations afin de considérer nos formulations comme des hydrogels. Et plus précisément:

- Peut-on considérer qu'une solution de PVA, en elle-même, peut former un réseau tridimensionnel, justifiant ainsi sa classification en tant qu'hydrogel physique ?
- La composition chimique des surfactants (DG et LG) a-t-elle la capacité d'interagir avec le PVA, permettant ainsi la formation d'un hydrogel ?

Ces questions peuvent trouver réponse par le biais d'analyses complémentaires, telles que l'examen approfondi des propriétés rhéologiques des formulations, ainsi que l'application de techniques de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)²¹⁷. Ces méthodes fourniront des informations structurelles, notamment sur la composition chimique et

mettront en lumière les points de réticulation entre les différents composants, que ce soit entre les polymères de PVA ou entre le PVA et les surfactants.

Dans notre contexte, afin d'éviter toute confusion, nous avons choisi de désigner nos solutions développées sous le terme de "formulation" plutôt que "d'hydrogel".

4.2 Effet peeling des formulations

Bien que les résultats préliminaires indiquent que les formulations n'altèrent pas la barrière cutanée, il serait pertinent de confirmer cette observation en reproduisant nos tests, tout en procédant à une mesure de l'épaisseur du SC. Cela permettrait de vérifier que les formulations n'engendrent pas les mêmes effets qu'un tape-stripping.

4.3 Capacité de séquestration du POX

Certes, les résultats obtenus démontrent que le POX est séquestré au sein des formulations, il est également observé qu'une quantité résiduelle demeure en surface des films contaminés, quelle que soit la composition des formulations. Il aurait été intéressant de déterminer, par le biais d'une étude en analyse élémentaire (microscopie électronique à balayage couplée à une sonde EDX), si une formulation utilisée pour décontaminer, séchée et retirée peut potentiellement entraîner une nouvelle contamination. Ce sera à partir de ce constat que nous pourrons confirmer le pouvoir séquestrant de ces formulations.

Résultats 2 : Comparaison de l'efficacité de décontamination *ex vivo* des formulations filmogènes de Terre de foulon et de Terre de Sommières face au POX sur des explants de peau d'origine porcine

1. Introduction

Diverses méthodes de décontamination cutanée ont été élaborées pour atténuer l'absorption cutanée des agents chimiques de guerre²¹⁸. Parmi ces méthodes, on distingue l'application du RSDL, une éponge imbibée d'oxime qui élimine et neutralise les agents chimiques de guerre²¹⁹. Par ailleurs, les techniques de décontamination à sec impliquent l'utilisation de phyllosilicates, en particulier la TF, qui possède des propriétés d'adsorption et est couramment utilisée par l'armée, que ce soit sous forme de poudre libre ou intégrée dans des gants poudreux.

De manière générale, les caractéristiques de gonflement et d'adsorption d'une argile dépendent de sa structure intrinsèque et de sa composition minérale. Il s'avère donc pertinent d'étudier des phyllosilicates de natures différentes pour la décontamination cutanée d'un même composé chimique. La comparaison des capacités adsorbantes permettrait de déterminer le type de phyllosilicate le plus à même d'assurer une décontamination efficace.

Dans ce second chapitre de résultats, nous focalisons notre attention sur la comparaison de l'efficacité de décontamination face au POX des formulations filmogènes composées de TF et de Terre de Sommières (TS). Puis, la biocompatibilité de ces formulations sera évaluée *in vitro* sur des fibroblastes humains primaires afin de déterminer leur potentiel d'application sur des explants de peau de porc *ex vivo*. Les tests de diffusion du POX à travers la peau ont été analysés au moyen d'une méthode de cellule de Franz miniaturisée de VitroPharma (**Annexe 4**)²²⁰, cela afin d'établir la cinétique de pénétration du POX en présence ou en l'absence d'une méthode de décontamination. Ces résultats nous permettront par conséquent de déterminer l'efficacité de décontamination de chaque formulation en corrélation avec l'évaluation de la surface spécifique des deux phyllosilicates utilisés.

2. Résultats

2.1 Modification des formulations filmogènes : remplacement de la TF par la TS

Au cours de ce chapitre, une comparaison est effectuée entre les formulations filmogènes contenant de la TF et de la TS, puis avec les différentes méthodes de référence (TF sous forme de poudre, RSDL et eau). Pour cela, les 4 quatre formulations qui ont été sélectionnées dans la première partie (P12F15D3, P12F15L3, P20F9D3 et P20F9L3) ont été utilisées en substituant la TF par la TS.

Comme on peut le voir, le changement de phyllosilicate n'a pas impacté les propriétés filmogènes des formulations, et celles-ci ont démontré des capacités de décontamination *in vitro* sur des lames de verre supérieures à 95 %, leur permettant ainsi d'être évaluées *ex vivo* en tant que méthodes de décontamination (**Tableau 26**).

Formulation	Film-forming properties	Quantity of POX (%)	
		Film	Surface
P12S15D3	+	98,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2
P12S15L3	+	95,7 ± 1,0	4,3 ± 1,0
P20S9D3	+	94,9 ± 1,3	5,1 ± 1,3
P20S9L3	+	95,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1

Tableau 26 - Développement des formulations filmogènes de TS (en remplacement de la TF) et évaluation de leurs propriétés filmogènes ("+" pour filmogène, "±" pour friable et "-" pour non filmogène) et de leurs capacités de décontamination contre le POX sur des lames de verre (n=3 pour chaque test). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

2.2 Évaluation de la toxicité *in vitro* des formulations de TF et TS sur des NHDFs

Étant donné que les formulations filmogènes sont destinées à être appliquées sur la peau, des NHDFs ont été utilisés pour évaluer la cytotoxicité des différentes formulations filmogènes afin de valider leur compatibilité chez l'humain. Les formulations composées uniquement de PVA, à n'importe quelle concentration, n'ont présenté aucune toxicité envers les NHDFs (**Figure 33**). De même, l'incorporation de la TF ou de la TS à 9.1 ou à 15 wt% et de tensioactifs à 3 wt% (LG ou DG) dans les formulations n'a révélé aucun effet toxique sur les cellules (**Figure 33**).

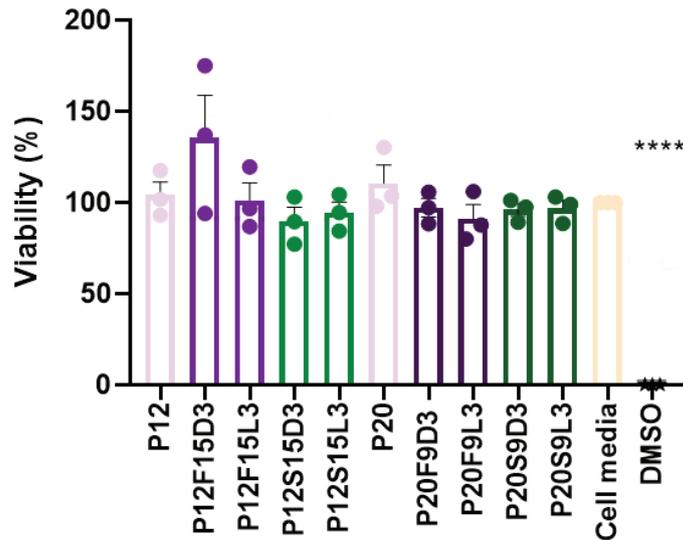


Figure 33 - Cytotoxicité *in vitro* de chaque formulation (avec et sans TF ou TS) sur les NHDFs après 30 minutes d'exposition au Presto Blue (n=3 pour chaque formulation). Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide de la méthode Kruskal-Wallis suivie des tests de comparaisons multiples de Dunn's. Les différentes conditions ont été statistiquement comparées au contrôle "Cell media". Les valeurs sont présentées en moyenne ± SEM. **** : $p < 0,001$.

2.3 Évaluation de la cinétique de pénétration du POX en présence de différentes méthodes de décontamination : comparaison des formulations filmogènes de TF et de TS

La pénétration du POX a été évaluée à l'aide d'un système de cellules de diffusion miniaturisées basé sur des explants de peau d'oreille de porc. Le choix du modèle porcin découle de sa reconnaissance en tant que modèle prédictif fiable de la décontamination cutanée chez l'humain, en raison de similitudes physiopathologiques^{60,105}. La procédure de décontamination sur les explants de peau a été mise en œuvre 5 minutes après la contamination au POX. En l'absence de décontamination, la pénétration du POX à travers la peau s'est avérée nettement supérieure, avec jusqu'à 41,5 % de POX détecté dans le milieu récepteur après 24 heures (**Figure 34**). Lorsque la peau a été soumise à la décontamination, une pénétration rapide du POX a été observée jusqu'à 10 heures pour toutes les méthodes. Au-delà de cette période, un plateau a été atteint demeurant constant jusqu'à 24 heures, moment où la pénétration est devenue négligeable. Cela correspondait au moment où aucun POX ne restait disponible à la surface de la peau (**Figure 34**). La présence d'une méthode de décontamination a conduit à une réduction de la diffusion du POX allant jusqu'à 16 fois, soulignant la nécessité stricte de la décontamination pour limiter la pénétration du POX à travers la peau.

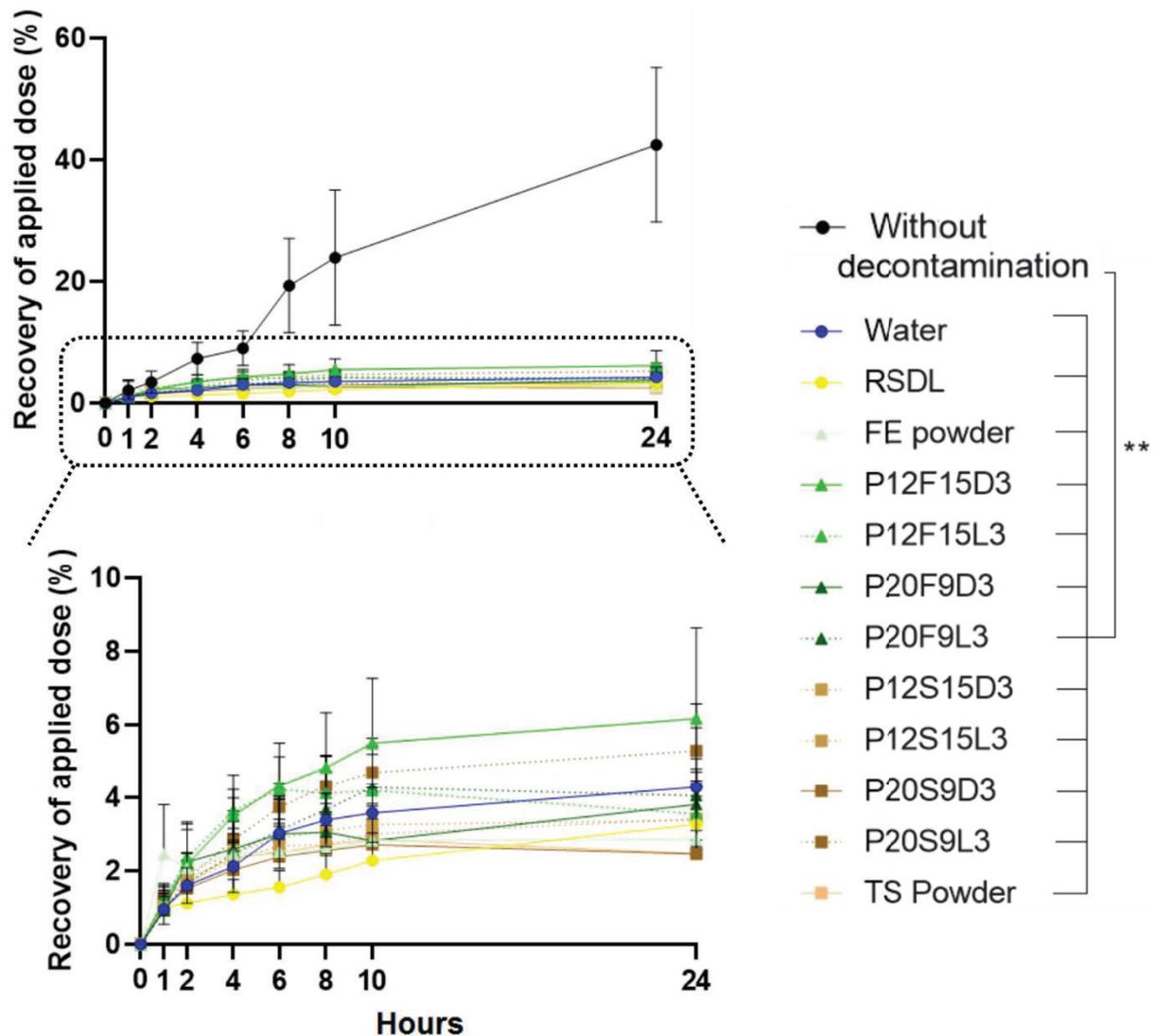


Figure 34 - Évaluation *ex vivo* de la pénétration du POX à travers la peau de l'oreille de porc avec et sans méthode de décontamination. Différentes méthodes de décontamination ont été utilisées : formulation avec la TF (P12F15D3, P12F15L3, P20F9D3, P20F9L3), à l'eau, la TF sous forme de poudre, le RSDL et les formulations à base de TS (P12S15D3, P12S15L3, P20S9D3, P20S9L3) (n=5 pour l'eau et n=6 pour les autres méthodes de décontamination). P = PVA, F = FE, S = TS, L = LG et D = DG. Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du test U (Mann-Whitney) par rapport au témoin sans décontamination. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. **: $p < 0.01$.

Toutes les formulations développées ont démontré une diminution statistiquement significative de la pénétration du POX à travers la peau, en comparaison au témoin sans décontamination. On observe 6.2 % pour P12F15D3 contre 3.4 % pour P12S15D3, 3.6 % pour P12F15L3 contre 3.4 % pour P12S15L3, 3.8 % pour P20F9D3 contre 2.5 % pour P20S9D3 et 4.2 % pour P20F9L3 contre 5.3 % pour P20S9L3 de POX détecté dans le milieu récepteur après 24 heures. Par ailleurs, aucune différence n'a été démontrée entre la décontamination avec les formulations filmogènes de TF et de TS, ainsi que les méthodes de référence, en particulier avec le standard actuel, le RSDL (Figure 34).

2.4 Quantification du POX dans les différentes formulations de décontamination et dans la peau

La quantification du POX dans les différentes formulations de décontamination et dans les différentes couches de la peau (surface de la peau, SC, épiderme et derme) a révélé que la majorité du POX était localisée dans les différentes méthodes de décontamination. En l'absence de décontamination, 38 % du POX était localisé dans la peau, constituant ainsi un réservoir significatif de POX, pouvant conduire à sa pénétration intégrale à travers la peau (

Figure 35). Une diminution du POX a été visualisée dans la peau dès lors que celle-ci est soumise à n'importe quelle méthode de décontamination. Des différences significatives ont été observées avec les formulations P20F9D3 et P12S15L3, qui ont respectivement conduit à une réduction atteignant 2.7 % et 5 % de POX au sein de la peau. Par ailleurs, comme illustrée sur la **figure 35**, une proportion plus importante de POX a été retrouvée au sein des différentes formulations de décontamination, mettant en lumière que chacune d'entre elles permet de capturer le POX de la surface cutanée. Les résultats ont révélé l'absence de différence significative par rapport au RSDL, quelle que soit la formulation utilisée. Néanmoins, une tendance se dessine, suggérant que les formulations à base de TS permettent une récupération plus importante de POX à la surface cutanée, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative (

Figure 35).

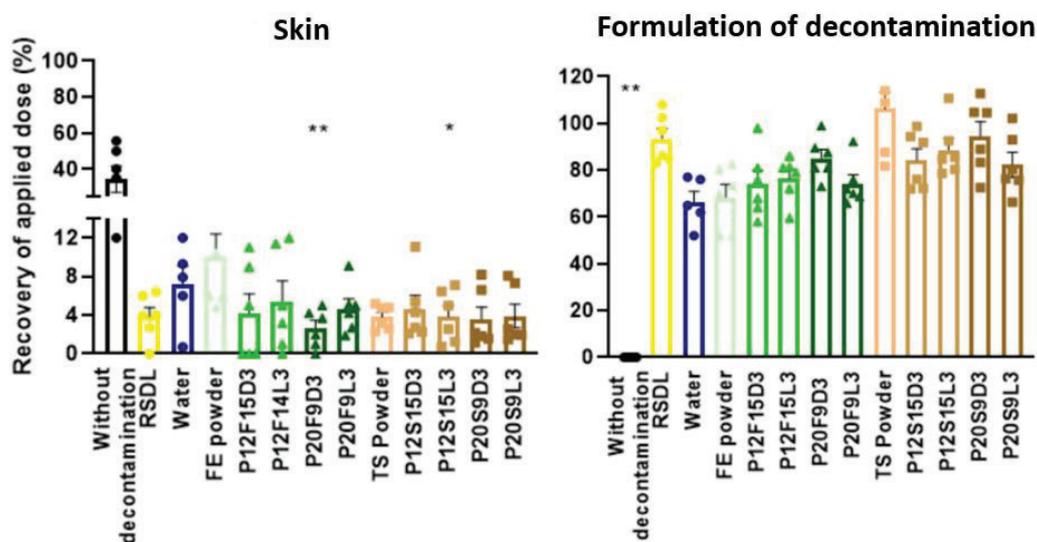


Figure 35 - Quantification du POX dans la peau et dans les différentes formulations de décontamination après 24 heures de diffusion à travers un explant de peau d'oreille de porc (n=5 pour la décontamination à l'eau et n=6 pour tous les autres conditions). Les résultats ont été analysés statistiquement en utilisant le test de Kruskal-Wallis suivi des tests de comparaisons multiples de Dunn's. Pour le graphique « Skin », les conditions ont été comparées statistiquement aux échantillons sans décontamination et pour le graphique « Formulation of decontamination », les conditions ont été comparées statistiquement au RSDL. Les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne \pm SEM. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$

2.5 Évaluation de l'efficacité de décontamination des formulations

L'efficacité de décontamination *in vitro* (DE) de chaque méthode de décontamination a été calculée afin de déterminer la formulation la plus prometteuse contre le POX (**Tableau 27**). La formulation P12S15L3 a été la seule à atteindre une DE statistiquement inférieure par rapport au RSDL, avec un taux de $84,1 \pm 1,8$ %. Aucune différence significative n'a été observée pour toutes les autres méthodes de décontamination, suggérant que les cinq autres formulations développées de TF et de TS, ainsi que les méthodes de référence (eau, TF sous forme de poudre et RSDL) étaient toutes aussi efficaces. Cependant, P20F9D3, avec une DE de $96,5 \pm 1,3$ %, s'est démarquée en démontrant la plus grande efficacité.

Decontamination method	P12F15D3	P12F15L3	P20F9D3	P20F9L3
<i>In vitro</i> decontamination efficiency (DE) %	$84,4 \pm 4,7^{ns}$	$92,2 \pm 3,8^{ns}$	$96,5 \pm 1,3^{ns}$	$93,5 \pm 2,1^{ns}$
	P12S15D3	P12S15L3	P20S9D3	P20S9L3

88,8 ± 5,2 ^{ns}	84,1 ± 4,07	91,91 ± 2,5 ^{ns}	79,7 ± 1,8 ^{ns}
Water	FE powder	RSDL	
91,4 ± 2,8 ^{ns}	91,8 ± 2,5 ^{ns}	95,2 ± 1,9	

Tableau 27- Efficacité de décontamination *in vitro* (DE) pour chaque méthode de décontamination comparée au POX sans décontamination (n=6 pour chaque formulation sauf n= 5 pour l'eau). Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi des tests de comparaisons multiples de Dunn's. Les conditions ont été comparées statistiquement au RSDL. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. ns : non significatif, * : p < 0,05.

2.6 Surface spécifique et microporosité de la TF et de la TS

La surface spécifique de la TF et de la TS a été déterminée par la méthode BET. Les résultats ont révélé que la TF présente une plus grande surface spécifique, atteignant 209.5 m²/g, ainsi qu'une microporosité de 0.035 cm³/g, en comparaison à la TS avec une surface spécifique de 186.1 m²/g et une microporosité de 0,031 cm³/g (**Tableau 28**). Cette plus grande surface spécifique confirme sa capacité d'adsorption supérieure, en cohérence avec les résultats obtenus précédemment.

	Specific surface (m ² /g)	Micropore volume (cm ³ /g)
TF	209, 5036 ± 0,74	0,035117
TS	186,0535 ± 0,6	0,031420

Tableau 28 - Surface spécifique et volume des micropores de différents phyllosilicates : TS et TF (n=3 pour chaque phyllosilicate). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM.

3. Discussion

Bien que la documentation sur la toxicité de la TF et la TS soit limitée, les études existantes indiquent que les phyllosilicates, en général, ne manifestent pas de toxicité chez les humains à de faibles doses, quel que soit leur mode d'utilisation¹⁵⁶. Néanmoins, lorsqu'ils entrent en contact avec la peau, sont ensuite séchés et retirés, les formulations doivent répondre à des critères de sécurité. Ainsi, afin de valider leur innocuité et pouvoir les tester *ex vivo* sur des explants de peau d'origine porcine, des tests *in vitro* sur des NHDFs en culture ont permis de mettre en évidence l'absence d'effet toxique des formulations (**Figure 33**). Ces résultats concordent avec les études *in vitro* et *in vivo* menées par Danoy *et al.*, qui démontrent l'absence de toxicité des surnageants de suspension de TF et de TS sur les fibroblastes ainsi que sur les poissons-zèbres (aucune anomalie morphologique au cours du développement et

pas d'impact sur la mobilité des poissons)⁶⁰. La non-toxicité *in vitro* suggère que ces formulations sont susceptibles d'être biocompatibles *in vivo* (comme chez les souris SKH1), bien que leur validation soit nécessaire.

Concernant les essais de pénétration, mener des études sur les humains n'est pas réalisable en raison de contraintes éthiques et pratiques, bien que cela soit considéré comme la norme en matière de détermination de la pénétration cutanée de composés chimiques, en particulier pour les agents chimiques de guerre⁶¹. En l'absence d'études humaines, les essais *in vitro* sur les cellules et les études dermiques *ex vivo* servent de modèles expérimentaux pouvant reproduire de près la situation *in vivo*. En utilisant des explants de peau humaine ou animale excisés et une cellule de diffusion statique, il est possible de déterminer le taux et l'ampleur de l'absorption cutanée d'un produit donné. De plus, la peau d'oreille de porc a été largement étudiée et validée comme le modèle le plus adapté pour simuler la pénétration cutanée chez l'homme⁹⁰.

Dans notre étude, l'efficacité de décontamination des formulations nouvellement développées a été comparée à diverses méthodes existantes telles que le RSDL, l'eau et la TF sous forme de poudre. La décontamination avec les deux types de phyllosilicates, induit le même profil de pénétration du contaminant à travers la peau et la quantification au sein de la peau est similaire. Parmi les méthodes de décontamination testées, la formulation P12S15L3 s'est avérée être la moins efficace, avec une efficacité de décontamination (DE) de $81,4 \pm 1,8$ %. En revanche, les résultats indiquent que P20F9D3 s'est révélée être la plus efficace contre le POX, avec une DE de $96,5 \pm 1,3$ %, bien que sans différence statistiquement significative avec le RSDL. Il faut noter que le calcul de l'efficacité de décontamination prend en compte seulement la fraction de POX retrouvée dans le SC, l'épiderme, le derme et dans le récepteur pour chaque méthode en comparaison aux conditions sans décontamination. Ce qui peut expliquer que les DE calculées sont meilleures pour les formulations avec la TF que celles avec la TS, car elle ne prend pas en compte la fraction de POX à la surface cutanée ni celle retrouvée au sein des formulations lors du processus de décontamination. Ainsi, les différences également obtenues concernant le POX dans les différentes méthodes de décontamination (**Figure 34**) sont dues à des variations sur la quantification totale du POX retrouvée à la fin de l'expérimentation. Ces résultats peuvent donc varier d'un facteur ± 30 %. Néanmoins, ces résultats mettent en lumière le potentiel de décontamination des formulations nouvellement développées contre le POX, comparativement au gold standard actuel, le RSDL, qui a démontré une efficacité notable de $95,2 \pm 1,9$ %.

L'effet wash-in dû à l'utilisation de l'eau comme moyen de décontamination de masse à fort débit implique dans la plupart des cas une augmentation de la pénétration des composés

organophosphorés à travers la peau²²¹. A l'issue de nos tests, la décontamination par l'eau a conduit à une DE élevée de $91,4 \pm 2,8$ %, traduisant qu'elle n'a pas induit d'effet wash-in. Ceci peut s'expliquer par la méthode par laquelle les explants ont été décontaminés, le dépôt de l'eau sur la surface cutanée a été réalisé doucement et sans l'application d'une pression significative. Ces résultats semblent donc montrer distinctement qu'il est important de prendre en compte la façon dont la décontamination a lieu afin de pouvoir les comparer équitablement.

Dans la globalité, les formulations filmogènes de TS ont obtenu des DE légèrement plus faibles que celles composées de TF, montrant que la TF semble être pour l'instant un bon phyllosilicate pour la décontamination cutanée face au POX.

Dans la même approche que nos formulations filmogènes, Maibach *et al.*, ont développé le DDGel (brevet WO 201705359 A/1)²²². Sa composition, un mélange de polymères (Kollidon SR, lutrol et carboxyméthyl cellulose) et de phyllosilicates (TF et de bentonite)^{201,202,223}, lui permet de former un film après séchage, le rendant efficace pour décontaminer divers simulants d'agents chimiques de guerre tels que le CEES et le DIMP. Les résultats publiés suggèrent une DE plus élevée pour le DDGel par rapport au RSDL. Cependant, en raison du manque d'informations sur ses propriétés mécaniques, sa facilité d'utilisation (biocompatibilité, propriétés filmogènes) et sa composition détaillée, son utilisation actuelle est limitée.

La possibilité d'envisager une combinaison de phyllosilicates, voire même leur substitution, comme cela a été réalisé avec succès dans le cas du DDGel, nous a conduits à expérimenter la TS en remplacement de la TF. Ce choix de la TS repose sur des résultats non inclus dans cette thèse, avec des suspensions aqueuses de TS qui se sont montrées encourageantes. De plus, la nature de la TS, une argile de la famille des montmorillonites (MMT) permet de la comparer à la TF, une argile fibreuse. Les propriétés d'adsorption de ces phyllosilicates, qu'ils s'agissent de la TF ou de la TS, sont régies par leurs propriétés intrinsèques. La surface spécifique, la capacité d'échange de cations et la propriété de gonflement peuvent influencer de manière significative leur potentiel adsorbant. Il est donc essentiel de déterminer ces paramètres. Les argiles de type fibreuses, telle que la TF, se distinguent par une surface spécifique importante, attribuable à la densité élevée de groupes silanols couvrant leur surface externe, ce qui expose de nombreux sites d'adsorption en surface. Leur structure sous forme de tunnels parallèles, appelés canaux, leur permet de capturer le POX en leur sein¹⁴⁰. En comparaison, les MMTs, telles que la TS, présente d'excellentes propriétés de gonflement du fait de leur forte capacité d'absorption d'eau,

entraînant ainsi un élargissement de l'espace entre les feuillets et les particules, libérant ainsi des sites d'adsorptions spécifiques²²⁴.

Ces conclusions laissent entrevoir que l'optimisation de ces formulations filmogènes peut faire l'objet d'ajustements afin de déterminer la meilleure combinaison de phyllosilicates en vue de sélectionner les candidats les plus performants.

4.Évaluation critique

De nombreuses critiques et améliorations peuvent être apportées aux résultats présentés au sein de ce chapitre.

4.1 Impact de l'utilisation de peaux congelées sur l'absorption du POX ?

L'utilisation de peaux porcines congelées et dermatomées a été privilégiée tout au long de cette thèse dans le but d'obtenir des explants de peau présentant des dimensions et une épaisseur conforme à nos besoins. Les études d'absorption *ex vivo* ont été réalisées en accord avec les lignes directrices 428 de l'OCDE (**Annexe 3**) qui spécifient que "Bien qu'une peau viable soit préférable, une peau non viable peut également être utilisée à condition que l'intégrité de la peau puisse être démontrée". Néanmoins, il est important de noter que certaines études signalent des variations d'absorption entre les peaux fraîches et les peaux congelées, en faveur des peaux fraîches²²⁵²²⁶.

Dans ce contexte, nous avons entrepris d'évaluer la cinétique de pénétration du POX à travers des explants de peau fraîche et congelée. A cet effet, des oreilles de porc ont été récupérées auprès d'un abattoir, dermatomées immédiatement, puis soumises à des tests en cellule de Franz (Vitropharma®). Lors de la séparation du SC et de l'épiderme, nous avons constaté des difficultés à récupérer ces deux fractions en vue de quantifier le POX qu'elles contenaient.

Des analyses histologiques ont été réalisées en comparaison avec les peaux congelées afin de vérifier la qualité des échantillons. De manière quelque peu surprenante, il a été observé que les peaux fraîches étaient dépourvues de SC et d'épiderme (**Figure 36**). Après réflexion, la seule explication plausible réside dans les traitements appliqués à l'abattoir pour éliminer toute trace de pilosité sur les peaux fraîches.



Figure 36 - Coupes histologiques d'explants de peau d'origine porcine : à gauche, peau congelée ; à droite, peau fraîche. SC pour stratum corneum, E pour épiderme et D pour derme.

De plus, l'intégrité des explants de peau utilisés pour les études de pénétration du POX n'a été vérifiée que visuellement. Des analyses complémentaires, telles que la TEWL, auraient été pertinentes pour garantir leur intégrité.

En raison de nombreuses variations inter-espèces, visible par des écarts types assez importants entre nos essais, la validation de la quantification du POX au cours de l'expérimentation par HPLC-UV nécessite de définir un seuil d'acceptation des tests. Cette validation consiste à établir un pourcentage représentant la dose retrouvée en fonction de celle déposée, que l'on désignera « recovery global ». Le seuil d'acceptation de ce recovery est de $100 \pm 30\%$. Au-delà de cette limite, les essais ne sont pas validés. Ainsi, les différences observées entre les conditions peuvent être attribuées aux variations de ce recovery.

4.2 Importance sur la caractérisation des phyllosilicates

La TF est utilisée depuis longtemps par les militaires en tant qu'adsorbant sec et constitue en soi un moyen de décontamination efficace. Cependant, l'émergence de l'utilisation de la TS en tant que substitut de la TF a suscité de nombreuses réflexions, notamment en raison de son utilisation dans la vie quotidienne par la population.

Ce qui fait actuellement défaut est la compréhension des mécanismes d'adsorption de ces phyllosilicates dans des conditions d'application réelles. Cela nécessite l'étude de leur structure, en particulier leur comportement lorsqu'ils sont utilisés dans un environnement différent de celui auquel ils sont habituellement associés (c'est-à-dire sous forme de poudre).

Des techniques d'analyse telles que la microscopie électronique à transmission (MET) ou les techniques de diffraction des rayons X (XRD) pourraient permettre d'obtenir une compréhension approfondie de la structure interne, de la dispersion et de la distribution

spatiale des particules d'argile dans la matrice de polymère. En ce qui concerne la caractérisation propre des phyllosilicates, une première étude sur la TF a été réalisée au sein de notre équipe par Annick Roul, actuellement en cours de révision pour publication dans le « Journal of Clay Science ». Des études menées avec des techniques issues du synchrotron pourraient fournir des informations électroniques, chimiques, structurales et morphologiques sur les phyllosilicates testés. La diffraction des rayons X permettrait d'évaluer l'arrangement structural des atomes spécifiques²²⁷, tandis que la spectroscopie infrarouge permettrait d'analyser les liaisons chimiques et la composition atomique.

Cependant, il convient de noter que ces techniques d'analyse sont souvent coûteuses et peuvent prendre un certain temps à mettre en place, en raison de la nécessité d'accéder à des laboratoires spécialisés.

Résultats 3 : Évaluation du pouvoir décontaminant face au POX des formulations filmogènes *in vivo* chez des souris SKH1

1. Introduction

Pour des raisons éthiques et économiques, les premières expérimentations relatives à l'évaluation de la pénétration du POX ainsi que la détermination de l'efficacité de décontamination ont été conduites à l'aide de cellules de diffusion sur des explants de peau d'origine porcine. Ces tissus cutanés sont fréquemment employés en substitution des explants de peau d'origine humaine en raison de leurs difficultés d'exploitation et de leur coût élevé.

Le présent chapitre vise à évaluer les capacités de décontamination de deux formulations, P12F15L3 et P20F9D3, sélectionnées sur la base des résultats obtenus sur ces modèles *ex vivo* et décrits au sein du chapitre 2. Ces formulations seront comparées au RSDL, la méthode de référence en termes de décontamination face aux COPs. La biocompatibilité de ces différentes méthodes de décontamination sera évaluée sur des souris SKH1, sans poils et

immunocompétentes afin de confirmer leur innocuité pour une application cutanée. Suite à cette validation, ces décontaminants seront soumis à des tests visant à déterminer leur efficacité face au POX, après avoir défini la DL_{50} percutanée du POX.

2. Résultats

2.1 Biocompatibilité des formulations

Avant de débiter les essais relatifs aux procédures de contamination et de décontamination, il est impératif de valider l'innocuité *in vivo* des formulations afin de garantir qu'elles ne provoquent ni irritation cutanée, ni réaction inflammatoire.

2.1.1 Suivi des signes cliniques cutanés suite à l'application des formulations

L'évaluation de l'innocuité des formulations a été réalisée sur 4 groupes de souris correspondant à trois méthodes de décontamination différentes (RSDL, P12F15L3 et P20F9D3) ainsi qu'un témoin négatif (Ctrl-, composé de PBS 1X). Comme illustré sur la

Figure 37, l'application du RSDL sous forme de tapotement, ainsi que son retrait à l'aide d'une compresse, n'entraîne aucune irritation cutanée. De même, pour la formulation P12F15L3, son application, son séchage et son retrait ne présentent aucun signe d'irritation. Toutefois, un suivi des symptômes a été effectué dès les premières heures post-application et jusqu'à 72 heures afin de confirmer leur innocuité.

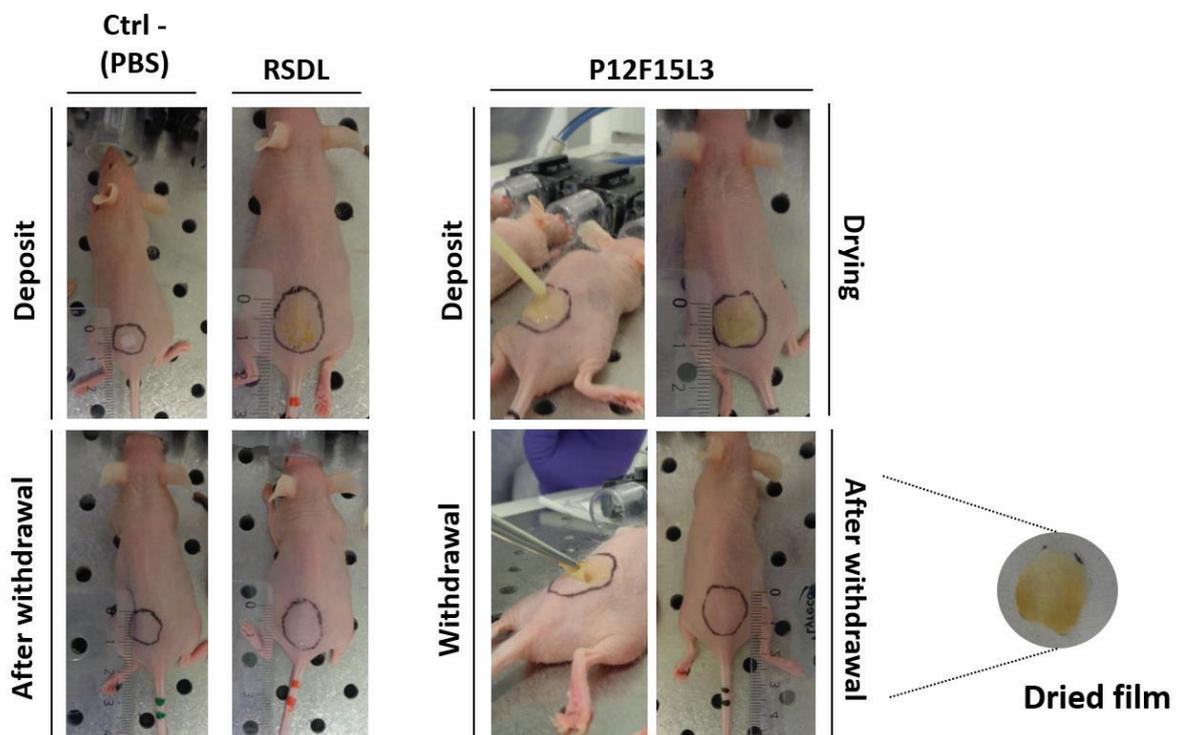


Figure 37 - Méthode d'application et de retrait des différentes méthodes de décontamination sur le dos des souris. Ici sont représentées les groupes suivants : Ctrl -, RSDL et P12F15L3 (n=5 par groupes)

Les souris ont été observées toutes les 24 heures durant 72 heures après le retrait des différentes méthodes de décontamination (RSDL, P12F15L3 et P20F9D3). Comme illustré dans le **Tableau 29**, aucune manifestation cutanée n'a été observée au niveau du site d'application. Ces résultats sont en faveur d'une absence de toxicité cutanée pour une application d'une durée de 10 secondes pour le RSDL et de 30 minutes pour les formulations filmogènes.

Conditions	Score					
	1H	2H	5H	24H	48H	72H
Ctrl -	0	0	0	0	0	0
RSDL	0	0	0	0	0	0
P12F15L3	0	0	0	0	0	0
P20F9D3	0	0	0	0	0	0

Tableau 29 - Suivi sur 72h des signes cliniques cutanés après application et retrait des différentes méthodes de décontamination. Le suivi est analysé sous forme de score selon les critères suivants : peau normale : 0, réaction cutanée mineure (rougeur légère) : 1, réaction cutanée modérée (rougeur, desquamation, inflammation) : 2 et réaction cutanée majeure (saignement, induction d'une plaie, infection) : 3 (n=5 par groupes)

2.1.2 Suivi d'une potentielle réaction inflammatoire

Afin d'évaluer l'apparition d'une réaction inflammatoire suite à l'application et au retrait des méthodes de décontamination, des interleukines spécifiques du système immunitaire innée telles que l'interleukine 6, l'interleukine-1 β et le TNF- α ont été quantifiées par un dosage ELISA. Aucune des conditions testées n'a induit une augmentation des niveaux sériques d'interleukines associées à une réaction inflammatoire. Les résultats démontrent que les formulations ainsi que le RSDL sont biocompatibles pour une application cutanée et peuvent donc être utilisés pour évaluer leurs propriétés de décontamination.

2.2 Détermination de la DL_{50percutanée} du POX

La détermination de la DL_{50percutanée} du POX ne nous a pas permis d'établir une valeur précise. Les résultats ont indiqué que, quelle que soit la dose appliquée, les souris décèdent avant 24 heures, même pour la plus faible dose à 123.2 μ g/kg (2.9 μ l) (**Figure 38**). Cependant, les symptômes caractéristiques de la crise cholinergique ont été observés plus rapidement chez les souris exposées à des doses élevées. La cinétique d'apparition de ces symptômes a été plus lente chez celles contaminées par des doses plus faibles.

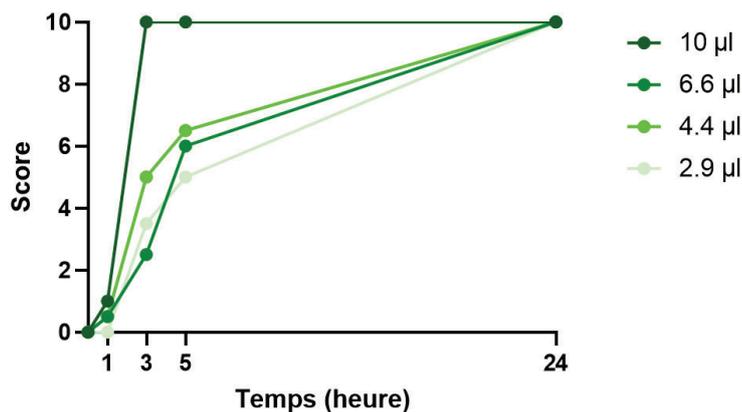


Figure 38 - Suivi de l'apparition des symptômes sur 24 heures en fonction de la dose de POX appliquée. Les doses testées sont les suivantes : 10 µl = 424.7 µg/kg, 6.6 µl = 280.3 µg/kg, 4.4 µl = 186.9 µg/kg et 2.9 µl = 123.2 µg/kg. Le score a été calculé en fonction de l'apparition des symptômes (**Tableau 23**)(n=1 pour chaque condition).

2.4 Évaluation du pouvoir décontaminant des différentes méthodes de décontamination

A partir des résultats obtenus pour la $DL_{50\text{percutanée}}$, nous avons décidé de baser l'évaluation sur d'autres critères que la $DL_{50\text{percutanée}}$. Pour ce faire, la cinétique d'apparition des symptômes a été choisie comme référence. Pour une contamination à 10 µl, la majorité des symptômes a été signalée au bout de 2 heures et 30 minutes, suivi du décès. En revanche, pour une contamination à 6.6 µl, les premiers symptômes ont été observés au bout de 2 heures et 30 minutes, mais de manière légère, s'intensifiant progressivement avec un décès survenant entre 5 heures et 24 heures après contamination. Une dose intermédiaire à ces deux dernières a été choisie, soit une contamination à 8,3 µl (352.5 µg/kg).

La procédure de contamination (2 minutes) et décontamination (30 minutes pour les formulations filmogène et 10 secondes pour le RSDL) a été réalisée selon un protocole bien précis au cours duquel les souris ont été exposées à des doses identiques, suivies chacune d'un processus de décontamination (

Figure 39).

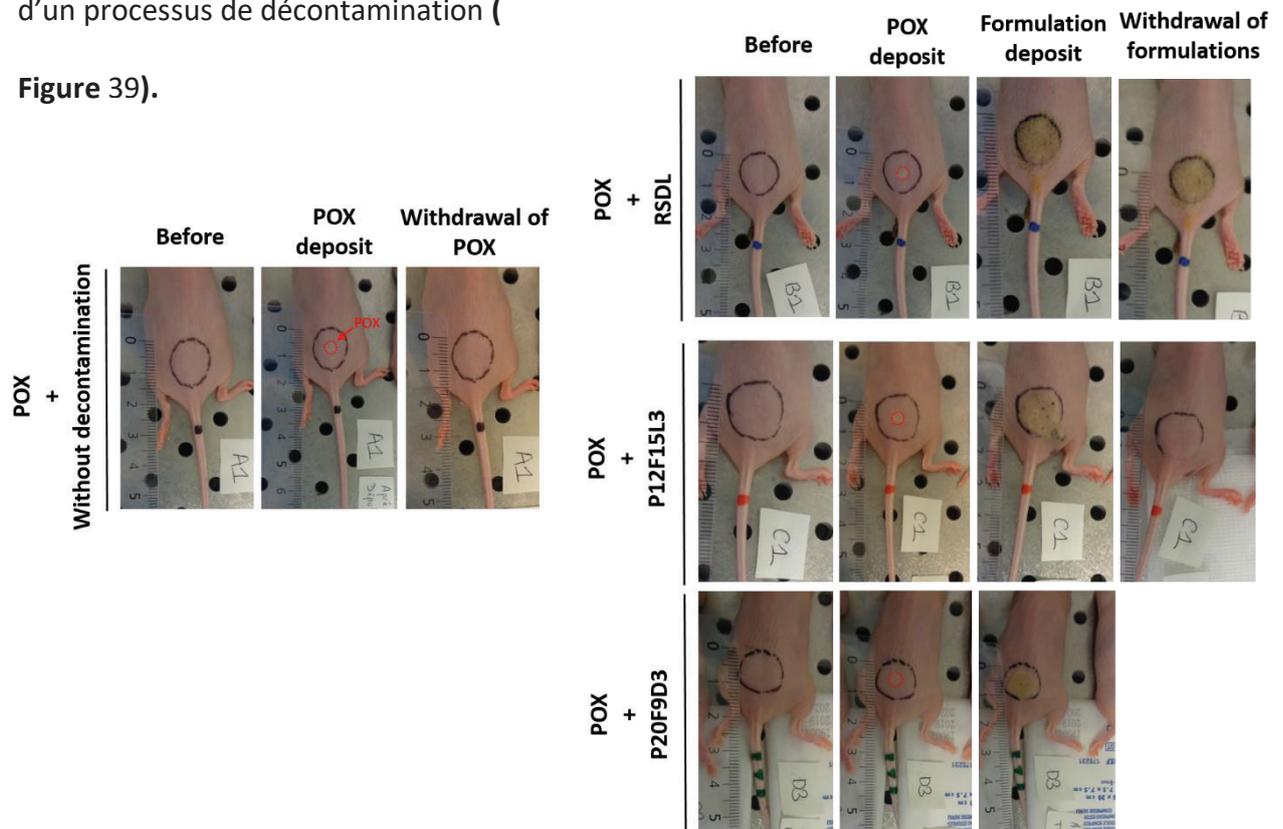


Figure 39 - Procédure de contamination et décontamination de chaque groupe de souris. De gauche à droite : sans décontamination, RSDL, P12F15L3 et P20F9D3.

Le groupe témoin a révélé que l'absence de décontamination entraînait la mortalité des souris 5 heures après leur contamination au POX (**Figure 40**). Néanmoins, une souris a survécu pendant 72 heures, bien qu'elle ait manifesté des symptômes marqués tels qu'une hypothermie et l'absence de comportement de toilettage. La décontamination au moyen du RSDL a conféré la capacité à 4 des 5 souris de survivre, et ce, même après 72 heures, sans aucun symptôme apparent (**Figure 40**). A l'inverse, la décontamination à l'aide des formulations P12F15L3 et le P20F9D3 n'a pas été en mesure de sauver les souris contre une contamination au POX (**Figure 40**). L'apparition des symptômes et le décès des souris ont été observés 2 heures et 30 minutes après la contamination.

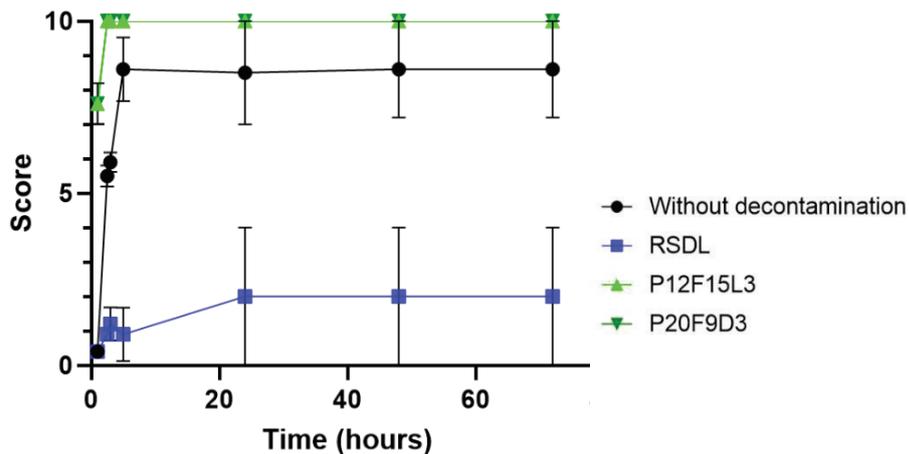


Figure 40 - Suivi de l'apparition des symptômes chez les souris non décontaminées (contrôle) et ceux décontaminés avec le RSDL et les deux formulations P12F15L3 et P20F9D3. Chaque point de score correspond à l'apparition d'un symptôme cité dans le Tableau 23 (n=5 par groupe).

2.5 Impact de la contamination au POX et de la méthode de décontamination sur le niveau d'AChE des souris

Le niveau basal d'AChE a été quantifié sur chaque souris avant le processus de contamination et de décontamination, révélant des taux compris entre 8500 et 9000 mU/mL (**Figure 41**). Une heure après la contamination au POX suivi de chaque méthode de décontamination, une diminution du taux d'AChE a été observée pour les groupes de souris non décontaminés ainsi que pour les deux groupes de souris décontaminés avec les formulations P12F15L3 et P0F9D3 (**Figure 41**). 72 heures suivant la contamination au POX, les niveaux en AChE sont quasiment nuls pour le groupe sans décontamination car une seule souris a survécu (**Figure 41**). En ce qui concerne les souris décontaminées au RSDL, 4 souris sur 5 ont survécu à la contamination au POX sans observer de diminution du niveau d'AChE, responsable de la survie des souris. Ces résultats ont montré que la diminution du niveau de l'AChE chez les souris a un impact sur leur survie.

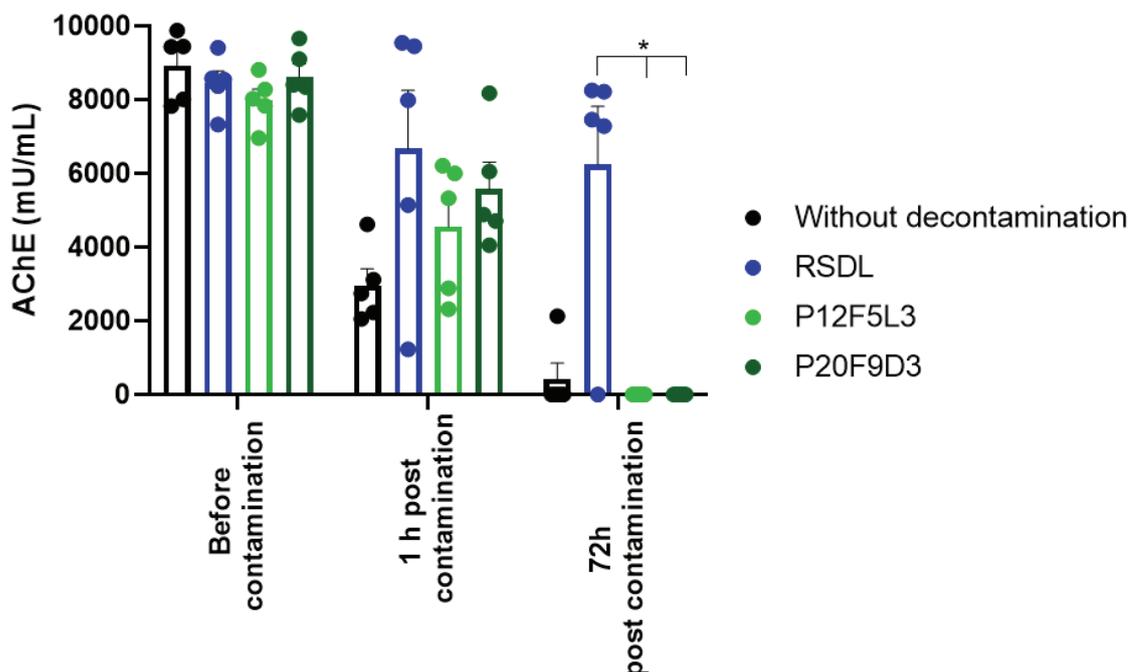


Figure 41 - Dosage enzymatique de l'AChE dans le sérum des souris contaminées au POX et décontaminées avec le RSDL et les deux formulations P1215L3 et P20F9D3. Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn's. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM. * : $p < 0.05$ (n=5 par groupes).

3. Discussion

La validation de la toxicité *in vitro* sur des fibroblastes dermiques dans le chapitre précédent ont permis d'anticiper l'absence de toxicité *in vivo* chez les souris SKH1. L'application et le retrait de chaque méthode de décontamination sur le dos des souris n'ont induit aucun signe d'irritation cutanée visible à l'œil, ni l'induction d'une réponse inflammatoire sur une période de 72 heures (

Figure 37 et Tableau 29). Les travaux de Danoy *et al.*, viennent confirmer nos résultats, démontrant que des suspensions de TF (à des concentrations allant de 5 à 15 wt% en TF) n'ont aucun impact sur la viabilité des poissons zèbres⁶⁰. Selon nos observations, le retrait des formulations développées n'entraîne pas de dépôt macroscopiquement visible de TF sur la peau des souris, ce qui permet de limiter les potentiels effets systémiques au fil du temps. Ceci suggère fortement que la TF est bien intégrée au sein des formulations, réduisant le risque de volatilisation de fines particules susceptibles d'entraîner soit leur inhalation, soit leur dépôt sur de nouvelles surfaces, induisant ainsi une nouvelle contamination.

A notre connaissance, aucune étude concernant la contamination au POX chez la souris SKH1 n'a été publiée à ce jour. En l'absence d'informations relatives aux procédures et aux doses de contaminant à employer, nous nous sommes intéressés aux conditions d'exposition

cutanée au VX chez la souris SKH1 afin d'établir un protocole de contamination et de décontamination approprié au POX. La première étape a consisté à déterminer la $DL_{50\text{percutanée}}$ afin d'établir la $3DL_{50\text{percutanée}}$, dose à laquelle les souris seraient exposées. Cette dose indique qu'une contamination en l'absence de décontamination entraînerait le décès des souris. Taysse *et al.*, utilisent une $DL_{50\text{percutanée}}$ de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de VX en application cutanée pour la contamination de leurs souris SKH1^{100,228}. En tenant compte de nos conditions d'utilisation et des propriétés physico-chimiques du POX, la $DL_{50\text{percutanée}}$ n'a pas pu être déterminée dans les bonnes conditions. Même à de faibles doses, les souris contaminées n'ont pas survécu plus de 24 heures (**Figure 38**). Ces mêmes doses ont été sélectionnées sur certains critères, tels que le volume d'application pour qu'il soit adapté aux souris. Ces doses ont été choisies avec un pas de 1.5, respectant une limite de 10 μL pour le volume maximal et de 2 μL pour le volume le plus faible. Des volumes en dessous de ces valeurs auraient potentiellement entrainer des variations dues à l'incertitude et l'erreur de pipetage. Afin de pallier ce problème lié à la détermination de la $DL_{50\text{percutanée}}$, la cinétique d'apparition des symptômes et l'induction d'une inhibition de l'ACHé en absence de décontamination ont été utilisées comme critères de sélection, permettant de sélectionner une dose d'application à 352.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Le processus de décontamination des souris n'a pas permis de sauver toutes les souris de la contamination au POX. Contrairement aux travaux de Taysse *et al.*, sur le VX, une décontamination au RSDL a garanti la survie de nos souris contaminées au POX, alors qu'elle s'est révélée inefficace dans leur étude. En se fondant sur leurs résultats antérieurs concernant la contamination d'un modèle porcin au VX, la décontamination avec une éponge de RSDL a permis la survie des porcs. Ils expliquent que l'utilisation du RSDL sous forme de liquide et non sous sa forme initiale (éponge imbibée) suivie d'un tapotement de 30 secondes sur les souris SKH1 n'a pas été suffisant pour sauver les souris, tandis que pour le modèle porcin, l'utilisation sous sa forme d'éponge montre une meilleure efficacité^{228,229}. Il est important de noter que ces différences peuvent être attribuées à des variations histologiques entre la peau de porc et celle des souris. Cependant, cette différence suggère également l'importance de la forme physique de l'agent contaminant à la surface de la peau (surface et temps de contact différents, suite à un étalement ou suite à une absorption dans l'éponge).

La mortalité observée suite à la décontamination des souris, en utilisant les différentes formulations développées au cours de ces travaux, peut également être reliée à des différences dans la 'forme' de contamination, induite par la méthode de décontamination elle-même. Dans notre cas, il semble que la toxicité *in vivo* du POX soit liée à la surface d'exposition plutôt qu'à la dose appliquée. En effet, nous avons constaté *in vitro* que l'application des formulations entraînait un étalement sous-jacent du POX (différent selon la composition des

formulations). Le RSDL, sous sa forme d'éponge, n'entraîne pas cet étalement, mais permet au contraire de le retirer rapidement de la surface cutanée suite à son contact. En résumé, l'utilisation du RSDL mène à une surface d'exposition plus petite et un temps de contact inférieur du POX sur la peau en comparaison aux autres méthodes de décontamination.

Cette observation permet d'expliquer les résultats négatifs qui ont été obtenus avec les deux formulations filmogènes testées. En conséquence, il apparaît inapproprié de comparer le RSDL avec les formulations filmogènes, car ce dernier est fortement désavantagé par les procédures expérimentales. De façon générale, outre les différences entre les espèces, l'évaluation des moyens de décontamination doit également reposer sur des protocoles spécifiquement définis tenant compte de la dose du toxique, le moment de la décontamination, les méthodes de décontamination, les modalités d'application du décontaminant, car tous ces paramètres sont primordiaux.

Même si les résultats obtenus au cours de ce chapitre ne permettent pas de prédire leur potentiel d'utilisation, de nouvelles expérimentations *in vivo* corrigeant les différents points abordés précédemment et permettant une comparaison égale entre les deux méthodes, ainsi que des modifications éventuelles des formulations, pourraient très probablement conduire à une amélioration de l'efficacité en termes de décontamination.

4. Évaluation critique

Ces expérimentations *in vivo* chez la souris, utilisant le POX comme OPs, représentent les premiers essais réalisés au sein de notre laboratoire. Certaines modifications et changement peuvent être suggérés.

4.1 Complément sur l'évaluation de la biocompatibilité des formulations :

Bien que les altérations de la barrière cutanée lors du retrait des formulations ne soient pas visibles macroscopiquement, il aurait été intéressant de valider l'absence d'une altération de la barrière cutanée par des analyses histologiques. Pour cela, des biopsies cutanées auraient pu être réalisées afin de vérifier l'intégrité du SC et de l'épiderme. Cette vérification aurait pu être évaluée sur des coupes histologiques en hématoxyline éosine et par une quantification de l'épaisseur du SC entre les conditions avec et sans décollement des formulations. De plus, il aurait été pertinent d'analyser la viabilité cellulaire notamment celle des kératinocytes épidermiques et des fibroblastes dermiques par des tests de MTT directement à partir de biopsie cutanée. Cependant il est important de noter que l'extraction des biopsies de peau aurait nécessité l'euthanasie de chaque souris. Pour des raisons éthiques et pour respecter la règle des 3R (remplacer, réduire et raffiner), nous avons pris la décision

de ne pas euthanasier les souris et de réutiliser les mêmes groupes pour les expérimentations de contamination et de décontamination. De plus, le coût élevé des souris ainsi que celui des procédures nécessaires pour ces expérimentations ne peuvent être négligés.

Afin de valider l'absence d'innocuité des différentes méthodes de décontamination micro et macroscopiquement, un groupe contrôle positif (induisant une inflammation par l'application topique d'un produit) aurait été nécessaire. Cependant, aucune information n'a été précisée dans le CECCAP pour l'utilisation d'un tel groupe de souris, ne nous permettant pas de tester cette condition contrôle.

4.2 Détermination de la DL_{50} percutanée :

La détermination de la DL_{50} percutanée s'est avérée complexe, car même la plus petite dose appliquée, soit 2,9 μ l de POX, a entraîné le décès de la souris en moins de 24 heures. Par conséquent, il n'a pas été possible d'obtenir une proportion de souris vivantes/mortes permettant le calcul de la DL_{50} percutanée. Étant donné la limitation en nombre de souris, nous avons pris la décision de déterminer par nos propres moyens une dose que nous nommerons « DL_{50} percutanée » afin de mener à bien nos expérimentations. Chaque dose a été évaluée sur des souris uniques et n'a pas été répétée dans un souci de minimiser le nombre d'animaux sacrifiés, ce qui obère de fait la variabilité et la reproductibilité de nos résultats. De nouvelles expérimentations, impliquant un plus grand nombre de souris, seront envisagées afin de réduire les variabilités interindividuelles. Une dilution du POX pourrait être envisagée, en raison de sa toxicité à de faibles volumes, dans des solvants permettant sa solubilité (tel que l'isopropanol par exemple), afin de pouvoir utiliser des volumes appropriés pour son application (en prenant en compte l'effet de la dilution sur la cinétique de pénétration du POX). Néanmoins, il faudra dans ce cas valider l'absence d'effets synergiques ou antagonistes du solvant employé.

4.3 Évaluation des capacités de décontamination des formulations :

Les résultats de décontamination avec les formulations indiquent que la forme d'utilisation des formulations a une influence importante sur la pénétration du POX à travers la peau, conduisant au décès précoce des souris. Des tests préliminaires montrent que la surface d'exposition du POX a un impact significatif sur l'apparition des symptômes cholinergiques, entraînant un décès plus rapide des souris (**Figure 42**).

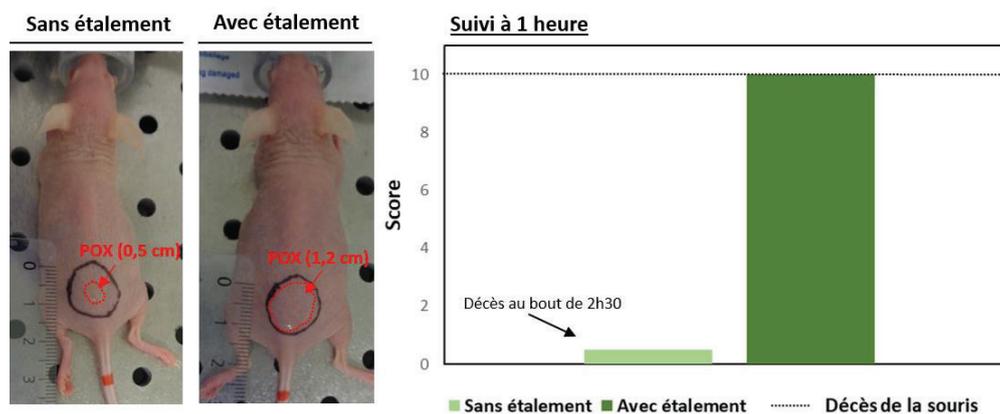


Figure 42 - Effet de l'étalement du POX sur l'apparition des symptômes et durée de vie des souris SKH1 contaminée à la même dose (424.7 µg/kg) (n=1)

Afin de comparer équitablement les différentes méthodes de décontamination et en tenant compte de l'effet de surface, il pourrait être intéressant de déterminer une surface spécifique pour la contamination, par l'emplacement d'un anneau étanche sur le dos des souris, et d'étaler uniformément le POX sur cette surface. La procédure de décontamination pourrait être appliquée sur la même surface pour les différentes procédures, permettant ainsi de limiter les différences de toxicité du POX liées à son étalement. Il pourrait donc être nécessaire de reconsidérer la DL₅₀percutanée préalablement définie, car en raison de l'effet toxique du POX étalé, une dose plus faible pourrait suffire (des dilutions du POX peuvent être envisagées).

Dans notre étude, nous avons exclusivement comparé la décontamination de nos formulations filmogènes avec le « gold standard » actuel, le RSDL. Comme il est mentionné dans la littérature, la TF sous forme de poudre et l'eau sont également deux méthodes couramment employées. Par conséquent, il serait pertinent d'inclure ces deux dernières comme méthode de décontamination comme points de référence aux côtés du RSDL.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. Résumé des résultats obtenus

L'élaboration de la nouvelle formulation décontaminante présentée dans cette thèse vise à remédier aux limitations inhérentes aux méthodes de décontamination couramment employées (TF sous forme de poudre, RSDL et eau). C'est sur la base de ces contraintes qu'un cahier des charges particulièrement rigoureux a été établi pour son développement. Celui-ci exige que la formulation mise au point soit facilement produite et peu coûteuse (en limitant au minimum le nombre de composants), qu'elle puisse être aisément appliquée et retirée (en disposant de propriétés filmogènes et mécaniques appropriées), qu'elle demeure stable dans le temps, qu'elle soit biocompatible et, surtout, qu'elle démontre des capacités de décontamination intéressantes face au POX.

Au cours de cette thèse, le premier axe de notre démarche à consister à élaborer puis à caractériser une nouvelle formulation filmogène adaptée à la décontamination cutanée vis-à-vis des composés organophosphorés, et plus précisément du POX. Les propriétés filmogènes du PVA, la capacité d'adsorption de la TF et l'ajout de surfactants visant à améliorer l'homogénéité et les propriétés filmogènes, ont permis l'élaboration d'une nouvelle formulation répondant aux critères énoncés. Un processus de sélection parmi plusieurs formulations a abouti à l'identification de 4 formulations, à savoir P12F15D3, P12F15L3, P20D9D3 et P20F9L3. L'analyse de la composition de ces formulations filmogènes permet de confirmer l'incorporation homogène de la TF au sein de la matrice de PVA, par la présence de minéraux tels que de l'aluminium, du magnésium et du silicium. Les caractéristiques mécaniques et de pelage, jugées satisfaisantes sur une surface cutanée, attestent de l'adéquation complète de ces formulations pour une utilisation après leur phase de séchage. Elles peuvent ainsi être retirées en une seule fois, sans se briser ou s'effriter (affichant une rigidité pouvant atteindre 16.5 MPa pour les formulations composées de TF). Les données recueillies corroborent avec une amélioration de la séquestration du POX pour les formulations intégrant la TF, en comparaison avec celles qui n'en contiennent pas, démontrant ainsi la plus-value de son inclusion et permettant de limiter le risque de nouvelles contaminations grâce à sa rétention.

Dans un second temps, il a été démontré que les formulations filmogènes à base de TF et d'un nouveau phyllosilicate appelé TS, limitent considérablement la pénétration du POX à travers la peau d'origine porcine. Quel que soit le phyllosilicate intégré dans les formulations filmogènes, les deux permettent d'atteindre des niveaux d'efficacité de décontamination importante. Néanmoins, les formulations contenant de la TF (telles que P20D9D3) surpassent toutes les autres, y compris les méthodes de référence telles que le RSDL, la poudre de TF et l'eau.

L'urgence de décontaminer de manière efficace vise à minimiser les effets systémiques. Dans cette optique, une étude *in vivo* a été menée dans une troisième partie, afin de mettre en lumière les conséquences d'une contamination au POX et de déterminer l'efficacité de décontamination des formulations sélectionnées. Tout d'abord, l'absence de toxicité des formulations a été confirmée *in vitro* et *in vivo*, ce qui permet d'envisager leur potentielle application chez l'humain. Ces formulations ne présentent aucune toxicité envers les fibroblastes dermiques humains *in vitro*, et n'induisent ni irritation cutanée ni réaction inflammatoire chez les souris SKH1. De plus, le retrait de ces formulations d'une surface cutanée n'altère pas cette dernière, laissant ainsi intacte la barrière cutanée.

L'évaluation *in vivo* des capacités de décontamination des formulations sélectionnées, sur la base des résultats obtenus *ex vivo* et en comparaison avec le RSDL, a permis d'obtenir les premières données *in vivo* suite à une contamination au POX. Ceci a impliqué préalablement la détermination de la $DL_{50\text{percutanée}}$ du POX, encore méconnue à ce jour. Bien que les tests n'aient pas permis d'établir cette dose de manière précise, la dose sélectionnée (352,5 µg/kg) entraîne le décès des souris non décontaminées, suite à l'apparition de symptômes cholinergiques dus à une inhibition importante de l'AChE sérique. Des résultats similaires ont été observés chez les groupes non décontaminés et ceux décontaminés avec les formulations filmogènes (P12F15L3 et P20F9D3). L'étalement du POX lors de son recouvrement par les formulations entraîne une pénétration plus importante que celle envisagée lors de la détermination de la $DL_{50\text{percutanée}}$. Ceci conduit à l'apparition rapide de symptômes, suivi du décès des animaux. En revanche, la décontamination à base de RSDL n'entraîne pas ce phénomène d'étalement de l'agent contaminant. Il en résulte une limitation de l'apparition des symptômes cholinergiques ainsi que des niveaux élevés d'AChE sérique chez les souris contaminées, indiquant l'efficacité de la décontamination.

En conclusion, ces résultats soulignent la nécessité de considérer divers paramètres lors de l'évaluation des méthodes de décontamination, que ce soit *ex vivo* ou *in vivo*. Bien que l'efficacité des formulations développées n'ait pas pu être mise en évidence *in vivo*, du fait de biais expérimentaux identifiés, leur potentiel pour la décontamination des surfaces est clairement souligné. De nouvelles expérimentations tenant compte des différentes sources de variation et biais identifiés permettront de déterminer leur efficacité en matière de décontamination cutanée.

2. Amélioration des formulations filmogènes et application à d'autres agents chimiques de guerre ?

Dans l'objectif d'améliorer les performances de nos formulations filmogènes en termes de décontamination, il est envisageable de procéder à des ajustements au niveau de leur composition. Nos formulations versatiles et robustes permettent d'apporter des modifications pouvant inclure l'incorporation de molécules permettant la dégradation et/ou la neutralisation des COPs, ou encore l'exploration de nouvelles combinaisons de phyllosilicates. Comme il a été observé antérieurement, la substitution de la TF par de la TS a été réalisée simplement et n'a pas induit de modifications quant à leur formulation ou à leurs propriétés, notamment leur capacité à former un film. Cette versatilité pourrait contribuer à élargir leurs champs d'application, notamment en ce qui concerne leur utilisation dans la décontamination d'autres agents chimiques de guerre.

2.1 Ajout de molécules de dégradation et/ou de neutralisation des COPs

Bien que la séquestration de l'agent toxique au sein des films formés permet de réduire les risques de contamination croisée et de faciliter le traitement des déchets, il est tout à fait envisageable d'explorer la possibilité de conférer aux formulations filmogènes des capacités intrinsèques de dégradation et de neutralisation des agents toxiques adsorbés. Pour ce faire, divers outils potentiels de dégradation des agents chimiques de guerre pourraient être incorporés au sein des formulations.

Les oxydes métalliques offrent un potentiel prometteur en matière de décontamination en raison de leur réactivité élevée²³⁰. Les nanoparticules d'oxyde métallique, du fait de leur grande surface spécifique, permettent également une adsorption significative des agents chimiques de guerre²⁰⁴. Plusieurs oxydes métalliques pourraient être testés pour leur capacité à hydrolyser les COPs et ainsi former des composés moins toxiques. Une liste a été établie pour illustrer les nombreuses possibilités :

- Oxyde de zirconium : Grâce à leur grande surface spécifique et leur grande porosité, ils permettent le retrait de divers composés chimiques²³¹.
- Oxyde de cérium : Les capacités de dégradation des nanoparticules de CeO₂ vis-à-vis du POX en solution aqueuse *in vitro* ont été démontrées par Salerno *et al.*,²⁰⁴.
- Oxyde de zinc : Bien qu'il possède un pouvoir absorbant limité, son couplage avec le CuO permet la formation d'un nanocomposite binaire efficace.
- Oxyde de zinc titane : L'évaluation de la décontamination chimique et biologique a été réalisée par des lingettes développées par Sharma *et al.*, composées de ZnTiO₃ et Ag pour leur forte sélectivité envers les molécules lipophiles²³².

Par ailleurs, des oximes telles que le chlorure de 2-pralidoxime (approuvé par la FDA), l'iodure de 2-PAM et l'obidoxime, qui se complexent directement avec les composés organophosphorés pour former un complexe oxime-phosphonate par une réaction nucléophile pourront également être évalués. Le pH alcalin de ces oximes (pH 10,35-10,85) peut également jouer un rôle important dans la dégradation de ces COPs^{110,233}.

Il sera nécessaire de tester les limites d'incorporation de ces substances dans les formulations composites en termes de concentration, tout en veillant à préserver leur facilité d'utilisation, notamment leurs propriétés filmogènes. De plus, l'introduction de nouvelles molécules visant à obtenir des propriétés de dégradation/neutralisation pourrait impacter significativement le coût des formulations, ce qui n'est pas l'objectif premier de leur développement.

2.2 Évaluation d'autres phyllosilicates

Conformément aux résultats présentés dans le chapitre 2, le remplacement de la TF par de la TS n'a pas conduit à une amélioration notable des performances de décontamination. Cependant, il serait judicieux d'explorer d'autres phyllosilicates afin de déterminer ceux susceptibles de fournir des résultats supérieurs ou d'adapter spécifiquement un phyllosilicate à un agent toxique. En tenant compte de la nature de la TF, des phyllosilicates fibreux tels que la palygorskite ou la sépiolite pourraient être préférentiellement considérées. Ces phyllosilicates tirent leur nom des gisements d'où ils sont extraits. Parmi les différents gisements mondiaux, on compte la sépiolite de Vallecas en Espagne, celle d'Eskisehir en Turquie, ainsi que celle d'Amargosa aux États-Unis pour la sépiolite. Quant à la palygorskite, le gisement le plus exploité est celui de Torrejon et Rubio en Espagne.

D'autres phyllosilicates de types 1:1, 2:1 et 2:1:1 pourraient également être soumis à des tests. Ces minéraux sont connus pour leurs capacités de gonflement remarquables (**Tableau 30**).

Type de feuillets	Groupe	Espèces
1:1	Kaolinite/Serpentinite	Kaolinite, Halloysite, Dickite
2:1	Pyrophyllite/Talc	Pyrophyllite, Talc
	Mica	Muscovite, Illite
	Smectites	Montmorillonite, Saponite, Hectorite
2:1:1	Chlorites	Donbassite, Chlinochlore

Tableau 30 - Les différents phyllosilicates pouvant être utilisés comme substitution ou complément à la TF dans les formulations filmogènes

En plus de ces modifications, la nature du surfactant pourra être modifiée en ayant recours à des composés de types anioniques ou cationiques pour une utilisation sur les surfaces. L'utilisation de surfactant cationique peut permettre l'amélioration des capacités d'adsorption des phyllosilicates par l'intercalation de cations dans l'espace inter-couches et ainsi transformer le phyllosilicate en matériau microporeux²³⁴.

2.3 Utilisations des formulations filmogènes pour la décontamination d'autres agents chimiques de guerre

De nombreuses études ont démontré l'efficacité de la TF et du RSDL pour la décontamination d'autres agents chimiques de guerre autres que les agents innervants. Afin d'élargir le spectre d'utilisation de nos formulations filmogènes, il serait pertinent d'évaluer leur efficacité pour la décontamination de divers agents chimiques de guerre. Parmi ceux-ci, l'Ypérite, appartenant à la classe des vésicants et entraînant des effets cutanés graves tels que des brûlures sévères, constitue un premier candidat prometteur. Pour cette étude, il sera nécessaire de sélectionner au préalable des simulants (comme le CEES) de ces agents afin de mener à bien les expérimentations en laboratoire.

3. Une alternative pour la décontamination des peaux lésées ?

Outre le potentiel de décontamination des formulations filmogènes présentées ici pour la peau intacte, un autre aspect d'un intérêt considérable réside dans leur capacité à décontaminer une peau blessée. La peau endommagée favorise une pénétration plus profonde en raison de l'altération de la barrière cutanée²³⁵. Dans de tels cas, la décontamination des victimes doit être réalisée rapidement et efficacement. Actuellement, aucune méthode de décontamination adéquate n'est disponible. Par exemple, le RSDL a un impact négatif sur le processus de cicatrisation des plaies²³⁶, et la TF sous forme de poudre peut potentiellement conduire à la nécrose des tissus environnants et à une absorption éventuelle dans la circulation sanguine. Des recherches récentes ont exploré une nouvelle formulation de nanoémulsion contenant du calixarène pour la décontamination cutanée contre l'exposition à l'uranium²³⁷. Cette formulation a été testée sur divers modèles de peau endommagée, comme rapporté par Grives et al.¹²¹. Les résultats *ex vivo* de ces études démontrent que ces nanoémulsions présentent un potentiel en tant qu'alternative viable pour le traitement de la peau endommagée contaminée.

Les formulations filmogènes introduites ici, en raison de leur facilité de pelage au niveau cutanée, de leur capacité de séquestration contre le POX, de la non-volatilisation de la TF

(évitant la toxicité et la nouvelle contamination), ainsi que de leur absence de toxicité cellulaire, présagent bien de leur utilisation sur une peau blessée non hémorragique.

Diverses méthodes ont été élaborées dans le but de créer des lésions cutanées pour les expérimentations en laboratoire, dont la méthode du « Tape-stripping » utilisant du ruban adhésif afin d'ôter le SC. Alternativement, la technique d'abrasion à l'aiguille hypodermique endommage la peau au niveau de la couche désirée²³⁸. D'autres méthodes, bien que moins courantes, telles que l'irradiation UVA et UVB, sont utilisées *in vivo* chez la souris²³⁵. Cependant, au regard des résultats obtenus entre chaque étude utilisant différentes méthodes de lésion, il est primordial de mettre au point un modèle prédictif reproductible de peau lésée pour évaluer la pénétration des contaminants. Dans cet objectif, des tests préliminaires ont été réalisés dans le but de développer deux modèles de peau lésée *ex vivo* sur des explants de peau d'origine porcine. Un modèle de brûlure du second degré par l'utilisation de plot en laiton chauffé (altération du SC et de l'épiderme) a été mis en place, ainsi qu'un modèle de coupures cutanées obtenues grâce à un outil de scarification standardisé créé par impression 3D. Des coupes histologiques ainsi que l'évaluation de la pénétration du POX à travers ces modèles de peau ont été analysées afin de valider les modèles développés (**Figure 43 A**).

Différentes températures de chauffage ont été utilisées pour créer les modèles de brûlures, variant de 60 à 80°C, dans le but de déterminer la plus adéquate. En ce qui concerne le modèle de coupure, des incisions d'une profondeur de 200 à 300 µm ont été réalisées pour effectuer 3 incisions sur chaque explant (Figure 43 A). On observe une nette amélioration de la cinétique de pénétration du POX lorsque la peau est altérée, que ce soit par brûlure ou par coupure (**Figure 43 B**). Toutefois, il convient de répéter ces tests afin de valider pleinement les modèles.

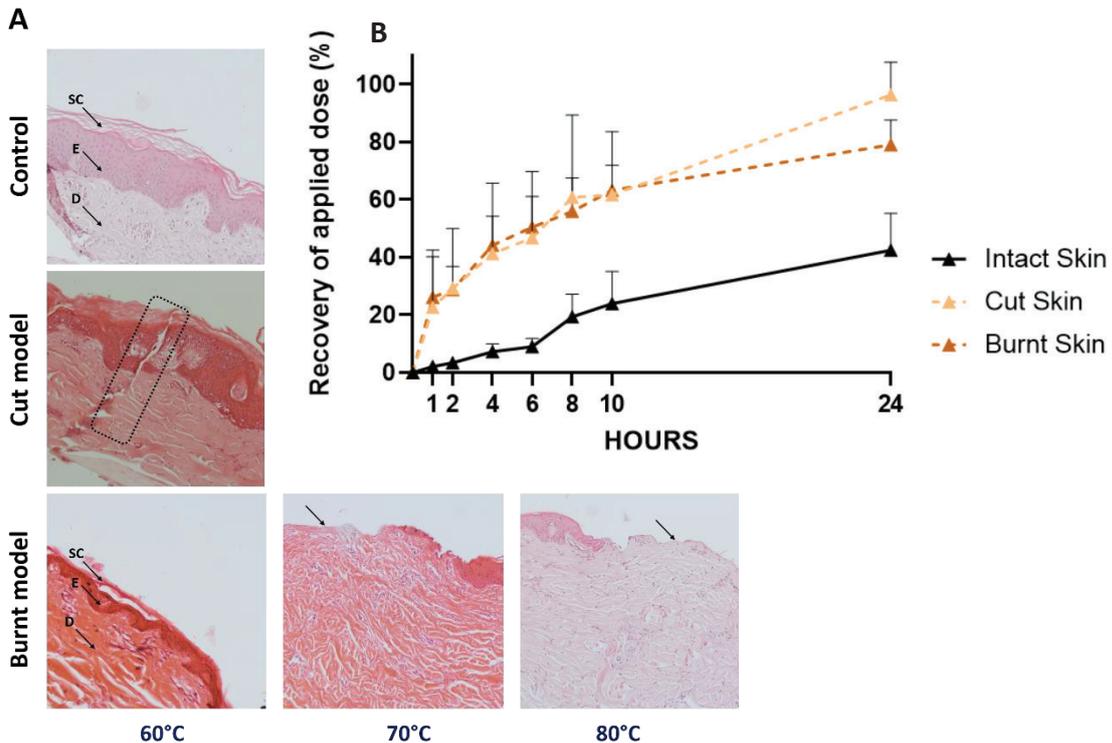


Figure 43 - Développement de modèles de peau lésée *ex vivo* sur des explants de peau d'origine porcine A) Coupes histologiques des différents modèles de peau lésée (coupure ou brûlure du second degré) (n=1 pour chaque condition), B) Cinétique de pénétration du POX à travers les peaux lésées en VitroPharma (coupure et brûlure) en comparaison à une peau saine (n=6 pour intact skin, n= 4 pour burnt skin et n=2 pour cut skin).

4. La décontamination des surfaces

Les surfaces contaminées peuvent présenter un risque de propagation des agents toxiques à d'autres personnes et favoriser leur dispersion, ce qui peut augmenter les risques d'exposition et de contamination. Une décontamination rapide et efficace des surfaces peut contribuer à réduire ces risques et à protéger la santé des personnes. En outre, la présence d'agents toxiques de guerre sur les surfaces peut également présenter des risques pour l'environnement et la faune locale, causant des dommages écologiques importants. A cet effet, quelques méthodes de décontamination sont disponibles en fonction du type d'agent toxique et de la surface à traiter. Cependant, ces méthodes sont souvent lourdes utilisant des produits agressifs pour l'environnement et les matériaux, ce qui nécessite donc une grande prudence lors de leur emploi.

Pour la décontamination des petites surfaces et des équipements sensibles, tels que ceux contenant de l'électronique ou des matériaux fragiles ne pouvant pas résister aux produits chimiques corrosifs (appareils de détection et de mesure par exemple), des systèmes sous vide peuvent être utilisés. Néanmoins, leur inconvénient majeur réside dans la difficulté de mise en place ainsi que leur coût très élevé. Par ailleurs, l'utilisation de gants poudreux et de certaines lingettes absorbantes disponibles sur le marché, comme les lingettes de

décontamination DECPOOL ABS® produites par la société française Ouvry, permet de déplacer le contaminant par extraction et de le stocker rapidement.

Dans le futur, il serait intéressant de tester les propriétés décontaminantes (en accord avec la norme AEP65 -Def 003-essais phase 2) sur des surfaces de référence en contexte opérationnel, telles que de l'inox, du polyéthylène haute densité PEHD, ou la peinture de véhicule « Brun Terre de France », qu'elles soient lisses ou texturées. Ces surfaces sont les plus communément rencontrées sur le terrain militaire. Ainsi, si les résultats se révélaient concluants, cela permettrait de décontaminer tous types de surface, notamment les plus sensibles, grâce à des formulations à faible coût et non corrosives.

CONCLUSION GENERALE

La compréhension des mécanismes d'action des agents chimiques de guerre sur l'organisme, en particulier celles des COPs, a ouvert la voie au développement de méthodes de décontamination cutanée plus adaptées en cas d'incident ou d'attaque. Les nombreux efforts ayant conduit à la mise en place des méthodes de décontamination actuellement en usage, comme le RSDL, l'eau et la TF sous forme de poudre, offrent à de nombreux laboratoires de tirer parti de leurs avantages pour réfléchir et concevoir de nouvelles méthodes innovantes pour la décontamination cutanée, en prenant en compte leurs limites. De plus, les récents conflits entre les pays voisins soulignent la réalité non négligeable de potentielles attaques chimiques, pouvant impliquer des milliers de militaires ainsi que la population civile dans des situations de plus en plus graves.

Ce projet s'est inscrit directement dans cette optique, et avait pour vocation de proposer une alternative à l'utilisation des méthodes actuelles pour la décontamination cutanée. Ces formulations versatiles élaborées à cette fin consistent en des solutions de polymères filmogènes de PVA permettant l'incorporation de TF, de TS et de surfactants. Cette nouvelle forme présente plusieurs avantages :

- Limiter la volatilisation de la TF ou de la TS, car incorporée dans une matrice de polymères, elle ne se libère pas
- Séquestrer le POX en son sein lors du processus de décontamination, durant lequel les films peuvent être facilement retirés d'une surface cutanée, permettant ainsi une meilleure gestion des déchets contaminés.
- Réduire considérablement les coûts finaux, en raison de son nombre limité en composants. Ceci pourra permettre dans le futur si toutes les conditions sont réunies de pouvoir doter plus facilement les forces armées.

Les propriétés de décontamination *in vitro* des formulations face au POX ont permis la sélection de 4 formulations présentant un intérêt particulier. Leur facilité d'utilisation, de retrait de la surface cutanée ainsi que leur capacité de séquestration attestent de leur compatibilité pour une application *ex vivo* et *in vivo*. L'efficacité de décontamination *ex vivo* des formulations filmogènes de TF ainsi que celle de la TS conduit à des résultats prometteurs, avec des DE supérieurs aux méthodes de référence actuelles (TF sous forme de poudre, RSDL et de l'eau) pour les formulations de TF. Néanmoins, bien que les résultats *in vivo* sur le modèle de souris SKH1 ne permettent pas de conclure quant à l'efficacité de décontamination, ces expérimentations doivent être reconduites dans des conditions appropriées afin de confirmer le potentiel de nos formulations filmogènes.

ANNEXES

Liste des publications

- Article 1 : Danoy, A. **Durmaz, K.**, Paoletti, M., Vachez, L., Roul, A., Sohier, J & Verrier, B (2022). Aqueous suspensions of Fuller's earth potentiate the adsorption capacities of paraoxon and improve skin decontamination properties. *Journal of hazardous materials*. doi: [10.1016/j.jhazmat.2021.127714](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127714)
- Article 2: **Durmaz, K.**, Misbach, M., Danoy, A., Salvi, J-P., Bloch, E., Bourelly, S., Verrier, B & Sohier, J. An innovative Fuller's earth-based film-forming formulation for skin decontamination against organophosphorus compound. *Journal of hazardous materials*, Soumis en révision (Septembre, 2023)
- Publication de l'article 1 dans l'ouvrage « Dermal Absorption and Decontamination, A Comprehensive Guide" par M. Feschuk, A., M. Law, R et I. Maibach, H (pages 147-167)

Communications orales

- **27^{ème} Journée scientifique de l'EDISS (École doctorale interdisciplinaire Sciences-Santé)** ; Novembre 2022 (Lyon)

Durmaz, K., Misbach, M., Danoy, A., Salvi, J-P., Verrier, B & Sohier, « An innovative phyllosilicate-based hydrogel for skin decontamination against chemical warfare agents »

- **32nd Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB)**; Septembre 2022 (Bordeaux)

Durmaz, K., Misbach, M., Danoy, A., Salvi, J-P., Verrier, B & Sohier, « An innovative phyllosilicate-based hydrogel for skin decontamination against chemical warfare agents »

- **Printemps du LBTI** ; 2023 (Congrès interne)

Durmaz, K and Sohier, J « CBRNE risks and protection: development of innovative methods for decontamination »

Communications par affiches

- **Printemps du LBTI 2022 & 2023** (Congrès interne)

Durmaz, K., Misbach, M., Danoy, A., Salvi, J-P., Verrier, B & Sohier, « An innovative phyllosilicate-based hydrogel for skin decontamination against chemical warfare agents »

- **33nd Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB)**; Septembre 2023 (Davos, Suisse) + Flash présentation

Durmaz, K., **Misbach, M.**, Danoy, A., Salvi, J-P., Verrier, B & Sohier, « An innovative phyllosilicate-based hydrogel for skin decontamination against chemical warfare agents »

Évènements de vulgarisation scientifique

- **Fête de la Science 2021** : Développement d'hydrogels thermosensibles pour la vaccination

Activités d'encadrement/enseignement

- **Stagiaire de Master 2**
Magaly Misbach (M2 Biologie de la peau - Université Claude Bernard Lyon 1– 2022)
- **Ingénieure d'étude**
Magaly Misbach (Durée de 6 mois sur le projet de thèse– 2022)

Annexe 1

Aqueous suspensions of Fuller's earth potentiate the adsorption capacities of paraoxon and improve skin decontamination properties

Journal of Hazardous Materials 2022; DOI: [10.1016/j.jhazmat.2021.127714](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127714)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat

Aqueous suspensions of Fuller's earth potentiate the adsorption capacities of paraoxon and improve skin decontamination properties

Alix Danoy^a, Kardelen Durmaz^{a,*}, Margaux Paoletti^a, Laetitia Vachez^a, Annick Roul^{a,b}, Jérôme Sohier^a, Bernard Verrier^a

^a 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

^b Pole Santé, Direction Générale de la Sécurité Civile et de la Gestion des Crises, Ministère de l'Intérieur Paris, France

ARTICLE INFO

Editor: Dr. C. LingXin

Keywords:

Smectite
Paraoxon
Toxicity
Skin penetration
Decontamination efficiency

ABSTRACT

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

1. Introduction

Fuller's earth (FE) is a clay that has been used for hundreds of years for woolen fulling in order to clean wool to eliminate oils, dirt and impurities (Kherdekar and Adivarekar, 2017). Due to its adsorptive capacities, modern uses of FE have been extensively developed, ranging from absorbent for cat litter to carrier for fertilizers or active ingredient in cosmetic products (Rehan et al., 2019). Interestingly, one of its most intriguing use concerns dry skin decontamination in the military field. Indeed, chemical warfare agent (CWA) still represents a threat, both for civilian (Ciottone, 2018; Haines and Fox, 2014; Pitschmann, 2014) and military populations. Organophosphorus compounds (OPC) are among the most detected chemical compounds in the environment due to their use as pesticides (such as paraoxon (POX)) and nerve agents (tabun, sarin, soman, VX) (Naughton and Terry, 2018). Because most OPCs have a low volatility, their absorption through the dermal route remains predominant in comparison with the respiratory one (John et al., 2015; Thors et al., 2016), meaning that any system acting by adsorption and

displacement of the toxic agent from the skin surface could be an efficient decontaminant product. Thus, FE, which is unexpansive, easy to obtain, and composed of layers with high ion exchange capacities (Taylor et al., 2006) favoring interaction with OPCs, has largely been used for OPCs decontamination. As illustrated by previous *ex vivo* and in vivo studies, this phyllosilicate has been shown to be the reference agent applied for skin decontamination following CWA exposure (Bjarnason et al., 2008; Chilcott et al., 2001; Taysse et al., 2011).

FE is a dusty agent that easily induces aerosols, favoring the propagation of contaminated dust and particles which could be inhaled by surrounding people and thus represents a new threat by cross-contamination (Denet et al., 2020). One way to bypass this problem could be the use of water suspension of FE as recently described (Roul et al., 2017). Even if most of the OPC materials have low water-solubility (for example POX is soluble at 2.4 g/L), an aqueous suspension of FE could offer a strong added value for decontamination. In their paper, Roul and collaborators (Roul et al., 2017) have shown that aqueous suspension of FE (10 g into 100 mL) limit skin penetration of

* Corresponding author.

E-mail address: kardelen.durmaz@ibcp.fr (K. Dumaz).

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127714>

Received 16 August 2020; Received in revised form 2 November 2021; Accepted 3 November 2021

Available online 12 November 2021

0304-3894/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

4-cyanophenol. Thus, suspension's decontamination efficacy of this compound was proved to be better than FE powder or water alones, meaning that the contaminant is better entrapped.

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

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

2. Materials and methods

2.1. Material

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

2.2. Toxicity

2.2.1. In vitro cell toxicity

Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF), passages 9–12, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL). Human primary keratinocytes (HPK) extracted from foreskin, passage 1–4, were cultured in keratinocytes-SFM medium supplemented with bovine pituitary extract, 1% Penicillin-Streptomycin (5000 U/mL), Epidermal Growth Factor and CaCl_2 . Both cell lineages were maintained in a 37 °C incubator (Heracell 150i, Thermo Scientific USA), under 5% CO_2 and 95% humidity. All the compounds for the cell media were purchased from Gibco (Thermo Fisher Scientific, USA). Three FE suspensions were prepared, respectively 5%, 9.1% and 15% w/w, in PBS 1X (Gibco, USA) and then filtered on 0.22 μm single-use polycarbonate filters (Merck Millipore, USA). The filtered supernatants were left at room temperature until they were added into cells for 30 min of incubation before washing with cell media and cell viability evaluation by the MTT technique. Cytotoxicity assays were done 40 h after the coating of 96 wells plate with a density of 10,000 or 15,000 cells per well for respectively NHDF and HPK, with MTT cytotoxicity assays reagent from Sigma Aldrich (USA) as described by the protocol.

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

2.2.2. In vivo *Danio rerio* toxicity

Fish embryo toxicity test (FET) on zebrafish (*Danio rerio*) was made in agreement with OECD 236 guideline (see Fig. S2 in Supplementary data). Briefly, zebrafish were obtained from Institut de Génétique Fonctionnelle de Lyon (IGFL) where they were maintained in closed flow-through system with a temperature of 26 ± 1 °C and a 16 h light / 8 h dark cycle. After fertilization, newly fertilized eggs were collected and selected under binocular microscope: embryos with normal development staging from the zygote stage to the gastrula stage were distributed on a 24-well plate (Thermo Fisher Scientific, USA), one embryo per well. One condition per plate was tested: 3,4-dichloroaniline (Sigma Aldrich, France) at 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ used as negative control, aquarium water (E3) used as positive control, and FE suspensions in water aquarium at 5%, 9.1% and 15% w/w. Every well was filled with 2 mL of solution, and embryos viability was assessed every 24 h using microscope and toxicological endpoints as criterions (coagulated embryo, absence of heartbeat, non-detachment of the tail, absence of somitis formation) for 4 days. Alive fishes were analyzed to determine if they had any morphological abnormalities before observing their mobility with a ZebraBox equipped with ZebraLab software (Viewpoint Behavior Technology, France) by 5 min' light cycle exposition before 3 min' dark cycle.

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

2.3. Ex vivo cell diffusion assays

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

2.3.1. Skin explants

Frozen pig ears (Proviskin, France) obtained from a slaughterhouse were thawed, shaved and dermatomed (Aesculap GA 630 model) at 500 μm . Individual disks of 2 cm^2 were cut off to fit into VitroPharma system. Abdominal human skin (Proviskin, France) was obtained after approval from women who have had abdominal plastic surgery and stored as frozen 2 cm^2 disks dermatomed at 500 μm . Before the experiment, each skin explant was controlled with a caliper in order to have a homogeneous thickness of $500 \mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$, and skin integrity was visually assessed by microscopy.

2.3.2. Decontamination protocols

Contaminated skins were obtained after the deposit of 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of Paraoxon-diethyl (Sigma Aldrich, France) (paraoxon or POX) as simulant of VX nerve agent. In accordance with the standard NF X52–122, decontamination was realized after 30 min to evaluate decontamination efficiency for delayed decontamination. For dry decontamination, 0.16 g/cm^2 of Fuller's earth (NBC-Sys, France) were applied. Wet decontamination occurs through the use of water (Otec®, Aguetant, France) or FE aqueous suspensions prepared at 5%, 9.1% and 15% w/w using Otec® water (Aguettant, France). In each case 102 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of liquid were deposited. For both decontamination protocols, the decontaminant was

left on the skin for 2 min before being removed and then the skin was dry by patting with a pad.

2.3.3. Collection and treatment of samples

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

2.3.4. Quantification by HPLC-UV

Concentration of POX was determined by liquid chromatography using a quaternary pump (Agilent Technologies 1260 Infinity), vial auto sampler (Agilent Technologies 1260 Infinity II) and photodiode array detector (Agilent Technologies 1200 Series). Mobile phase was composed by 52.25% of methanol (HPLC grade, Carlo Erba, Italy); 42.75% of milliQ water (ultrapure analytical water with $r = 18$ m Ω /cm, Millipore, USA) and 5% of acetic acid glacial (HPLC grade, Carlo Erba, Italy), the whole at a flow rate of 0.7 mL/min. 10 μ L of sample were brought to the C18 Cliepus column (5 μ m, 100 \times 40 mm) heated at 40 °C. POX was identified at 269 nm UV wavelength with a retention time of 5.9 min (Salemo et al., 2017). The linearity of the method was assessed for POX concentration in the range 1.95–2000 ng/mL ($R^2 = 0.999$) with a limit of detection (LOD) = 0.31 ng/mL and a limit of quantification (LOQ) = 1.95 ng/mL.

The value for the kinetic profiles and for the quantification into cell diffusion compartments and skin layers were compared between them and statistically analyzed using a one-way ANOVA coupled either with Dunnett or Tuckey multiple comparison post hoc analysis.

2.4. Ex vivo evaluation of a skin decontaminant

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

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

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

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

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

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

2.5. Statistical analysis

Data was statistically analyzed using GraphPad Prism Version 7.0

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

3. Results

3.1. Toxicity of Fuller's earth suspensions

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

3.1.1. FE suspensions' supernatant cytotoxicity

Toxicity of particles with a size < 0.22 μ m was evaluated in vitro on two types of skin cells: Human Primary Keratinocytes (HPK) and Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) after 30 min of contact (see materials and methods Section 2.2.1.). As keratinocytes compose the top skin layer, which is epidermis, they are the first ones in contact with the product. Regardless of the concentration of the suspensions, no toxic effect on cell viability of FE supernatant was observed, in comparison with the two negative controls: cell media and PBS 1X (Fig. 1). NHDF, on the other hand, are founded in the dermis under the epidermis: they are in contact with an external element only in the case of a skin lesion. Interestingly, PBS 1x in which the suspensions were made also exhibits a significant toxic effect on NHDF, which indicates that the suspensions are not more toxic than PBS (Fig. 1).

3.1.2. In vivo toxicity of FE suspensions

To address a potential toxicity due to the FE suspension concentration, *Danio rerio* fish embryos have been immersed for 4 days into

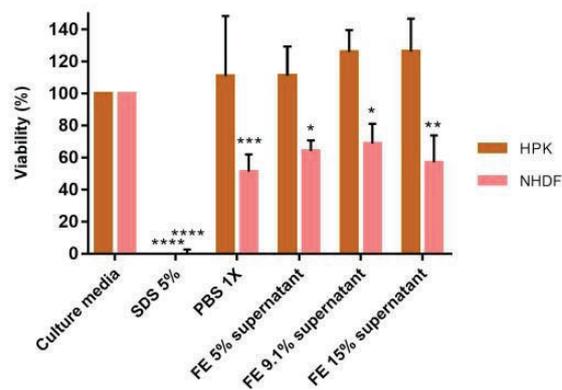


Fig. 1. *In vitro* cell toxicity of FE supernatants filtered (size < 0.22 μ m) from FE PBS 1X suspensions at different concentrations, on Human Primary Keratinocytes (HPK) and Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDF) ($n = 4$ for each). Results were statistically analyzed using two-way ANOVA followed by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

different amount of FE suspensions, respectively 5%, 9.1% and 15% w/w. Their viability was assessed as described in Section 2.2.2 using optical microscopy. Observations have been done to differentiate embryos without and with morphological abnormalities such as development default, curved tail or cardiac edema (Fig. 2). The presented figure is a picture of the viability after 4 days of immersion, meaning that fish embryos that have died on previous days are also counted.

No significant difference was observed on global survival and the occurrence of anomalies depending on the suspensions' concentration (Fig. 3). When analyzing the mean ground covered for 3 min of light after 4 days of immersion, the 15% suspension impact fish mobility but not significantly. However, as 15% of FE implies a strong increase in water viscosity, we could not exclude that these observations are due to physical impairment of fish mobility.

3.2. Ex vivo decontamination assays

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

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

Ex vivo POX penetration kinetics through pig ear skin is linear over time for 24 h, reaching the value of $13.59 \pm 0.78\%$ of the applied dose find in the receptor compartment (Fig. 4). At the opposite, *ex vivo* skin diffusion on human abdominal skin follows a more complex kinetics. Indeed, the penetration seems to take place in several stages: it follows the same pattern as the one for pig ear skin during 4 h before a strong increase in the amount of POX in the receptor. From 8 h of POX diffusion, significant differences are observed between pig ear skin and human abdominal skin profiles. These observations are supported by the quantification of POX into each compartment that makes up the diffusion cell, i.e. the skin surface, the skin and the receptor, and each skin layers, i.e. *stratum corneum* (SC), epidermis and dermis (Table 1). Stronger significant differences between both skin origins are found in the receptor and in the skin surface, whereas pig ear epidermis contains significantly lower quantity of contaminant than the human abdominal epidermis.

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

After assessing the POX penetration profiles on both skin origins explants, decontamination efficiencies of FE powder, water and FE 9.1% suspension were evaluated into both pig and human skins. This suspension' concentration was chosen as it was the one developed by Roul

et al. (2017), that has proven to have a better decontamination efficiency than FE powder or water alones for 4-cyanophenol skin decontamination.

The same decontamination protocol was applied for each decontamination method and the kinetics of POX penetration through skin were evaluated for 24 h (Fig. 5). The profiles of the contaminant penetration curves differ according to the type of decontaminant used but not according to the nature of the skin. After 8–10 h of diffusion, a plateau is observable when the decontamination was done with the 9.1% suspension, whereas for FE powder and water decontamination there is only an inflection point in the curve. Despite these observations, there is not significant difference in the quantity of POX found in the receptor after 24 h of diffusion, depending on the decontamination methods or skin origins.

At the end of the experiment, POX quantification in each skin layers highlighted differences between decontaminants and skin origins (Table 2). Indeed, after FE powder decontamination POX significantly accumulates in the SC regardless of the skin' nature. Furthermore, for this condition, when contaminant content in human abdominal skin is compared with the one in pig ear skin a significant difference showing an accumulation in favor of the first one is observed for skin surface, epidermis and dermis. Tested decontamination formulations are effective on both pig ear and human abdominal skins, with an increase efficiency between FE powder, water and FE 9.1% suspension.

3.2.3. Relationship between FE suspensions' concentration and decontamination efficiency

The added value of the FE 9.1% suspension compared to FE powder in terms of POX accumulation in the SC has been illustrated by the Table 2. Then, a dose effect of FE concentration has been further investigated using 5% and 15% suspensions.

For each concentration, a plateau effect in the kinetic profile is observed from 8 h of POX diffusion onwards, as presented in Fig. 6. No significant differences are observed in the amount of contaminant in the receptor depending on the FE concentration for each suspension and on the skin origin. The contaminant quantification in skin layers after 24 h of diffusion highlights some differences mostly depending on the skin nature (Table 3). Indeed, higher POX accumulation into skin surface, epidermis and dermis for the human skin decontamination with FE 5% suspensions is mainly due to an outlier in the dataset. For the SC compartment, there is a significant accumulation of the contaminant in the human abdominal skin in comparison with the pig ear skin. This can lead to a prolonged release even if the penetration kinetic of the POX shows a plateau from 8 h in human skin, leading to same percentage of applied dose find in the receptor in the two skins for a given decontamination method.

3.3. Comparison of skin origins and of decontamination methods

Decontamination methods were evaluated in comparison with POX skin contamination alone for both pig and human skins (Table 4). The

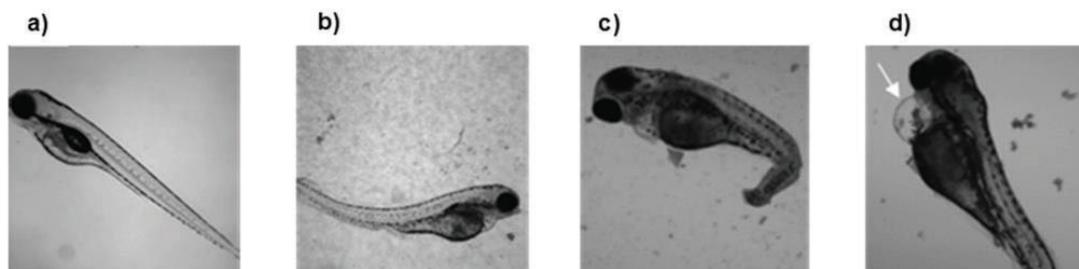


Fig. 2. : Morphological observation of 4 days old *Danio rerio*. a) Normal development; b) Global development default; c) Curved tail; d) Cardiac edema.

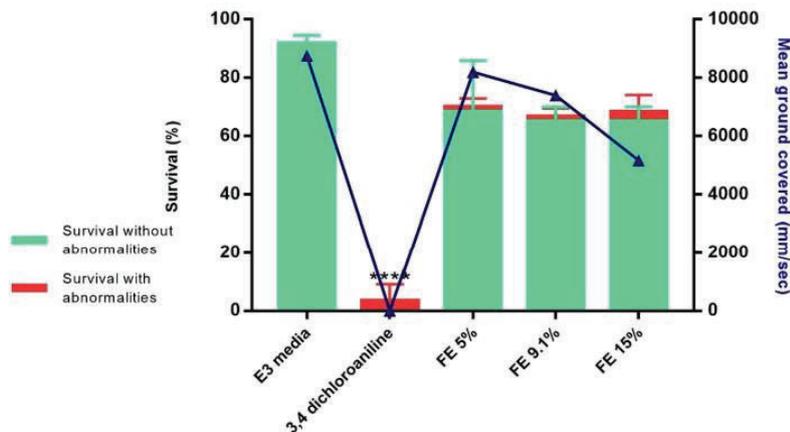


Fig. 3. : Survival rate of *Danio rerio* with and without morphological abnormalities and mean ground covered after 4 days on immersion in aquarium media (E3), negative control (3,4-dichloroaniline) and three different concentrations of FE aqueous suspensions into E3 media (n = 3 for each). Results were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

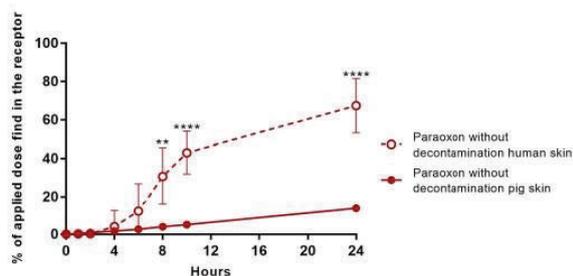


Fig. 4. : *Ex vivo* POX penetration assessment through pig ear skin and human abdominal skin without decontamination: kinetic of diffusion of applied POX dose through skin for 24 h (n = 6 for each time). Results were statistically analyzed using unpaired *t*-test. Values are presented as mean \pm SD. **: p < 0.01, ****: p < 0.0001.

Table 1

Percentage of applied dose of POX found at the skin surface, trapped into skin layers and passed through the skin after 24 h of diffusion without decontamination method into pig ear skin and human abdominal skin (n = 6 for each). Results were statistically analyzed using unpaired *t*-test. Values are presented as mean. ****: p < 0.0001.

Skin model	Skin surface	Stratum corneum	Epidermis	Dermis	Receptor
Pig ear skin	69.84% ****	5.55%	0.64%*	2.21%	13.59%****
Human abdominal skin	3.82%	3.13%	1.57%	3.99%	67.46%

quantity of contaminant absorbed by the skin, meaning find in the *stratum corneum*, the epidermis, the dermis and the receptor compartment, is significantly lower when decontamination methods are applied, no matter which type. Furthermore, for the same applied dose, the quantity of POX absorbed by human abdominal skin is significantly higher than the one for pig ear skin.

For both skin models, *in vitro* decontamination efficiency of FE powder is the lowest. Whereas there are not significant differences for the *in vitro* decontamination efficiencies depending on the decontamination method applied on pig ear skin, wet decontamination is significantly more effective than dry decontamination into human abdominal skin. The use of FE suspensions into pig ear skin leads to significant lower decontamination efficiencies values than the ones on human

abdominal skin with the same aqueous decontaminants. Thus, it appears that pig ear skin is a good predictive model for the assessment of the decontamination efficiency because there is no risk of overestimation when extrapolated to human skin.

The functional prognosis improvement factor defined as the ability of each decontaminant to capture the contaminant on the skin surface (see materials and methods Section 2.4.) is not impacted by the type of decontamination method used for a given skin origin. Although FE powder decontamination presents the lowest value in both skins, there are not significant differences with wet decontamination. However, the use of FE 5% suspension induces an increase of the functional prognosis improvement factor significantly higher in the pig ear skin than in the human abdominal skin: these result can be explained by an exceptional value in the human skin dataset, increasing the global percentage of contaminant find on the skin surface. This factor can't be used to significantly classified decontamination methods according to their efficiency.

The more pronounced effect of the suspensions on pig ear skin is explained by histological differences with human skin, that will be discussed in the next session.

4. Discussion

Toxicity of clays in general is not very well documented, and even more surprising when Fuller's earth (FE) is concerned, in particular its potential unsafe use regarding skin contact. First of all, when analyzing the toxicity of ultrafiltrable compounds released by water suspension of FE, our *in vitro* skin cells toxicity tests on filtered supernatant illustrated two information. Keratinocytes, which are cells from the epidermis, are not impacted in their viability by the application of neither PBS 1X or various concentrated supernatants of filtered FE suspensions. Although the measured toxicity of PBS 1X on NHDF can be attributed to their structural differences with HPKs (due to a stronger resilience and tolerance to external aggressions), it allows to determine that FE supernatants do not induce a higher cytotoxicity that PBS 1X. Han et al. (2011), previously demonstrated that clays suspensions at 1000 μ g/mL are not toxic on human skin fibroblasts (CCD986sk) whereas Sandri et al. (2014), shaded this purpose by the observation of a tendency of decrease in cell viability of NHDF incubated with montmorillonite nanocomposites from 150 to 300 μ g/mL. However, *in vitro* toxicity assessment is highly dependent on the clay mineral and its structure in addition of the nature of the cell line (Maisanaba et al., 2015). Based on suspensions' effect of raw FE, the results on keratinocytes are in accordance with the ones of Janer et al. (2014), that recorded low toxicity of FE supernatants. To our knowledge, it is the first study that characterizes

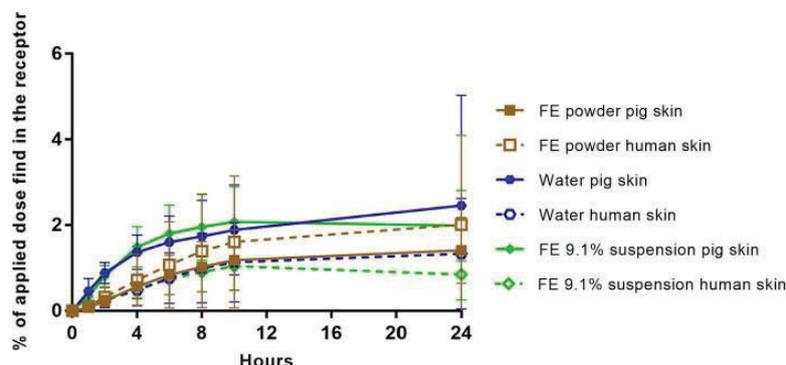


Fig. 5. : *Ex vivo* POX penetration assessment through pig ear skin and human abdominal skin with 3 decontamination methods following the same protocol (FE powder, water and FE 9.1% aqueous suspension): kinetic of diffusion of applied POX dose through skin for 24 h ($n = 6$ for each time). Results were statistically analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. Values are presented as mean \pm SD.

Table 2

Percentage of applied dose of POX found at the skin surface, trapped into skin layers and passed through the skin after 24 h of diffusion with 3 different decontamination methods (FE powder, water, FE 9.1% suspension) into pig ear skin and human abdominal skin ($n = 6$ for each). Results were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests between each skin origins and decontamination methods. Values are presented as mean. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.0001$.

Decontamination method	Skin model	Skin surface	Stratum corneum	Epidermis	Dermis	Receptor
FE powder	Pig ear skin	0.89%	3.18%*	0.30%	0.36%	1.43%
	Human abdominal skin	5.28%***	3.98%**	1.71%**	3.48%**	2.01%
Water	Pig ear skin	0.78%	0.21%	0.05%	0.09%	2.45%
	Human abdominal skin	0.56%	0.59%	0.24%	0.46%	1.33%
FE 9.1% suspension	Pig ear skin	0.06%	0%	0.01%	0.02%	1.99%
	Human abdominal skin	0.48%	0.87%	0.29%	0.29%	0.85%

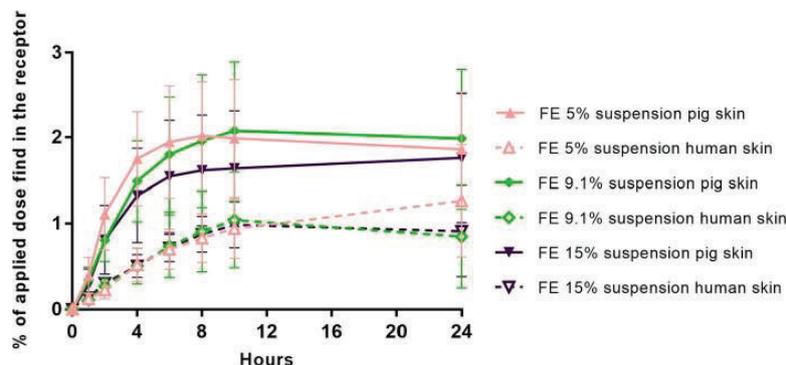


Fig. 6. *Ex vivo* POX penetration assessment through pig ear skin and human abdominal skin with FE aqueous suspensions as decontaminant at 3 different concentrations (5%, 9.1% and 15%): kinetic of diffusion through skin for 24 h ($n = 6$ for each time). Results were statistically analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests. Values are presented as mean \pm SD.

FE's intrinsic toxicity using *Danio rerio* model. Most of the time this type of experiment allows to determine adsorption properties of clays in order to diminish environmental water contamination (Gupta et al., 2016; Kansara et al., 2019). Here, the classical fish embryo toxicity test was coupled with a mobility test: no suspension has an effect of fish viability, while the more concentrated one has an impact on mobility. These results are in accordance with the ones of Abdel-Wahhab et al. (1999) and Dwyer et al. (1997), who gave ingested clays to rats and chickens in order to detoxify them after toxin ingestion. Neither models showed toxicity leading to the conclusion that clays are safe to use. Taken together, *in vitro* and *in vivo* toxicity tests suggest that FE suspensions are safe to use on undamaged and healthy skin in a

concentration range from 5% to 9.1% w/w.

Furthermore, pig ear skin was studied as a predictive model for *ex vivo* human skin decontamination studies of paraoxon as a model for VX organophosphorus compound. Indeed, although human excised skin is considered as the gold standard for *in vitro* skin penetration experiments (Barbero and Frasch, 2009), its use is complicated due to ethical and supply difficulties. The presence of the papillary body and the large content in elastic tissue of its dermis in addition to the highly differentiated epidermis make pig skin a good substitute for human skin to assess *ex vivo* skin penetration. Just like for human skin, pig skin presents differences in terms of permeability as a function of the age, sex or anatomical region. In et al. (2019), compared histological and functional

Table 3

Percentage of applied dose of POX found at the skin surface, trapped into skin layers and passed through the skin after 24 h of diffusion with FE aqueous suspensions as decontaminant at 3 different concentrations (5%, 9.1%, 15%) into pig ear skin and human abdominal skin (n = 6 for each). Results were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison tests: comparison were made between all the values for given compartment and significance is by comparison with the letter (i.e., for skin surface, values are only significantly different to the one for human skin abdominal skin decontaminated with FE 5% suspension). Values are presented as mean. *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.005.

Decontamination method	Skin model	Skin surface	Stratum corneum	Epidermis	Dermis	Receptor
FE 5% suspension	Pig ear skin	0.06% ^(a)	0.02% ^{(a)(b)}	0% ^(e)	0.07% ^(f)	1.86%
	Human abdominal skin	0.83% ^(a)	0.81% ^(b)	0.28%	0.40% ^(f)	1.26%
FE 9.1% suspension	Pig ear skin	0.06% ^(a)	0% ^{(a)(c)}	0.01% ^(e)	0.02% ^(f)	1.99%
	Human abdominal skin	0.48%	0.87% ^(c)	0.29% ^(e)	0.29%	0.85%
FE 15% suspension	Pig ear skin	0.12% ^(a)	0.16% ^(d)	0% ^(e)	0.04% ^(f)	1.76%
	Human abdominal skin	0.53%	0.78% ^(d)	0.18%	0.13%	0.91%

Table 4

Evaluation of skin decontamination methods following the quantity of POX absorbed by the skin (i.e. the percentage of applied dose find in the stratum corneum, the epidermis, the dermis and the receptor), the in vitro decontamination efficiency and the functional prognosis improvement depending on skin origin (n = 6 for each). Results were statistically analyzed using unpaired t-test for the comparison of each values of pig ear skin and human abdominal skin; and one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used to compare values between them for a given skin origin. Values are presented as mean. *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.0001.

Decontamination method	Pig ear skin			Human abdominal skin		
	Quantity of POX absorbed by the skin	In vitro decontamination efficiency	Functional prognosis improvement factor	Quantity of POX absorbed by the skin	In vitro decontamination efficiency	Functional prognosis improvement factor
No decontamination	21.77% ^(a) ; ****	–	–	76.15% ^(b)	–	–
Fuller's earth powder	5.27% ^(a) ; ****	75.81%	23.18	11.18% ^(c) ; ****(b)	85.32% ^(d)	14.53
Water	2.81% ^(a) ; ****	87.11%	48.71	2.62% ^{(a)(b)(c)} ; ****	96.55% ^(d) ; ****	31.81
FE 5% suspension	1.95% ^(a) ; ****	91.04% ^{**}	53.19 *	2.75% ^{(a)(b)(c)} ; ****	96.39% ^(d) ; ****	23.51
FE 9.1% suspension	2.01% ^(a) ; ****	90.75% ^{**}	53.10	2.30% ^{(a)(b)(c)} ; ****	96.98% ^(d) ; ****	36.14
FE 15% suspension	1.96% ^(a) ; ****	91.01% ^{**}	71.5	2.00% ^{(a)(b)(c)} ; ****	97.38% ^(d) ; ****	34.21

anatomical regions of porcine skin, including the ear, with human abdominal skin. Several significant differences have been identified, in particular for the SC, the dermo-epidermal interface and the dermis thickness that are larger in the human model. These variations in layer thickness leads to a significant difference in the epidermal-dermal thickness ratio; 1:19 for human abdominal skin versus 1:14 for pig ear skin. It means that even if both explants are dermatomed at 500 µm, the pig one has a larger dermal hydrophilic component. Despite these differences, skin from the pig ear is the more appropriate anatomical site in order to predict human skin penetration (Boudry et al., 2008; Gerstel et al., 2016; Schmook et al., 2001). Penetration abilities of various compounds are impacted by the skin nature which is mainly greater for animal skin than for human skin, leading to a possible overestimation of the human percutaneous absorption (Kraeling et al., 2018; Vallet et al., 2007). The receptor medium could as well influence POX penetration behavior between human and pig skins. However, various studies have shown that receptor medium do not modify the differences of contaminant penetration between pig and human skin. For instance, a study by Boudry et al., 2008 showed higher parathion penetration in pig skin compared to human skin (7.5% against 20.7%), while using Eagle medium supplemented with BSA and Gentamycin as receptor medium. Similarly, Chilcott et al., 2001, showed that the absorption of Sulfur mustard through pig ear skin was 2.6 times higher than that of human skin using 50% aqueous ethanol in the receptor medium. Finally, other studies showed that using another receptor medium, such as ethanol and water (1:1) (Dalton et al., 2018; Thors et al., 2016) or HBSS solution (Bignon et al., 2017), does not impact the penetration of compounds through the skin. The use of different membranes origins at the interface of the diffusion device can lead to differences in the evaluation in skin decontaminants (Chilcott et al., 2001). Despite this, pig ear skin can be used as a cheap predictive model for human skin POX diffusion and its decontamination studies, whereas reconstructed skin could not be because of its weak barrier function (Schmook et al., 2001).

The improvement of decontamination efficiency for FE aqueous

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

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

decontamination efficiency or functional prognosis improvement factor. All decontamination methods tested are significantly effective but depending on the decontaminant, different mechanisms are involved: for dry decontamination with FE as a powder, there is contaminant adsorption and fixation site saturation leading to free contaminant available to pass through skin layers. The excess contaminant will accumulate in the SC because of its lipophilic properties, and create a tank reservoir that allows a delayed release and a later contamination which is represented by a low Functional Prognosis, in accordance with the one found by Salerno et al. (2017) for FE powder applied on pig ear skin. To the opposite, wet decontamination with water alone allows only physical displacement and no adsorption with FE is involved. Thus, aqueous suspensions of FE used as innovative wet decontamination potentiates FE powder decontamination ability with the emergence of new adsorption sites as a result of inter lamellar swelling induced by water molecules. As it was already detailed for pesticide sorption by wet soils, contaminant will migrate by a diffusion phenomenon into aggregates' internal pores filled with water (Villaverde et al., 2009).

5. Conclusion

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

Funding

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

CRedit authorship contribution statement

Alix Danoy: Conceptualization; Methodology; Formal analysis; Investigation; Writing – original draft; Writing – review & editing. **Kardelen Durmaz:** Investigation. **Margaux Paoletti:** Investigation. **Laetitia Vachez:** Methodology; Investigation. **Annick Roul:** Conceptualization. **Jérôme Sohier:** Writing – review & editing, **Bernard Verrier:** Conceptualization; Resources; Writing – review & editing; Supervision; Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

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

English language and style corrections.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127714.

References

- Abdel-Wahhab, M.A., Nada, S.A., Amra, H.A., 1999. Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-induced developmental toxicity in rat. *J. Appl. Toxicol.* JAT 19 (3), 199–204. [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).
- Barbero, A.M., Fransch, H.F., 2009. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. *Toxicol. Vitr. Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 23 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.10.008>.
- 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. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 38 (2), 112–136. <https://doi.org/10.1080/10643380701643650>.
- Bertella, F., Pergher, S.B.C., 2017. Scale up pillaring: a study of the parameters that influence the process. *Materials* 10 (7). <https://doi.org/10.3390/ma10070712>.
- Bignon, C., Amigoni, S., Devers, T., Guittard, F., 2017. Barrier cream based on CeO₂ nanoparticles grafted polymer as an active compound against the penetration of organophosphates. *Chem. Biol. Interact.* 267 (p17–24), 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.002>.
- Bjarnason, S., Mikler, J., Hill, I., Tenn, C., Garrett, M., Caddy, N., Sawyer, T.W., 2008. Comparison of selected skin decontaminant products and regimens against VX in domestic swine. *Hum. Exp. Toxicol.* 27 (3), 253–261. <https://doi.org/10.1177/0960327108090269>.
- Boudry, I., Blanck, O., Cruz, C., Blanck, M., Vallet, V., Bazire, A., Capt, A., Josse, D., Lallement, G., 2008. Percutaneous penetration and absorption of parathion using human and pig skin models in vitro and human skin grafted onto nude mouse skin model in vivo. *J. Appl. Toxicol. JAT* 28 (5), 645–657. <https://doi.org/10.1002/jat.1317>.
- Chilcott, R.P., Jenner, J., Hotchkiss, S.A., Rice, P., 2001. In vitro skin absorption and decontamination of sulphur mustard: comparison of human and pig-ear skin. *J. Appl. Toxicol. JAT* 21 (4), 279–283. <https://doi.org/10.1002/jat.755>.
- Ciottono, G.R., 2018. Toxicodrome recognition in chemical-weapons attacks. *N. Engl. J. Med.* 378 (17), 1611–1620. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705224>.
- 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. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 37 (2), 172–179. <https://doi.org/10.1080/15569527.2017.1365883>.
- 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. *Int. J. Pharm.* 583, 119373. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119373>.
- Dwyer, M., Kubena, L., Harvey, R., Mayura, K., Sarr, A., Buckley, S., Bailey, R., Phillips, T., 1997. Effects of inorganic adsorbents and cyclopirozonic acid in broiler chickens. *Poult. Sci.* 76 (8), 1141–1149. <https://doi.org/10.1093/ps/76.8.1141>.
- Gerstel, D., Jacques-Jamin, C., Schepky, A., Cubberley, R., Eilstein, J., Grégoire, S., Hewitt, N., Klaric, M., Rothe, H., Duplan, H., 2016. Comparison of protocols for measuring cosmetic ingredient distribution in human and pig skin. *Toxicol. Vitr. Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 34, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.03.012>.
- Godin, B., Toutou, E., 2007. Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, *ex vivo* and animal models. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (11), 1152–1161. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.07.004>.
- Gupta, G.S., Dhawan, A., Shanker, R., 2016. Montmorillonite clay alters toxicity of silver nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) eleutheroembryo. *Chemosphere* 163, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.032>.
- Haines, D.D., Fox, S.C., 2014. Acute and long-term impact of chemical weapons: lessons from the Iran-Iraq war. *Forensic Sci. Rev.* 26 (2), 97–114.
- 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 Appl. Mater. Interfaces* 3 (7), 2564–2572. <https://doi.org/10.1021/am200406k>.
- 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 Chem. Toxicol.: Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 50 (7), 2496–2502. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.069>.
- Iannuccelli, V., Maretti, E., Sacchetti, F., Romagnoli, M., Bellini, A., Truzzi, E., Miselli, P., Leo, E., 2016. Characterization of natural clays from Italian deposits with focus on elemental composition and exchange estimated by edx analysis: potential pharmaceutical and cosmetic uses. *Clays Clay Miner.* 64 (6), 719–731. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2016.064038>.
- 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. *Anat. Histol., Embryol.* 48 (3), 207–217. <https://doi.org/10.1111/ahc.12425>.
- 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. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.776123>.

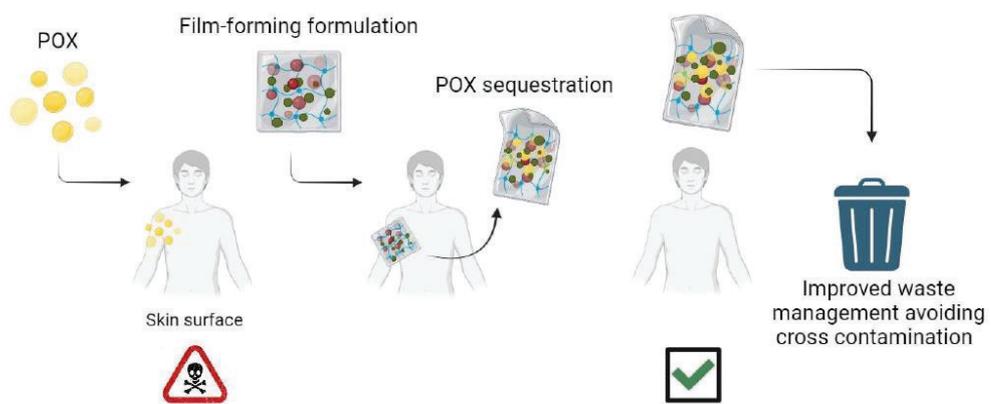
- John, H., Balszweit, F., Kehe, K., Worek, F., Thiermann, H., 2015. Chapter 56—toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants. In: Gupta, R.C. (Ed.), *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, Second ed. Academic Press, pp. 817–856. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800159-2.00056-7>.
- Jung, E.C., Maibach, H.I., 2015. Animal models for percutaneous absorption. *J. Appl. Toxicol.* JAT 35 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1002/jat.3004>.
- Kansara, K., Paruthi, A., Misra, S.K., Karakoti, A.S., Kumar, A., 2019. Montmorillonite clay and humic acid modulate the behavior of copper oxide nanoparticles in aqueous environment and induces developmental defects in zebrafish embryo. *Environ. Pollut.* 255 (Pt 2), 113313 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113313>.
- Kherdekar, G., Adivarekar, R.V., 2017. Effect of different wool scouring techniques on physical properties of wool fiber. *Int. J. Mod. Trends Eng. Res.* 4 (5), 163–167. <https://doi.org/10.23883/ijrter.2017.3527.ndvmi>.
- Kraeling, M.E.K., Topping, V.D., Keltner, Z.M., Belgrave, K.R., Bailey, K.D., Gao, X., Yourick, J.J., 2018. In vitro percutaneous penetration of silver nanoparticles in pig and human skin. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 95, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.04.006>.
- 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. *Environ. Res.* 138, 233–254. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.024>.
- Matar, H., Larner, J., Kansagra, S., Atkinson, K.L., Skamaraukas, 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. *Toxicol. Vit. Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 28 (4), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.01.001>.
- Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J., Kuca, K., 2011. Method of static diffusion cells for assessment of pesticides skin permeation. *Mil. Med. Sci. Lett.* 80, 46–51. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2011.007>.
- 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. *Toxicol. Lett.* 229 (1), 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.008>.
- 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. *Int. J. Pharm.* 534 (1–2), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.031>.
- Naughton, S.X., Terry, A.V., 2018. Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology* 408, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>.
- 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. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>.
- Pitschmann, V., 2014. Overall view of chemical and biochemical weapons. *Toxins* 6 (6), 1761–1784. <https://doi.org/10.3390/toxins6061761>.
- Rehan, I., Khan, M.Z., Rehan, K., Sultana, S., Rehman, M.U., Muhammad, R., Ikram, M., Anwar, H., 2019. Quantitative analysis of Fuller's earth using laser-induced breakdown spectroscopy and inductively coupled plasma/optical emission spectroscopy. *Appl. Opt.* 58 (16), 4227–4233. <https://doi.org/10.1364/AO.58.004227>.
- 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. *J. Appl. Toxicol.* JAT 37 (12), 1527–1536. <https://doi.org/10.1002/jat.3506>.
- 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 CeO₂. *Chem. Biol. Interact.* 267, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.035>.
- 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. <https://doi.org/10.1021/la1002868>.
- 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. *Eur. J. Dermatol.* EJD 25 (Suppl 1), 23–29. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2551>.
- 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. *Carbohydr. Polym.* 102, 970–977. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.029>.
- Schmook, F.P., Meingassner, J.G., Billich, A., 2001. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* 215 (1–2), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00665-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00665-7).
- 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. *Chem. Biol. Interact.* 267, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.023>.
- Shah, K.J., Pan, S.-Y., Shukla, A.D., Shah, D.O., Chiang, P.-C., 2018. Mechanism of organic pollutants sorption from aqueous solution by cationic tunable organoclays. *J. Colloid Interface Sci.* 529, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.094>.
- Taylor, L., Brown, T., Benham, A., Lusty, P., Minchin, D., 2006. World mineral production 2000–04. *Br. Geol. Surv.* (<http://www.bgs.ac.uk/mineralsuk/>).
- Taysse, L., Daulon, S., Delamanche, S., Bellier, B., Breton, P., 2007. Skin decontamination of mustards and organophosphates: comparative efficiency of RSDL and Fuller's earth in domestic swine. *Hum. Exp. Toxicol.* 26 (2), 135–141. <https://doi.org/10.1177/0960327107071866>.
- 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. *Hum. Exp. Toxicol.* 30 (6), 491–498. <https://doi.org/10.1177/0960327110373616>.
- Thors, L., Koch, B., Koch, M., Hägglund, L., Bucht, A., 2016. In vitro human skin penetration model for organophosphorus compounds with different physicochemical properties. *Toxicol. Vit. Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 32, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.01.003>.
- Vallet, V., Cruz, C., Josse, D., Bazire, A., Lallement, G., Boudry, I., 2007. In vitro percutaneous penetration of organophosphorus compounds using full-thickness and split-thickness pig and human skin. *Toxicol. Vit. Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 21 (6), 1182–1190. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.03.007>.
- van Beinum, W., Beulke, S., Brown, C.D., 2005. Pesticide sorption and diffusion in natural clay loam aggregates. *J. Agric. Food Chem.* 53 (23), 9146–9154. <https://doi.org/10.1021/jf050928g>.
- Villaverde, J., van Beinum, W., Beulke, S., Brown, C.D., 2009. The kinetics of sorption by retarded diffusion into soil aggregate pores. *Environ. Sci. Technol.* 43 (21), 8227–8232. <https://doi.org/10.1021/es9015052>.

Annexe 2

An innovative Fuller's earth-based film-forming formulation for skin decontamination against an organophosphorus compound: paraoxon-ethyl

Journal of Hazardous Materials - Soumis

Graphical abstract



An innovative Fuller's earth-based film-forming formulation for skin decontamination against an organophosphorus compound: paraoxon-ethyl

Kardelen Durmaz^{a§}, Magaly Misbach^a, Alix Danoy^a, Jean-Paul Salvi^a, Emily Bloch^b, Sandrine Bourrelly^b, Bernard Verrier^a, Jerome Sohier^a

^a 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 – 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon

^b UMR 7246 : Laboratoire MADIREL, CNRS/ Université Aix-Marseille, 52 avenue Escadrille Normandie – Niemen, 13013 Marseille

[§] Corresponding author: Kardelen.durmaz@ibcp.fr

Abstract

Organophosphorus compounds (OPs), such as VX, pose a significant threat due to their neurotoxic and hazardous properties. Skin decontamination is essential to avoid irreversible effects. Fuller's earth (FE), a phyllosilicate conventionally employed in powder form, has demonstrated decontamination capacity against OPs. The aim of this study was to develop a film-forming formulation comprising polyvinyl alcohol (PVA), FE and surfactants, with a significant decontamination capacity (>95%), coupled with sequestration capabilities and favorable drying time and mechanical properties allowing application and easy removal, particularly in emergency context. Various formulations were prepared using different concentrations of PVA, FE and surfactants. Their decontamination capacity has been tested using paraoxon-ethyl (POX) as VX simulant. Formulations with decontamination capacity levels surpassing 95% were mechanically characterized and cell viability assays were performed on Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF). The four most promising formulations were used to assess decontamination efficacy on pig ear skin explants. These formulations showed decontamination levels ranging from $84.4 \pm 4.7\%$ to $96.5 \pm 1.3\%$, which is at least equivalent to current decontamination methods. These results therefore allow to envision this technology as a novel and advantageous skin decontamination tool following exposure to OPs.

Keywords: Chemical warfare agents, skin application, sequestering power, peelable, decontamination efficiency

Environmental implication

The work entails the development of a new decontamination method against chemical warfare agents, commonly used in terrorist attacks or warfare. Skin decontamination is crucial for saving victims from exposure to these various types of deadly agents. In the form of a film-forming polymer-based formulation, along with phyllosilicate and surfactant, it allows for effective decontamination of organophosphorus compounds (such as VX) and sequesters them within the formulations. This composition thereby limits the dispersion of phyllosilicates to prevent particle volatilization in the environment. Additionally, it serves to sequester

39 chemical warfare agents, thus reducing the risk of further human and environmental
40 contamination.

41 **1. Introduction**

42 Organophosphorus compounds (OPs), including paraoxon-ethyl (POX), are chemical
43 compounds commonly encountered in the environment, owing to their widespread uses as
44 pesticides. Despite being prohibited by the Organization for the Prohibition of Chemical
45 Weapons since 1993, nerve agents, a subgroup of OPs, continue to pose a significant threat
46 as chemical warfare agent (CWAs)(Lessenger, 2006). Tabun, sarin, soman, and VX are
47 examples of nerve agents that have been used in terrorist attacks and world wars (Naughton
48 & Terry, 2018). Their neurotoxic effects are due to their irreversible inhibition of
49 acetylcholinesterase (AChE), which can result in cholinergic crisis and death(Amend et al.,
50 2020). Among the various pathways for exposure to these compounds, the skin stands out as
51 a primary route of entry due to its semi-permeable nature, making it particularly
52 advantageous for the absorption of toxic agents(Mircioiu et al., 2013). The absorption of CWAs
53 through the skin can be influenced by several factors, such as the structure and cellular
54 composition of the skin, but also by the physico-chemical properties of the CWAs. The
55 systemic effect resulting from CWA absorption can complicate victim treatment and exert an
56 influence on decontamination strategies (Hattersley et al., 2008).

57 Various skin decontamination methods have been developed to mitigate cutaneous
58 absorption of OPs contamination (Moody & Maibach, 2006). Among these methods is the
59 application of reactive skin decontamination lotion (RSDL), an oxime-soaked sponge that
60 removes and neutralizes CWAs (D. Schwartz et al., 2012). Additionally, dry decontamination
61 techniques involve the use of phyllosilicates, particularly Fuller's earth (FE), which possess
62 adsorption properties and is commonly used by the military either in free powder form or
63 integrated into powder gloves. While these existing skin decontamination methods
64 demonstrate efficacy for intact skin, certain limitations hinder their broad application. Water
65 decontamination, for instance, generates a wash-in effect(Moody & Maibach, 2006), and RSDL
66 proves impractical for whole-body use due to its high cost and unsuitability for damaged skin
67 (Connolly et al., 2020; Walters et al., 2007). Moreover, the use of FE can lead to re-
68 contamination through the formation of dust (Mannis & Brandl, 2015). A recent study by Danoy
69 et al. revealed the high decontamination potential of FE suspensions compared to FE in
70 powder form against CWAs (Danoy et al., 2022). Conversely, recent publications have
71 demonstrated the potential of biomaterial polymer for sequestering or releasing bioactive
72 molecules for disease treatment(de Souza et al., 2019; Lee, 2018). Notably, film-forming
73 polymers, such as polyvinyl alcohol (PVA), have garnered attention for their application on the
74 skin (Jiang et al., 2011; Vashisth et al., 2016). The drying of these polymers in solution enables
75 the production of films, that have been utilized in wound healing applications (Li et al., 2019).

76 This study aimed to develop a biocompatible biomaterial for effective POX (simulant of VX)
77 decontamination when applied to the skin. Considering the limitations associated with the use
78 of FE in powder form, we developed a film-forming formulation using PVA supplemented with
79 FE to harness its adsorption properties while preventing any dust formation. The objective was
80 to formulate a film that can be applied onto a contaminated skin and perform efficient

81 decontamination while sequestering POX. In addition, this film-forming formulation must be
82 easy to handle, applicable, quick-drying and removable from the skin surface for safe disposal.
83 The most promising formulations were selected based on film-forming properties, drying time
84 at 32°C and *in vitro* decontamination capacity against POX on glass surfaces. The selected
85 formulations were further characterized structurally and mechanically to assess their
86 suitability for skin application. The biocompatibility of formulations was validated on primary
87 human fibroblasts, enabling their utilization on *ex vivo* pig ear skin explants. The diffusion tests
88 for POX through the skin were analyzed using a VitroPharma, miniaturized Franz cell
89 method (Salmon et al., 2015), allowing for the determination of POX penetration kinetics in
90 the presence or absence of the film-forming formulation in comparison of the
91 decontamination methods of reference.

92 **2. Materials and Methods**

93 2.1 Materials and chemical reagents

94 FE was kindly gifted from NBC-Sys (France). PVA (M_w 31,000-50,000 with 87-89 % hydrolyzed),
95 paraoxon-ethyl (POX), bentonite, presto blue solution, 10X PBS, thermolysin, collagenase and
96 Dimethyl sulfoxide were acquired from Sigma-Aldrich (France). Both decyl glucoside (DG) and
97 lauryl glucoside (LG) were bought from Greenweez (France). Terre de Sommières was from la
98 droguerie écologique (France). Pharmaceutical grade 96% ethanol, HPLC grade methanol and
99 glacial acetic acid were obtained from Carlo Erba (Italy). Peel-off mask was bought from Uriage
100 (France), pure water from Otec®-Aguettant (France), polycarbonate membrane filter (0,2 µm)
101 from Merck Millipore (USA), paraformaldehyde 16 % from electron microscopy sciences
102 (USA). Normal Human Dermal Fibroblast extracted from foreskin were obtained from the
103 'Hospices civil de Lyon' (France). Frozen pig ear skin samples were acquired from a
104 slaughterhouse (Proviskin, France) and the RSDL sponges were obtained from the 'Institut de
105 recherche biomédicale des armées' (IRBA) (Britigny-sur-orge).

106 2.2 Preparation of Fuller's earth-based formulations

107 Formulations were obtained by dissolving PVA (12 or 20 wt%) in a 10 % ethanol solution at
108 80°C, with stirring for 1 hour. Subsequently, the surfactant (DG or LG at 3 wt%) was then added
109 for an additional hour, followed by the supplementation of FE (9,1-15 wt%) and heating for 30
110 minutes. Finally, the formulations were homogenized for 2 hours at room temperature.
111 Detailed information about all tested formulations is provided table 1. To facilitate reading, a
112 specific nomenclature was used, where P corresponds to PVA, F to FE, D to DG and L to LG.

113 2.3 Procedure for formulation selection

114 2.3.1 Film forming performance

115 To assess film-forming capacity, 50 µl of each formulation was uniformly spread onto glass
116 slides using a manual film applicator (Brant Industry, France) set at a thickness of 150 µm.
117 After drying, the formed films were removed with forceps and their ability to remain intact
118 without breaks was noted (n=3 for each formulation).

119 2.3.2 Drying time

120 The drying time of the formulations at 32°C was measured on a hot plate (Ascon technologic,
121 Italy) by applying 50 µl of each formulation at a thickness of 150 µm using a manual film
122 applicator. The drying time was recorded using a chronometer, and the films were considered
123 dry when they could be easily removed at once using forceps (n=3 for each formulation).

124 2.3.3 Decontamination capacity on glass slides

125 In agreement with NF X52-122 standard and NATO standard AEP-65, decontamination assays
126 were performed on glass slides. A volume of 1 µL of POX was deposited onto the glass surface
127 and allowed to remain static for 2 minutes. Subsequently, 72 µL of each formulation and peel-
128 off mask was applied to the glass slides, covering the POX-contaminated area. After drying,
129 the film was carefully removed with tweezers, and any remaining POX on the glass surface
130 was recovered by wiping with an ethanol-soaked compress. The POX from both the film (film
131 fraction) and within the ethanol-soaked compress (surface fraction) was then extracted in 96%
132 ethanol for 24 hours, followed by 2 hours of ultrasound treatment (n=3 for each formulation).

133 2.4 Characterization of dried films

134 2.4.1 SEM/EDX analysis

135 Structural and elemental analysis of dried films, both with and without FE and with or without
136 exposure to POX, was conducted using scanning electron microscopy combined with energy
137 dispersive spectroscopy (SEM/EDX, Quanta 250, FEI, Japan). 200 µm-thick dried films were
138 initially frozen in liquid nitrogen before being fractured between two stainless steel plates.
139 Subsequently, the fractured samples, along with FE powder, were carbon sputtered to
140 prepare them for observation and analysis. The voltage was set to 5 kV for imaging and 20 kV
141 for EDX elemental analysis and mapping, with a resolution of 256 × 196 pixels. The dense FE
142 particles were revealed in the dry formulations through backscattered electron scanning
143 Electron microscopy set at 10 kV (BSE-SEM).

144 To determine the localization of POX, the exposed films were analyzed using EDX. For this
145 purpose, 3.6 µl of POX was deposited on the surface of a glass slide and then covered with the
146 various formulations to be analyzed. Once the formulations were dry, the POX-contaminated
147 surface and fractured sections were analyzed.

148 2.4.2 Determination of specific surface area and microporosity of phyllosilicate powders

149 N₂ adsorption–desorption isotherms of FE powders, bentonite and Terre de Sommières (TS)
150 were acquired at 77 K using a Micrometrics Triflex instrument (Micrometrics, USA). The
151 specific surface area was determined with the Brunauer, Emmet and Teller (BET) method
152 (Rouquerol et al., 1999). Before adsorption, samples underwent outgassing at 373 K overnight
153 under a secondary vacuum pressure (n=3 for each formulation).

154 2.4.3 Mechanicals assay

155 2.4.3.1 Uniaxial tensile strength test

156 Tensile strength tests were conducted to determine the mechanical properties of the dried
157 films using a traction bench (Adamel Lhomargy, France), equipped with a 100 Newton load
158 cell. The films used were rectangular in shape, with dimensions, including thickness, width,

159 and length, ranging between 0.03 mm to 0.04 mm, 13 mm to 14 mm, and 21 mm to 24 mm,
160 respectively. During the tests, variations in length and force were continuously monitored at
161 a constant speed of 3 mm/min. The Young's Modulus (YM) was calculated based on the slope
162 of the curve obtained from the tensile tests (n=5 for P12D3 and n=6 for other formulation).

163 2.4.3.2 180° peeling test of dried films on pig ear skin explant

164 The peeling tests were performed in compliance with ASTM D3330, 2018. Pig ear skin explants
165 of 25 mm width and 150 mm length were pre-fixed to glass slides with glue and then attached
166 to the lower edge of the traction bench. 500 µl of each formulation was applied with a spatula
167 on the skin explants to a final thickness, width and length of 150 µm, 23 mm and 130 mm after
168 drying. 15 mm of film was peeled with tweezers from the lower edge of the skin surface to
169 secure it to a 10 Newton load cell. The upward force and displacement variations throughout
170 the test were monitored at a speed test of 180 mm/min. The maximal value collected was
171 considered to determine the maximal adhesion strength (n=4 for each formulation).

172 2.4.3.3 Histological analysis of skin integrity

173 The pig ear skin explants used for the peeling tests were fixed in 4 % of paraformaldehyde for
174 24 hours before being embedded in paraffin. 5 µm-thick sections were prepared using a
175 microtome (Model 1212, Leica, Germany) and stained with hematoxylin and eosin to assess
176 the integrity of the skin barrier by observation under a microscope (Inverted Microscope
177 Eclipse Ti-E, Nikon, Japan) (n=1 for P12F15D3 and without peeling).

178 2.5 *In vitro* toxicity of formulations

179 2.5.1 Extraction and culture of normal human dermal fibroblasts (NHDF)

180 NHDFs were obtained by extraction from foreskin. The epidermis was separated from the
181 dermis by incubating the tissue overnight at 4°C with thermolysin, then the dermal fibroblasts
182 were extracted by incubating the extracted dermis for 2 hours at 37°C with collagenase. Cells
183 were cultured in flasks for two weeks to ensure fibroblast proliferation, with regular changes
184 of culture medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) to eliminate biopsy waste as far as
185 possible.

186 2.5.2 Procedure of presto blue test

187 Cell viability tests were conducted using NHDF, from passages 5 to 9, cultured in Dulbecco's
188 Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum, 1 %
189 Penicillin-Streptomycin (5000 U/ mL). A total of 20,000 cells were seeded per well in 96-well
190 plates and incubated for 48 hours à 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere. In parallel, 20 µl of the
191 various formulations was incubated in 1.5 ml of DMEM for 24 hours prior to conducting the
192 cell viability tests. 24 hours later, the supernatants were filtered using 0.45 µm single-use
193 polycarbonate membrane filter and 100 µl of each were brought into contact with the cells
194 (in agreement with ISO-standard 10993-5 guidelines). DMSO was used as a cell mortality
195 control. After 30 minutes of incubation, cell viability was quantitatively assessed using Presto
196 Blue, following the supplier's protocol (n=3 for each condition).

197 2.6 *Ex vivo* decontamination assays

198 2.6.1 Preparation of pig ear skin explants

199 The obtained pig ear skin was carefully shaved and dermatomed to a depth of 500 μm , and
200 circular disks measuring 2 cm^2 were punched out. The integrity of these explants was visually
201 assessed before storing them at -20°C until use. For the diffusion experiments, a VitroPharma®
202 device was employed as a static cell diffusion system (Fig. S.1). The skin explants were
203 positioned between the donor and receptor compartments, with the epidermis surface facing
204 the donor compartment. 1X PBS was used as the receptor fluid, which was continuously
205 shaken and maintained at $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ in accordance with OECD 428 guidelines (Danoy et al.,
206 2022).

207 2.6.2 Decontamination procedure

208 According to the NF X52-122 standard, 5 mg/cm^2 of POX was applied to the skin. After a 5-
209 minute exposure (emergency decontamination), decontamination was carried out using 2
210 methods. Wet decontamination involved the application of 102 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ of each formulation
211 (P12F15D3, P12F15L3, P20F9D3 and P20F9L3), peel-off mask or water. Dry decontamination
212 was performed by depositing 0.16 g/cm^2 of FE free powder. For both methods, the
213 decontaminant was removed from the skin surface either 2 minutes after application (for
214 water-based and FE powder decontamination conditions) or 30 minutes post-application (for
215 formulations, RSDL and peel-off mask). Finally, the skin surface was dried by patting with a
216 pad ($n=5$ for water decontamination and $n=6$ for other method of decontamination).

217 2.6.3 Samples processing

218 To determine the kinetics of POX penetration through the skin, 500 μL of receptor fluid was
219 systematically collected at regular intervals (1, 2, 4, 6, 8, 10 and 24 hours) and replaced with
220 an equal volume of fresh medium (1X PBS). After 24 hours, the skin was removed from the
221 diffusion cells, and its surface was wiped with a compress. The skin layers were subsequently
222 separated into three components. The stratum corneum (SC) was separated using the tape
223 stripping method (Förster et al., 2011), while the epidermis and dermis were obtained by
224 immersion in 1X PBS heated to 60°C for 1 minute. For each of these layers, POX was extracted
225 over a 24-hours period using HPLC - grade ethanol.

226 2.6.4 Quantification of POX by HPLC-UV

227 Quantification of POX was determined using high performance liquid chromatography with a
228 UV detector (HPLC-UV) on an Agilent Technologies HPLC 1260 Infinity II LC systems (1200
229 Series, Agilent Technologies). Samples (10 μL) were injected onto a C18 Cliepus column (5 μm ,
230 100 x 40 mm) heated at 40°C , with a flow rate of 0,7 mL/min . The mobile phase consisted of
231 55 % methanol (0,5 % glacial acetic acid) and 45 % milliQ water (0.5 % glacial acetic acid). POX
232 was detected at 269 nm with a retention time of 5.9 minutes (Salerno et al., 2017). The
233 linearity of the method was assessed for POX concentration in the range 1–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($R^2 =$
234 0.999) with a limit of detection (LOD) of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a limit of quantification (LOQ) of 1
235 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This quantification method was used to quantify POX *in vitro* and *ex vivo*
236 decontamination assays.

237

238 2.7 *Ex vivo* evaluation of decontamination efficiency

239 The effectiveness of the different skin decontamination methods was assessed by quantifying
240 their respective *ex vivo* decontamination efficiency (DE). DE was calculated using the following
241 equation (Josse et al., 2015):

$$242 \quad DE(\%) = \frac{(Q3+Q4)_{control} - (Q3+Q4)_{decontaminated}}{(Q3+Q4)_{control}} \times 100$$

243

244 Where Q3 represents the amount of POX present in the skin layers (SC + epidermis + dermis)
245 at the end of the experiment, and Q4 represents the amount of POX in the receptor (indicating
246 penetration through skin) at the end of the experiment.

247 2.8 Data analysis

248 Statistical analysis of the data was performed using GraphPad Prism Version 8.1 (San Diego,
249 CA, USA). All data are presented as mean \pm SEM. The specific statistical tests used for analysis
250 are indicated in the legends of each figure. The results were statically analyzed by non-
251 parametric tests by Kruskal-Wallis followed by post-hoc tests, such as Dunn's, were
252 performed.

253 3 Results

254 3.1 Formulation and selection of film-forming formulations

255

256 In first instance, several criteria were evaluated in a preliminary study to narrow down the
257 number of formulations to be further evaluated in this study. A screening of various
258 concentrations of PVA, enabling film formation, FE, to achieve satisfactory decontamination
259 capacities, as well as surfactants such as decyl glucoside (DG) or lauryl glucoside (LG), was
260 therefore conducted. Regarding the PVA concentration, formulations showed a very low
261 viscosity and poor film-forming properties below 12 wt% in PVA, while they become difficult
262 to handle (very high viscosity) above 20 wt%. Within this range, PVA formulations were easily
263 handled, regardless of PVA concentration, and could be applied and removed from smooth
264 surfaces such as glass due to their film-forming properties (Table 1. A). The amount of FE in
265 the mixture was determined according to Danoy et al., 2022, and ranged from 9.1 to 15 wt%.
266 The incorporation of FE within these formulations, did not provide satisfactory film-forming
267 properties compared to PVA-only formulations. They were brittle after drying and therefore
268 difficult to remove entirely from a smooth surface (Table 1. B). In order to achieve more
269 homogeneous and film-forming formulations, surfactants such as Lauryl glucoside (LG) and
270 decyl glucoside (DG) were chosen and added to both pure PVA formulations and those
271 supplemented with FE. The surfactants were used at very low concentrations, specifically 3
272 wt% (the concentration at which they are used in cosmetics), in order to minimize any
273 potential skin issues during their application. Indeed, the surfactants incorporation allowed to
274 obtain films that could be easily handled and applied for the majority of the tested
275 formulations (Table 1. C, D and E). The most concentrated PVA and FE formulations, however,
276 remained difficult to apply due to their low manipulability, and brittle after drying (Table 1. F).

318 3.2.2 Tensile strength and peeling tests

319 The mechanical properties of the films were assessed to ensure their ease of handling after
320 drying. The Young's modulus, which reflects overall stiffness, was determined from the tensile
321 curves of each formulation. The increase in PVA concentration showed a statistically
322 significant increase in rigidity with a modulus of 5.28 ± 0.61 MPa for P12D3 and 10.7 ± 0.72
323 MPa for P20D3, even though this increase was not observed for the same formulations
324 composed of LG (Fig. 2.A). The incorporation of FE into the formulations led to a significant
325 increase in rigidity for the P20L3 formulation supplemented with 9 wt% of FE (Fig. 2.A).
326 However, significant differences were observed between the FE-containing formulations and
327 the commercial peel-off mask, with a modulus of 0.18 ± 0.02 MPa. The elongation capacities
328 at the breaking point of each formulation were evaluated and showed that formulations
329 composed of FE (P12F15D3 and P20F9D3) significantly presented lower elongation capacities
330 compared to the peel-off mask (93.91 ± 9.07 %), but their high rigidity allowed for the films
331 not to break easily (Fig. 2.B).

332 To assess the adhesion capacity of the formulations after application to the skin, peeling tests
333 were conducted on pig ear skin explants (Fig. 2.C). The tests revealed that the formulations,
334 both with and without FE, exhibited similar maximal bonding strengths to the skin, with values
335 reaching up to 1.4 ± 0.3 N for the P20F9D3 formulation (Fig. 2.C). Regardless of the PVA and
336 FE concentrations, the formulations could be easily removed in one go. Additionally, peeling
337 tests conducted on the peel-off mask demonstrated no statistical difference compared to the
338 formulations containing FE, confirming that the application and removal of formulations are
339 compatible with skin application. Importantly, the removal of formulations from the skin
340 surface did not appear to alter the integrity of the skin barrier, including the stratum corneum
341 (SC) and epidermis (Fig. 3).

342 3.3 Sequestering power of formulations

343 Phosphorus (P), which is absent from PVA, FE, and the different surfactants (Fig. 1), was
344 employed to trace the presence and distribution of POX on surface and within cross-sections
345 of contaminated films, in order to determine their sequestering power. In the formulation
346 composed of PVA and surfactant, POX was present in the form of droplets, in very large
347 quantities (Fig. 4.A). Conversely, formulations containing FE presented much fewer POX
348 droplets, with POX being more precisely localized at the border of the film (Fig. 4.A).
349 The various elements composing FE (Mg, Al, and Si), along with phosphorus, were detected in
350 cross-sectional analyses (Fig. 4.B). Interestingly, phosphorus was present in the formulations
351 containing FE (P12F15D3), but also in FE-free formulations (P20D3), albeit at lower levels (Fig.
352 4.B). Observations on the location of POX showed that it did not entirely coincide with the
353 various minerals in FE (Fig. 4.B).

354

355 3.4 *In vitro* toxicity

356

357 Since the film-forming formulations are intended to be applied on skin, NHDFs were used to
358 determine the cytotoxicity of the various film-forming formulations in order to validate their
359 compatibility in humans. Formulations composed solely of PVA, at any concentration,
360 exhibited no toxicity to NHDFs. Similarly, incorporation of FE at 9 or 15 wt% and surfactants
361 at 3 wt% (LG or DG) into the formulations revealed no toxic effect on cells.

362 3.5 Evaluation of *ex vivo* decontamination capacity of film-forming formulations

363 3.5.1 Kinetic of penetration of POX through the skin with and without decontamination 364 methods

365 POX penetration was assessed using a miniaturized diffusion cell system (Fig. S.1) based on
366 pig ear skin explants. The pig model was selected since it is acknowledged to be a good
367 predictive model of skin decontamination in humans due to physiopathology similarities with
368 humans (Amlôt et al., 2010; Danoy et al., 2022). The decontamination procedure on skin
369 explants was conducted 5 minutes after POX contamination. In the absence of
370 decontamination, POX penetration through the skin was found to be significantly greater than
371 under decontamination conditions, with up to 41,5 % of POX detected in the receptor medium
372 after 24 hours (Fig. 6 left). When the skin was subjected to decontamination, swift POX
373 penetration was observed up to 8-10 h for all methods. After 10h, a plateau was reached and
374 remained constant until 24 hours when penetration became negligible. This corresponded to
375 the point at which no POX remained available on the skin surface (Fig. 6). The presence of a
376 decontamination method led to a reduction in POX diffusion of up to 11-fold, highlighting the
377 strict necessity of decontamination to limit POX penetration through the skin. All the
378 developed formulations demonstrated a statistically significant reduction in POX penetration
379 through the skin compared to the control without decontamination, with 6.2 % for P12F15D3,
380 3.6 % for P12F15L3, 3.8 % for P20F9D3 and for 4.2 % P20F9L3 of POX detected in the receptor
381 medium after 24 hours. However, no difference was demonstrated between decontamination
382 with film-forming formulations and reference methods, especially with the current gold
383 standard, RSDL (Fig. 6, right).

384 3.5.2 Quantification of POX in different decontamination methods and skin

385 The quantification of POX within the different decontamination methods and skin layers (skin
386 surface, stratum corneum, epidermis, and dermis) revealed that the majority of POX was
387 located within the various decontamination methods. In the absence of decontamination, 35
388 % of the POX was localized in the skin fractions, which constituted a significant reservoir of
389 POX, leading to its complete penetration through the skin (Fig.7.A). The utilization of any
390 decontamination method significantly reduced the amount of POX within the skin. Notably,
391 there was no significant difference in the proportion of POX recovered in the RSDL and in two
392 film-forming formulations: P12F25L3 and P20F9D3 (with 85.5 ± 4.7 and 85.2 ± 4.5 of POX
393 respectively, compared to 93.6 ± 5.2 for RSDL) (Fig. 7. B). Decontamination with water and
394 FE powder were the two methods that recovered the least amount of POX.

395 3.5.3 Evaluation of *in vitro* decontamination efficiency (DE)

396

397 The *in vitro* decontamination efficiency (DE) of each decontamination method was calculated
398 to determine the most promising formulation against POX. The P12F15D3 formulation was
399 the only one to achieve a statistically lower DE compared to the RSDL with 84.4 ± 4.7 %. No
400 significant difference was observed for all the other decontamination methods, suggesting
401 that the three other developed formulations (P12F15L3, P20F9D3, and P20F9L3) and the
402 reference methods (water, FE in powdered form, and RSDL) were equally effective. However,
403 P20F9D3, with a DE of $96,5 \pm 1,3$ %, demonstrated the highest effectiveness.
404

405 **4. Discussion**

406

407 The use of film-forming polymers, such as PVA, has seen significant global growth in recent
408 years, particularly in the field of cutaneous applications (Li et al., 2019). These advancements
409 have led to the development of a new tool for cutaneous decontamination in response to OPs.
410 The newly described formulations, composed of PVA as a film-forming agent, allows for the
411 incorporation of FE along with a surfactant to confer decontaminating properties. As
412 illustrated in Table 1, formulations consisting solely of PVA already exhibit considerable
413 decontamination capabilities. Interestingly, the addition of a surfactant (LG or DG) does not
414 lead to a significant improvement in these decontamination abilities (Table 1.A and B). These
415 findings are surprising, considering that pure PVA solutions are inherently hydrophilic, while
416 OPs are primarily lipophilic. The initial aim of surfactant addition was to enhance interactions
417 between the two compounds through their amphiphilic structure, reducing surface tension
418 upon contact with POX and the formulations (Fang et al., 2022; Nakama, 2017). Nevertheless,
419 the DG or LG surfactants still had a positive effect on the formulations, by allowing for the
420 creation of easily manageable hydrogels, applicable with satisfactory film-forming properties
421 (Table 1.B, D and E). It can be suggested that their incorporation promotes the stabilization of
422 the compounds within the formulations as well as a better homogeneity of FE particles, which
423 was observed during contamination and decontamination assays.

424 Despite the drawbacks associated with the use of FE in powder form, their decontamination
425 capacity is well established (Collins et al., 2021) FE is well known for its adsorptive properties
426 and is employed by military personnel in the field as a dry decontamination tool (Willems,
427 1990). In addition to its effectiveness against OPs, FE has demonstrated a wide range of
428 capabilities in the decontamination of various chemical agents, including vesicant-type
429 chemicals (Taysse et al., 2007). The objective of this study is to assess its adsorptive capacity
430 when integrated into a different environment. Its incorporation into PVA, together with
431 surfactants, initially allowed for the creation of easily manageable formulations, both in terms
432 of viscosity and well-preserved film-forming properties (Table 1.D and E). Moreover, the
433 results show that its application leads to enhanced POX decontamination. Increasing the FE
434 concentration from 9 to 15 wt% indeed improved its decontamination properties within less
435 concentrated PVA formulations (Table 1.D). These decontamination capabilities are likely
436 bolstered by an increased quantity of FE particles, resulting in a larger specific surface area
437 capable of adsorbing greater quantities of POX. However, the increase in FE concentration
438 could not be achieved in PVA-concentrated formulations (20 wt%). Interestingly, our results
439 also demonstrate that the inclusion of FE in an aqueous formulation does not affect its

440 adsorption potential of POX. This opens further possibilities with other phyllosilicates than FE,
441 to explore further potential targets. In view of selecting potential candidates, the specific
442 surface area of a number of phyllosilicates were measured (FE, Terre de Sommières and
443 bentonite) (Table S.1). Since specific surface area reflects adsorption capacities (Macht et al.,
444 2011), Terre de Sommières that displays a value close to that of FE ($209.5036 \pm 0,74 \text{ m}^2/\text{g}$ and
445 $186.0535 \pm 0.6044 \text{ m}^2/\text{g}$ for FE and Terre de Sommieres respectively), could be an interesting
446 candidate to incorporate in film-forming formulations.

447 The advantage of sequestering POX within the films formed after application is twofold: to
448 trap the contaminant, preventing new contamination (thereby managing contaminated waste
449 and protecting personnel in contact), and to limit as such as possible forms of pneumonia due
450 to high exposure (location of macrophages loaded with FE in lung tissues) and generation of
451 recontaminating dust (Mannis & Brandl, 2015 ; Gibbs & Pooley, 1994). Our results show that when
452 integrated into film-forming formulations composed of PVA and surfactants, FE allows for the
453 sequestration of larger quantities of POX in comparison to formulations composed of PVA and
454 surfactants only (Fig. 4.B). The adsorption of POX by FE particles limits the presence of POX on
455 the film surface. In the absence of FE, POX is more likely to be localized as droplets on the
456 surface, probably due to the immiscibility of the two phases (Fig. 4.A).

457 Beyond FE content in the formulations, our observations also indicate that the covering of
458 POX by the FE-containing formulations during the decontamination process leads to the
459 underneath spreading of the deposited POX. This spreading, coupled with a strong adhesion
460 attributed to the film-forming properties of PVA and the viscosity of the formulations, further
461 suggests that decontamination capabilities are not solely due to FE's adsorptive power.

462 One of the crucial criteria considered in the development of film-forming decontamination
463 solutions is their drying time. In our case, the times obtained at 32°C (under 7 minutes)
464 demonstrate their suitability for field-use by the military. However, it is important to
465 acknowledge a limitation: the drying times were assessed for a fixed thickness of $150 \mu\text{m}$,
466 which may not be representative of actual field application conditions and therefore could
467 result in different drying times.

468 The design of new decontamination tools for cutaneous application has to consider as well
469 parameters ensuring easy and effective use, notably an efficient and homogeneous peeling
470 process. While it is acknowledged that formulations composed of a single film-forming
471 polymer may have limited mechanical strength (Teodorescu et al., 2019; Yang et al., 2018),
472 those crafted from PVA supplemented with FE and a surfactant demonstrate values up to
473 16.45 MPa (Fig. 2.A). These results ensure their suitable use, as they can be peeled off from a
474 cutaneous surface without breaking or crumbling (Fig. 2.B). The advantage of this rigidity is
475 that there is no need to consider the addition of other components, which would entail
476 additional costs and associated toxic effects.

477 Although documentation on the toxicity of FE is limited, existing studies indicate that
478 phyllosilicates, in general, do not manifest toxicity in humans at low doses, regardless of their
479 mode of use (Rautureau et al., 2017). When in contact with the skin and subsequently dried
480 and removed, formulations must meet safety criteria. The formulations exhibited no harmful

481 effects on fibroblasts, and peeling them off do not compromise the integrity of the skin
482 barrier, indicating their compatibility for cutaneous application (Fig. 3 and 5). This is in
483 agreement with *in vivo* and *in vitro* studies conducted by Danoy et al., which demonstrates
484 the lack of toxicity of FE suspension supernatants on fibroblasts and zebrafish (Danoy et al.,
485 2022). The *in vitro* non-toxicity suggests that these formulations are likely to be biocompatible
486 *in vivo* (such as SKH1 mice), although their validation is required.

487 Regarding penetration assays, conducting studies on humans is not feasible due to ethical and
488 practical constraints, despite being the gold standard for determining the skin penetration of
489 chemical compounds, particularly for CWA (Blickenstaff et al., 2014). In lieu of human studies,
490 *in vitro* cell-based assays and *ex vivo* dermal studies serve as experimental models that can
491 closely mimic the *in vivo* situation. Using excised human or animal explants and a static
492 diffusion cell, the rate and extent of cutaneous absorption of a given product can be
493 determined. Moreover, pig ear skin has been extensively studied and validated as the most
494 suitable model for simulating human skin penetration (Supe & Takudage, 2021). In our study,
495 the decontamination efficiency of the newly developed formulations was compared to various
496 existing methods such as RSDL, water, and FE in powder form. Among the decontamination
497 methods tested, P12F15D3 was found to be the least effective, with a decontamination
498 efficiency (DE) of 84.4 ± 4.7 %. In contrast, the results indicate that P20F9D3 proved to be the
499 most effective against POX, with a DE of 96.5 ± 1.3 %, albeit without statistically significant
500 difference. These results highlight the decontamination potential of the newly developed
501 formulations against POX, compared to the current gold standard, RSDL, which demonstrated
502 notable efficacy of 95.2 ± 1.9 %. It's worth noting that water decontamination led to a high DE
503 of 91.4 ± 2.8 %, suggesting an absence of a 'wash-in' effect that enhances POX penetration
504 into the skin. In our study the decontamination was performed gently and without the
505 application of significant pressure, which are responsible for this effect (James et al., 2022). In
506 the field of decontamination against CWA, Maibach et al. developed and patented a dermal
507 decontamination gel (DDGel, patent (Maibach, 2017)) composed of polymers (Kollidon SR, lutrol
508 and carboxymethyl cellulose) and phyllosilicates (FE and bentonite) (Cao, Hui, Elmahdy, et al.,
509 2018; Cao, Hui, Zhu, et al., 2018; Thors et al., 2017). The composition of DDGel enables it to
510 form a film after drying, making it effective in decontaminating various CWA simulants such
511 as chloroethyl ethyl sulfide (CEES, simulating mustard gas) and diisopropyl
512 methylphosphonate (DIMP, simulating sarin). Published results suggest a higher DE for DDGel
513 compared with RSDL. However, due to the lack of information on its mechanical properties,
514 ease of use (biocompatibility, film-forming properties), and detailed composition, its current
515 utilization is limited.

516 Apart from the decontamination potential of the film-forming formulations presented here
517 for intact skin, another potential of utmost interest lies in their ability to decontaminate
518 wounded skin. Damaged skin induces greater penetration due to the alteration of the
519 cutaneous barrier (Gattu & Maibach, 2010). In such cases, decontamination of victims must be
520 carried out quickly and effectively and currently, there is no suitable decontamination
521 method available. For instance, RSDL negatively affects the wound healing process (Graham &
522 Schoneboom, 2013) and FE in powder form can potentially lead to necrosis of surrounding
523 tissues and potential absorption into the bloodstream. Recent research has explored a novel

524 nanoemulsion formulation containing Calixarene for cutaneous decontamination against
525 uranium exposure (Belhomme-Henry et al., 2014). This formulation has been tested on
526 various models of damaged skin, as reported by Grives et al. (Grives et al., 2015). The *ex vivo*
527 results of these studies demonstrate that these nanoemulsions have potential as a viable
528 alternative for treating contaminated damaged skin. The film-forming formulations
529 introduced here, due to their ease of removal at cutaneous level, sequestration ability against
530 POX, non-volatilization of FE (avoiding toxicity and new contamination), as well as their lack
531 of cell toxicity, bode well for their use on non-hemorrhagic damaged skin. The PVA and
532 phyllosilicate-based film-forming formulations could prevent the risks of potential FE toxicity
533 within wounds, sequester POX to limit its diffusion, and be easily applied and removed from
534 the wounded skin surface. Therefore, they should be tested on *ex vivo* and *in vivo* models of
535 damaged skin to determine their efficacy.

536 Finally, the film-forming formulations developed in this study have the potential for broader
537 applications beyond skin decontamination. Their numerous advantages, such as ease of
538 production, ease of use, and very low cost, make them a viable option for decontamination of
539 surfaces, including medical devices, as suggested by (Redy Keisar et al., 2021). Furthermore,
540 the study's future perspectives involve investigating the decontaminating power of these
541 formulations against different warfare agents, such as vesicants, to expand the scope of their
542 application.

543 **5. Conclusion**

544 Film-forming formulations based on PVA polymer, an adsorbent phyllosilicate such as FE, and
545 a surfactant (LG or DG) were newly developed with the aim of using them as a
546 decontamination method against OPs, specifically POX. Our results demonstrate that these
547 formulations are easily producible, manipulable, applicable, removable, and non-toxic for
548 cutaneous application. Their decontamination effectiveness, especially that of the P20F9D3
549 formulation with a DE of 96.5 ± 1.3 %, suggests that these findings support their use as a new
550 decontamination tool for POX.

551 **Funding**

552 This research was funded by the Agence de l'innovation et de la defense AID (2020017).

553 **Credit authorship contribution statement**

554 **Kardelen Durmaz:** Conceptualization; Methodology; Formal analysis; Investigation; Writing –
555 original draft; Writing – review & editing. **Magaly Misbach:** Investigation; methodology;
556 Writing. **Alix Danoy:** Conceptualization. **Emily Bloch and Sandrine Bourrelly:** Investigation.
557 **Jean-Paul Salvi:** methodology; Investigation. **Bernard Verrier:** Conceptualization; Resources;
558 Writing – review & editing; Supervision; Funding acquisition. **Jerome Sohier:**
559 Conceptualization; Resources; Writing – review & editing; Supervision.

560 **Declaration of Competing Interest**

561 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
562 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

563 **References**

- 564 Amend, N., Langgartner, J., Siegert, M., Kranawetvogl, T., Koller, M., John, H., Pflügler, C., Mögele-
565 Schmid, C., Worek, F., Thiermann, H., & Wille, T. (2020). A case report of cholinesterase
566 inhibitor poisoning: cholinesterase activities and analytical methods for diagnosis and clinical
567 decision making. *Archives of Toxicology*, *94*(6), 2239–2247. [https://doi.org/10.1007/s00204-](https://doi.org/10.1007/s00204-020-02741-2)
568 [020-02741-2](https://doi.org/10.1007/s00204-020-02741-2)
- 569 Amlôt, R., Larner, J., Matar, H., Jones, D. R., Carter, H., Turner, E. A., Price, S. C., & Chilcott, R. P.
570 (2010). Comparative analysis of showering protocols for mass-casualty decontamination.
571 *Prehospital and Disaster Medicine*, *25*(5), 435–439.
572 <https://doi.org/10.1017/S1049023X00008529>
- 573 Belhomme-Henry, C., Phan, G., Huang, N., Bouvier, C., Rebière, F., Agarande, M., & Fattal, E. (2014).
574 Texturing formulations for uranium skin decontamination. *Pharmaceutical Development and*
575 *Technology*, *19*(6), 692–701. <https://doi.org/10.3109/10837450.2013.823991>
- 576 Blickenstaff, N. R., Coman, G., Blattner, C. M., Andersen, R., & Maibach, H. I. (2014). Biology of
577 percutaneous penetration. *Reviews on Environmental Health*, *29*(3), 145–155.
578 <https://doi.org/10.1515/reveh-2014-0052>
- 579 Cao, Y., Hui, X., Elmahdy, A., & Maibach, H. (2018). In vitro human skin permeation and
580 decontamination of diisopropyl methylphosphonate (DIMP) using Dermal Decontamination Gel
581 (DDGel) and Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) at different timepoints. *Toxicology*
582 *Letters*, *299*, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.013>
- 583 Cao, Y., Hui, X., Zhu, H., Elmahdy, A., & Maibach, H. (2018). In vitro human skin permeation and
584 decontamination of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) using Dermal Decontamination Gel
585 (DDGel) and Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL). *Toxicology Letters*, *291*, 86–91.
586 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.04.015>
- 587 Collins, S., James, T., Carter, H., Symons, C., Southworth, F., Foxall, K., Marczylo, T., & Amlôt, R.
588 (2021). Mass casualty decontamination for chemical incidents: Research outcomes and future
589 priorities. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 18, Issue 6,
590 pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph18063079>
- 591 Connolly, J. M., Stevenson, R. S., Railer, R. F., Clark, O. E., Whitten, K. A., Lee-Stubbs, R. B., &
592 Anderson, D. R. (2020). Impairment of wound healing by reactive skin decontamination lotion
593 (RSDL®) in a Göttingen minipig® model. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, *39*(2), 143–157.
594 <https://doi.org/10.1080/15569527.2020.1751183>
- 595 D. Schwartz, M., G. Hurst, C., A. Kirk, M., J.D. Reedy, S., & H. Braue, E. (2012). Reactive Skin
596 Decontamination Lotion (RSDL) for the Decontamination of Chemical Warfare Agent (CWA)
597 Dermal Exposure. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(10), 1971–1979.
598 <https://doi.org/10.2174/138920112802273191>
- 599 Danoy, A., Durmaz, K., Paoletti, M., Vachez, L., Roul, A., Sohier, J., & Verrier, B. (2022). Aqueous
600 suspensions of Fuller's earth potentiate the adsorption capacities of paraoxon and improve skin
601 decontamination properties. *Journal of Hazardous Materials*, *425*(August 2020).
602 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127714>
- 603 de Souza, A. G., Cesco, C. T., de Lima, G. F., Artifon, S. E. S., Rosa, D. dos S., & Paulino, A. T. (2019).
604 Arabic gum-based composite hydrogels reinforced with eucalyptus and pinus residues for

- 605 controlled phosphorus release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 33–42.
606 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.106>
- 607 Fang, Q., Zhao, X., Li, S., Qiu, Z., Wang, Z., & Geng, Q. (2022). Effect of Surfactants with Different
608 Hydrophilic–Lipophilic Balance on the Cohesive Force between Cyclopentane Hydrate Particles.
609 *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/jmse10091255>
- 610 Förster, M., Bolzinger, M. A., Rovere, M. R., Damour, O., Montagnac, G., & Briançon, S. (2011).
611 Confocal raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard
612 methods. *Skin Pharmacology and Physiology*, 24(2), 103–112.
613 <https://doi.org/10.1159/000322306>
- 614 Gattu, S., & Maibach, H. I. (2010). Enhanced absorption through damaged skin: An overview of the in
615 vitro human model. In *Skin Pharmacology and Physiology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 171–176).
616 <https://doi.org/10.1159/000288163>
- 617 Graham, J. S., & Schoneboom, B. A. (2013). Historical perspective on effects and treatment of sulfur
618 mustard injuries. *Chemico-Biological Interactions*, 206(3), 512–522.
619 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.013>
- 620 Grives, S., Phan, G., Morat, G., Suhard, D., Rebiere, F., & Fattal, E. (2015). Ex vivo uranium
621 decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded
622 nanoemulsion. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(6), 2008–2017.
623 <https://doi.org/10.1002/jps.24431>
- 624 Hattersley, I. J., Jenner, J., Dalton, C., Chilcott, R. P., & Graham, J. S. (2008). The skin reservoir of
625 sulphur mustard. *Toxicology in Vitro*, 22(6), 1539–1546.
626 <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.06.002>
- 627 James, T., Izon-Cooper, L., Collins, S., Cole, H., & Marczylo, T. (2022). The wash-in effect and its
628 significance for mass casualty decontamination. In *Journal of Toxicology and Environmental*
629 *Health - Part B: Critical Reviews* (Vol. 25, Issue 3, pp. 113–134). Taylor and Francis Ltd.
630 <https://doi.org/10.1080/10937404.2022.2042443>
- 631 Jiang, S., Liu, S., & Feng, W. (2011). PVA hydrogel properties for biomedical application. *Journal of the*
632 *Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7), 1228–1233.
633 <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.04.005>
- 634 Josse, D., Wartelle, J., & Cruz, C. (2015). Showering effectiveness for human hair decontamination of
635 the nerve agent VX. *Chemico-Biological Interactions*, 232, 94–100.
636 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.03.010>
- 637 Lee, J. H. (2018). Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue
638 engineering. In *Biomaterials Research* (Vol. 22). BioMed Central Ltd.
639 <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0138-6>
- 640 Li, Y., Zhu, C., Fan, D., Fu, R., Ma, P., Duan, Z., & Li, X. (2019). A Bi-Layer PVA / CMC / PEG Hydrogel
641 with Gradually Changing Pore Sizes for Wound Dressing. 1800424, 1–12.
642 <https://doi.org/10.1002/mabi.201800424>
- 643 Macht, F., Eusterhues, K., Pronk, G. J., & Totsche, K. U. (2011). Specific surface area of clay minerals:
644 Comparison between atomic force microscopy measurements and bulk-gas (N₂) and -liquid

- 645 (EGME) adsorption methods. *Applied Clay Science*, 53(1), 20–26.
646 <https://doi.org/10.1016/j.clay.2011.04.006>
- 647 Mannis, D., & Brandl, A. (2015). Efficacy of common decontamination methods for cleaning
648 contaminated wounds. *Health Physics*, 108(Cvn 77), S5–S12.
649 <https://doi.org/10.1097/HP.000000000000190>
- 650 Mircioiu, C., Voicu, V. A., Ionescu, M., Miron, D. S., Radulescu, F. S., & Nicolescu, A. C. (2013).
651 Evaluation of in vitro absorption, decontamination and desorption of organophosphorous
652 compounds from skin and synthetic membranes. *Toxicology Letters*, 219(2), 99–106.
653 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.03.005>
- 654 Moody, R. P., & Maibach, H. I. (2006). Skin decontamination: Importance of the wash-in effect. In
655 *Food and Chemical Toxicology* (Vol. 44, Issue 11, pp. 1783–1788).
656 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.05.020>
- 657 Nakama, Y. (2017). Surfactants. In *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and*
658 *Applications* (pp. 231–244). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X>
- 659 Naughton, S. X., & Terry, A. V. (2018). Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate
660 exposure. *Toxicology*, 408, 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.08.011>
- 661 Rautureau, M., Gomes, C. de S. F., Liewig, N., & Katouzian-Safadi, M. (2017). Clays and health:
662 Properties and therapeutic uses. In *Clays and Health: Properties and Therapeutic Uses*. Springer
663 International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-42884-0>
- 664 Redy Keisar, O., Nahum, V., Yehezkel, L., Marcovitch, I., Columbus, I., Fridkin, G., & Chen, R. (2021).
665 Active and Strippable PVA/Borax/NaBO₃Hydrogel for Effective Containment and
666 Decontamination of Chemical Warfare Agents. *ACS Omega*, 6(8), 5359–5367.
667 <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05493>
- 668 Salmon, D., Gilbert, E., Gioia, B., Haftek, M., Pivot, C., Verrier, B., & Piro, F. (2015). New easy
669 handling and sampling device for bioavailability screening of topical formulations. *European*
670 *Journal of Dermatology*, 25, 23–29. <https://doi.org/10.1684/ejd.2015.2551>
- 671 Supe, S., & Takudage, P. (2021). Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review.
672 *Skin Research and Technology*, 27(3), 299–308. <https://doi.org/10.1111/srt.12968>
- 673 Taysse, L., Daulon, S., Delamanche, S., Bellier, B., & Breton, P. (2007). Skin decontamination of
674 mustards and organophosphates: Comparative efficiency of RSDL and Fuller's earth in domestic
675 swine. *Human and Experimental Toxicology*, 26(2), 135–141.
676 <https://doi.org/10.1177/0960327107071866>
- 677 Teodorescu, M., Bercea, M., & Morariu, S. (2019). Biomaterials of PVA and PVP in medical and
678 pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. In *Biotechnology Advances* (Vol. 37,
679 Issue 1, pp. 109–131). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.008>
- 680 Thors, L., Koch, M., Wigenstam, E., Koch, B., Hägglund, L., & Bucht, A. (2017). Comparison of skin
681 decontamination efficacy of commercial decontamination products following exposure to VX on
682 human skin. *Chemico-Biological Interactions*, 273(June), 82–89.
683 <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.002>

684 Vashisth, P., Nikhil, K., Roy, P., Pruthi, P. A., Singh, R. P., & Pruthi, V. (2016). A novel gellan-PVA
685 nanofibrous scaffold for skin tissue regeneration: Fabrication and characterization.
686 *Carbohydrate Polymers*, 136, 851–859. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.113>

687 Walters, T. J., Cpt, ;, Kauvar, D. S., Usa, M. C., Reeder, J., & Baer, D. G. (2007). Effect of Reactive Skin
688 Decontamination Lotion on Skin Wound Healing in Laboratory Rats. In *MILITARY MEDICINE* (Vol.
689 171). <https://academic.oup.com/milmed/article/172/3/318/4578085>

690 Willems, M. (1990). Adsorption of creatinine to Fuller’s earth. In *Scand J Clin Lab Invest* (Vol. 50).

691 Maibach, H. H. X. Z. H. (2017). WO2017053594A1. *World Intellectual Property Organization*.

692 Yang, K., Han, Q., Chen, B., Zheng, Y., Zhang, K., Li, Q., & Wang, J. (2018). Antimicrobial hydrogels:
693 Promising materials for medical application. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 13,
694 pp. 2217–2263). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S154748>

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

	Formulation	Film-forming properties	Drying time (min)	Quantity of POX (%)	
				Film	Surface
A	P12	+	5,2 ± 0,9	80 ± 5,5** ^{α,β}	20 ± 5,5
	P20	+	7,2 ± 0,4	84 ± 3,3	16 ± 3,3
B	P12F9	±	X	X	X
	P12F15	±	X	X	X
	P20F9	±	X	X	X
	P20F15	-	X	X	X
C	P12D3	+	6,6 ± 0,4	82 ± 6,5** ^{α,β}	18 ± 6,5
	P12L3	+	6,5 ± 0,4	87,8 ± 3,8	12,2 ± 3,8
	P20D3	+	5,8 ± 0,3	76,8 ± 2,4** ^δ	23,2 ± 2,4
D	P20L3	+	6,1 ± 0,4	80,3 ± 3,8** ^δ	19,7 ± 3,8
	P12F9D3	+	3,5 ± 0,3	84,1 ± 1,2* ^α	15,9 ± 1,2
	P12F9L3	+	3,3 ± 0,04	85,8 ± 0,4* ^β	14,2 ± 0,4
	P12F15D3	+	6,7 ± 0,4	97,9 ± 0,5* [#]	2,1 ± 0,5
E	P12F15L3	+	6,3 ± 0,8	98,5 ± 0,4* [#]	1,5 ± 0,4
	P20F9D3	+	4,8 ± 0,1	96,6 ± 0,2** [#]	3,4 ± 0,2
F	P20F9L3	+	6,5 ± 0,4	95,8 ± 0,3** [#]	3,4 ± 0,3
	P20F15D3	-	X	X	X
G	P20F15L3	-	X	X	X
	Peel-off mask	+	3,7 ± 0,4	81 ± 1,4	20 ± 1,4

Table 1 Development and selection of the formulations according to their film-forming properties (“+” for film-forming, “±” for crumbly and “-” for not film-forming), drying time (at 32°C) and their decontamination capacities against POX on glass slides (n=3 for each test). Results of decontamination capacities were statistically analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn’s multiple comparison tests. Values are presented as mean ± SEM. Statistical differences were presented by symbols: “#” for conditions that were compared to peel-off mask, “α” for conditions that were compared to P12F15D3, “β” for conditions that were compared to P12F15L3 and “δ” for conditions that were compared to P20F9D3 and P20F9L3. *: p < 0.05, **: p < 0.01.

Decontamination method	P12F15D3	P12F15L3	P20F9D3	P20F9L3	Water	FE powder	RSDL
<i>In vitro</i> decontamination efficiency (DE) %	84,4 ± 4,7***	92,2 ± 3,8 ^{ns}	96,5 ± 1,3 ^{ns}	93,5 ± 2,1 ^{ns}	91,4 ± 2,8 ^{ns}	91,8 ± 2,5 ^{ns}	95,2 ± 1,9

Table 2 *In vitro* decontamination efficiency (DE) for each decontamination methods compared to POX without decontamination (n=6 for each formulation). Results were statistically analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn’s multiple comparison tests. The conditions were statistically compared to RSDL. Values are presented as mean ± SEM. ns: no significant, ***: p < 0.005.

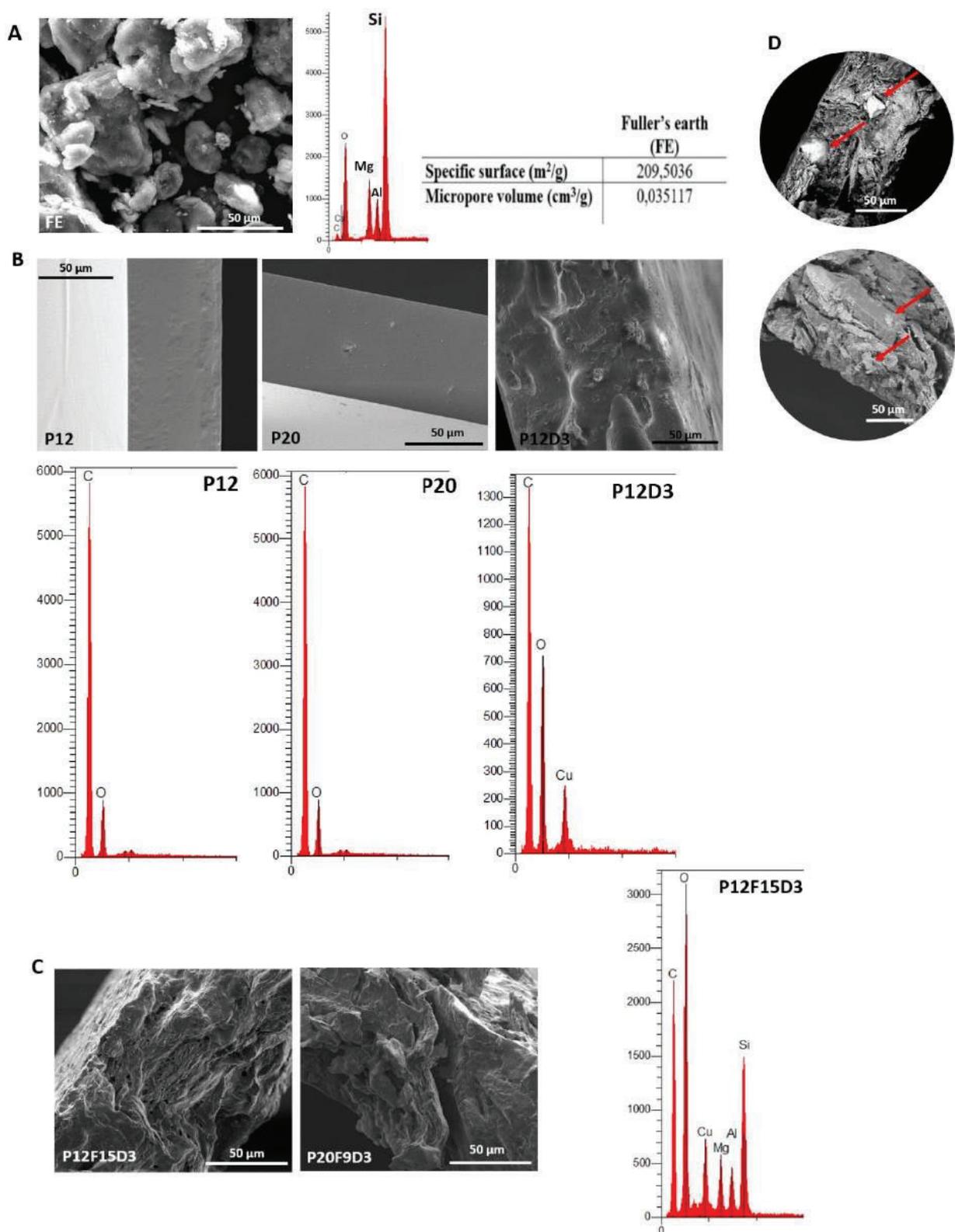


Fig. 1. Analysis of the structure and composition of formulations by SEM coupled with an EDX detector. A) Images of FE in powder form, EDX spectrum and analyze of specific surface and micropore volume of FE, B) Images of P12, P20 and P12D3 formulation and its EDX spectrum, C) Images of P12F15D3 and P12F15L3 formulation and EDX spectrum, D) Backscattering images of P12F15D3 (FE particles indicated by red arrows). Mg for magnesium, Al for aluminum, Si for silicon, Cu for copper, O for oxygen, C for carbon. Scale bar = 50 μm

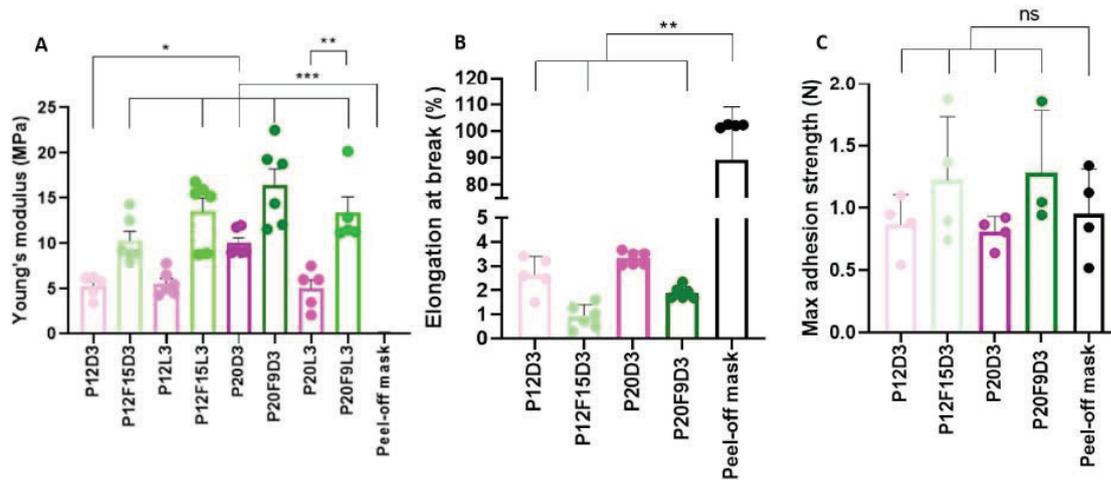


Fig. 2. Tensile strength and peeling tests of formulations. A) Determination of Young's modulus of each formulation (n=5 for P12D3 and n = 6 for P12F15D3, P20D3, P20F9D3 and Peel-off mask) B) Elongation at break point of each formulation (n = 5 for P12D3 and n=6 for P12F15D3, P20D3, P20F9D3 and Peel-off mask), C) Determination of the maximum adhesion strength (N) of each formulation using 180° peeling test (n = 4 for each). Results were statistically analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison tests. Values are presented as mean \pm SEM. For graphs B and C, the conditions were statistically compared to the peel-off mask. ns: no significant, *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.005 and ****: p < 0,001

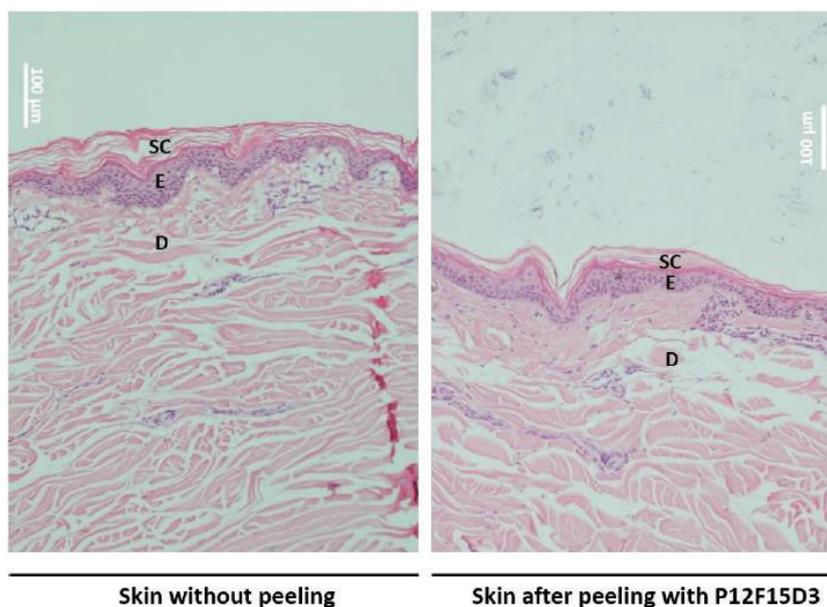


Fig. 3. Histology of pig ear skin explant without peeling test (control) and after peeling test with P12F15D3 formulation. SC for stratum corneum, E for epidermis and D for dermis. Scale bar = 100μm

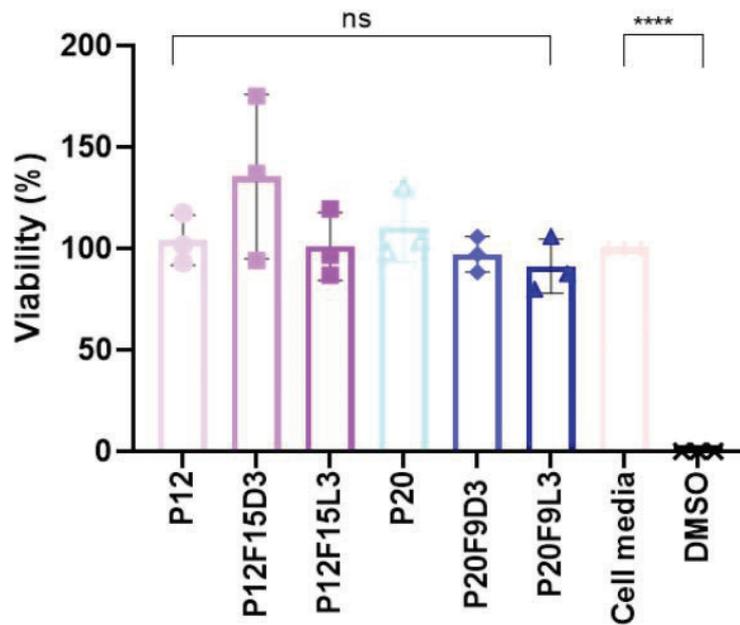


Fig. 5. Cytotoxicity of each formulation (with and without FE) on NHDFs after 30 minutes of exposure by presto blue (n=3 for each formulation). Results were statistically analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn’s multiple comparison. The different conditions were statistically compared to the control “Cell media”. Values are presented as mean ± SEM. ns: no significant, ****: p < 0,001.

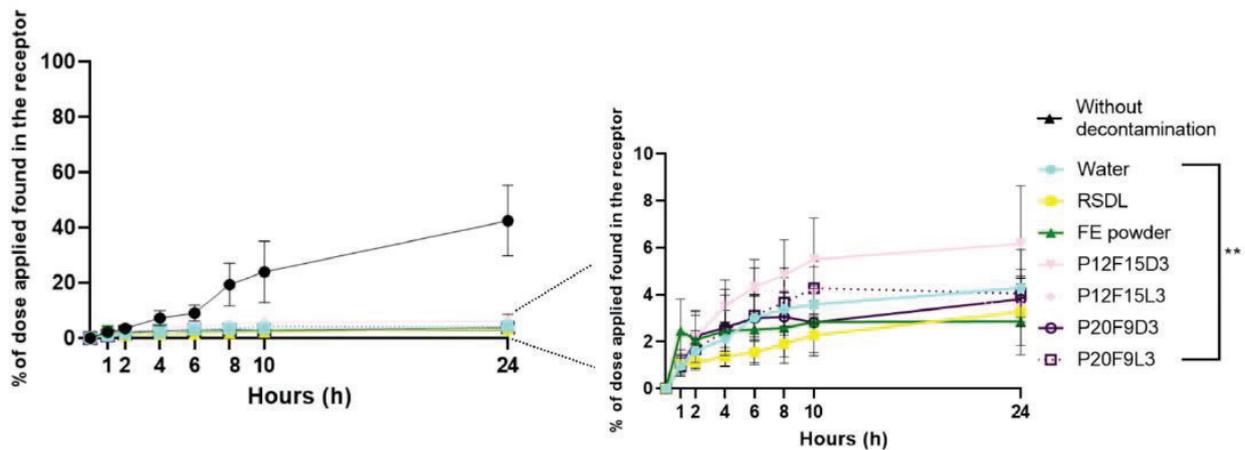


Fig. 6. *Ex vivo* POX penetration assessment through pig ear skin with and without decontamination method. Different decontamination methods were used: formulation with FE (P12F15D3, P12F15L3, P20F9D3, P20F9L3), water, FE in powder form and RSDL (n=5 for water and n=6 for other method of decontamination). Results were statistically analyzed using U-test (Mann-Whitney) against the control without decontamination. Values are presented as mean ± SEM. **: p < 0.01.

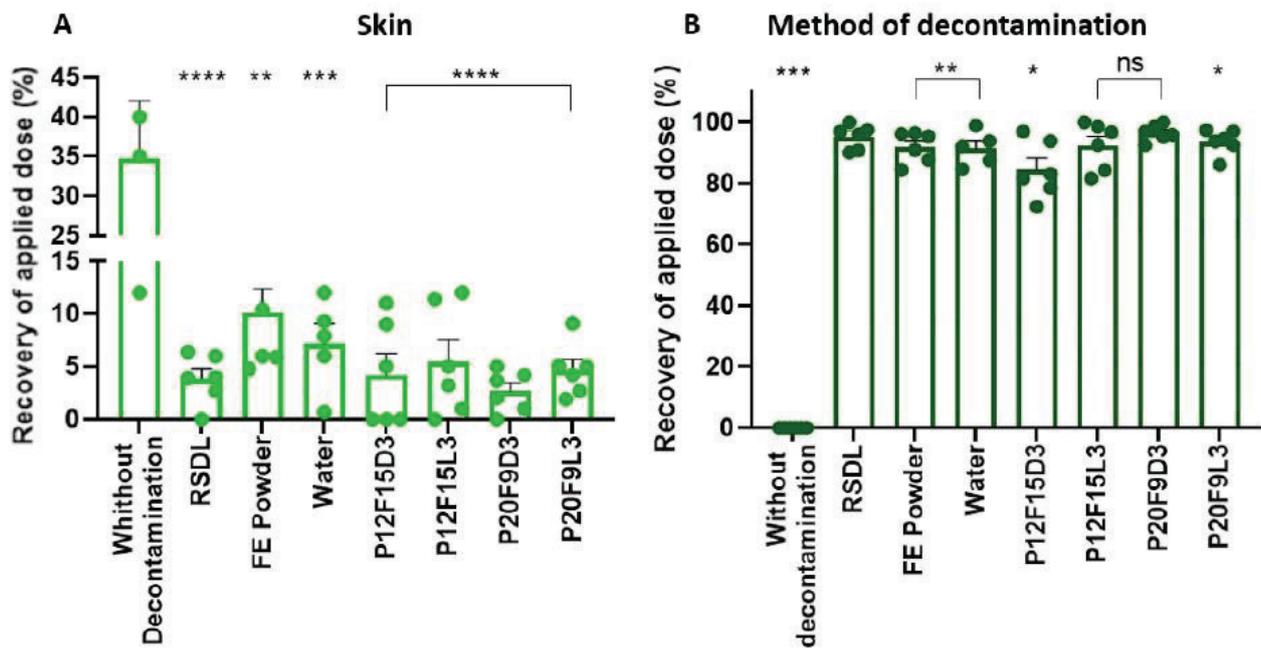


Fig. 7. A) Quantification of POX within the skin after 24 hours of diffusion through pig ear skin explant, B) Quantification of POX in the different method of decontamination after 24 hours of diffusion through pig ear skin explant. (n=6 for each). Results were statistically analyzed using Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison tests. For graph A, the conditions were statistically compared to the samples without decontamination and for graph B, the conditions were statistically compared to RSDL. Values are presented as mean \pm SEM. ns: no significant, *:p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.005 and ****: p < 0,001.

Annexe 3

Guideline 428 de l'OCDE – Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques

Absorption cutanée : méthode *in vitro*

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Skin Absorption: *in vitro* Method

INTRODUCTION

1. This test guideline has been designed to provide information on absorption of a test substance applied to excised skin. It can either be combined with the OECD Test Guideline for Skin Absorption: *In vivo* Method (1), or be conducted separately. It is recommended that the OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies (2) be consulted to assist in the design of studies based on this Test Guideline. The OECD Guidance Document has been prepared to facilitate the selection of appropriate *in vitro* procedures for use in specific circumstances, to ensure the reliability of results obtained by this method.

INITIAL CONSIDERATIONS

2. The methods for measuring skin absorption and dermal delivery can be divided into two categories: *in vivo* and *in vitro*. *In vivo* methods on skin absorption are well established and provide pharmacokinetic information in a range of animal species. An *in vivo* method is separately described in another OECD guideline (1). *In vitro* methods have also been used for many years to measure skin absorption. Although formal validation studies of the *in vitro* methods covered by this Test Guideline have not been performed, OECD experts agreed in 1999 that there was sufficient data evaluated to support the *in vitro* Test Guideline (3). Further details that substantiate this support, including a significant number of direct comparisons of *in vitro* and *in vivo* methods, are provided with the Guidance Document (2). There are a number of monographs that review this topic and provide detailed background on the use of an *in vitro* method (4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12). *In vitro* methods measure the diffusion of chemicals into and across skin to a fluid reservoir and can utilise non-viable skin to measure diffusion only, or fresh, metabolically active skin to simultaneously measure diffusion and skin metabolism. Such methods have found particular use as a screen for comparing delivery of chemicals into and through skin from different formulations and can also provide useful models for the assessment of percutaneous absorption in humans.

3. The *in vitro* method may not be applicable for all situations and classes of chemicals. It may be possible to use the *in vitro* test method for an initial qualitative evaluation of skin penetration. In certain cases, it may be necessary to follow this up with *in vivo* data. The Guidance Document (2) should be consulted for further elaboration of situations where the *in vitro* method would be suitable. Additional detailed information to support the decision is provided in an OECD Expert Meeting report (3).

4. This guideline presents general principles for measuring dermal absorption and delivery of a test substance using excised skin. Skin from many mammalian species, including humans, can be used. The permeability properties of skin are maintained after excision from the body because the principal diffusion barrier is the non-viable *stratum corneum*; active transport of chemicals through the skin has not been identified. The skin has been shown to have the capability to metabolise some chemicals during percutaneous absorption (6), but this process is not rate limiting in terms of actual absorbed dose, although it may affect the nature of the material entering the bloodstream.

PRINCIPLE OF THE TEST

5. The test substance, which may be radiolabelled, is applied to the surface of a skin sample separating the two chambers of a diffusion cell. The chemical remains on the skin for a specified time under specified conditions, before removal by an appropriate cleansing procedure. The receptor fluid is sampled at time points throughout the experiment and analysed for the test chemical and/or metabolites.

6. When metabolically active systems are used, metabolites of the test chemical may be analysed by appropriate methods. At the end of the experiment the distribution of the test chemical and its metabolites are quantified, when appropriate.

7. Using appropriate conditions, which are described in this guideline and accompanying guidance document (2), absorption of a test substance during a given time period is measured by analysis of the receptor fluid and the treated skin. The test substance remaining in the skin should be considered as absorbed unless it can be demonstrated that absorption can be determined from receptor fluid values alone. Analysis of the other components (material washed off the skin and remaining within the skin layers) allows for further data evaluation, including total test substance disposition and percentage recovery.

8. To demonstrate the performance and reliability of the test system in the performing laboratory, the results for relevant reference chemicals should be available and in agreement with published literature for the method used. This requirement could be met by testing an appropriate reference substance (preferably of a lipophilicity close to the test substance) concurrently with the test substance or by providing adequate historical data for a number of reference substances of different lipophilicity (e.g. caffeine, benzoic acid, and testosterone).

DESCRIPTION OF THE METHOD

Diffusion cell

9. A diffusion cell consists of a donor chamber and a receptor chamber between which the skin is positioned (an example of a typical design is provided in Figure 1). The cell should provide a good seal around the skin, enable easy sampling and good mixing of the receptor solution in contact with the underside of the skin, and good temperature control of the cell and its contents. Static and flow-through diffusion cells are both acceptable. Normally, donor chambers are left unoccluded during exposure to a finite dose of a test preparation. However, for infinite applications and certain scenarios for finite doses, the donor chambers may be occluded.

Receptor fluid

10. The use of a physiologically conducive receptor fluid is preferred although others may also be used provided that they are justified. The precise composition of the receptor fluid should be provided. Adequate solubility of the test chemical in the receptor fluid should be demonstrated so that it does not act as a barrier to absorption. In addition, the receptor fluid should not affect skin preparation integrity. In a flow-through system, the rate of flow must not hinder diffusion of a test substance into the receptor fluid. In a static cell system, the fluid should be continuously stirred and sampled regularly. If metabolism is being studied, the receptor fluid must support skin viability throughout the experiment.

Skin preparations

11. Skin from human or animal sources can be used. It is recognised that the use of human skin is subject to national and international ethical considerations and conditions. Although viable skin is preferred, non-viable skin can also be used provided that the integrity of the skin can be demonstrated. Either epidermal membranes (enzymically, heat or chemically separated) or split thickness skin (typically 200-400 μm thick) prepared with a dermatome, are acceptable. Full thickness skin may be used but excessive thickness (*ca.* > 1 mm) should be avoided unless specifically required for determination of the test chemical in layers of the skin. The selection of species, anatomical site and preparative technique must be justified. Acceptable data from a minimum of four replicates per test preparation are required.

Skin preparation integrity

12. It is essential that the skin is properly prepared. Inappropriate handling may result in damage to the *stratum corneum*, hence the integrity of the prepared skin must be checked. When skin metabolism is being investigated, freshly excised skin should be used as soon as possible, and under conditions known to support metabolic activity. As a general guidance, freshly excised skin should be used within 24 hrs, but the acceptable storage period may vary depending on the enzyme system involved in metabolism and storage temperatures (13). When skin preparations have been stored prior to use, evidence should be presented to show that barrier function is maintained.

Test substance

13. The test substance is the entity whose penetration characteristics are to be studied. Ideally, the test substance should be radiolabelled.

Test preparation

14. The test substance preparation (e.g., neat, diluted or formulated material containing the test substance which is applied to the skin) should be the same (or a realistic surrogate) as that to which humans or other potential target species may be exposed. Any variation from the 'in-use' preparation must be justified.

Test substances concentrations and formulations

15. Normally more than one concentration of the test substance is used in typical formulations, spanning the realistic range of potential human exposures. Likewise, testing a range of typical formulations should be considered.

Application to the skin

16. Under normal conditions of human exposure to chemicals, finite doses are usually encountered. Therefore, an application that mimics human exposure, normally 1-5 mg/cm^2 of skin for a solid and up to 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ for liquids, should be used. The quantity should be justified by the expected use conditions, the study objectives or physical characteristics of the test preparation. For example, applications to the skin surface may be infinite, where large volumes per unit area are applied.

Temperature

17. The passive diffusion of chemicals (and therefore their skin absorption) is affected by temperature. The diffusion chamber and skin should be maintained at a constant temperature close to

normal skin temperature of $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Different cell designs will require different water bath or heated block temperatures to ensure that the receptor/skin is at its physiological norm. Humidity should preferably be between 30 and 70%.

Duration of exposure and sampling

18. Skin exposure to the test preparation may be for the entire duration of the experiment or for shorter times (i.e., to mimic a specific type of human exposure). The skin should be washed of excess test preparation with a relevant cleansing agent, and the rinses collected for analysis. The removal procedure of the test preparation will depend on the expected use condition, and should be justified. A period of sampling of 24 hours is normally required to allow for adequate characterisation of the absorption profile. Since skin integrity may start to deteriorate beyond 24 hours, sampling times should not normally exceed 24 hours. For test substances that penetrate the skin rapidly this may not be necessary but, for test substances that penetrate slowly, longer times may be required. Sampling frequency of the receptor fluid should allow the absorption profile of the test substance to be presented graphically.

Terminal procedures

19. All components of the test system should be analysed and recovery is to be determined. This includes the donor chamber, the skin surface rinsing, the skin preparation and the receptor fluid/chamber. In some cases, the skin may be fractionated into the exposed area of skin and area of skin under the cell flange, and into *stratum corneum*, epidermis and dermis fractions, for separate analysis.

Analysis

20. In all studies adequate recovery should be achieved (the aim should be a mean of $100 \pm 10\%$ of the radioactivity and any deviation should be justified). The amount of test substance in the receptor fluid, skin preparation, skin surface washings and apparatus rinse should be analysed, using a suitable technique.

DATA AND REPORTING

Data

21. The analysis of receptor fluid, the distribution of the test substance chemical in the test system and the absorption profile with time, should be presented. When finite dose conditions of exposure are used, the quantity washed from the skin, the quantity associated with the skin (and in the different skin layers if analysed) and the amount present in the receptor fluid (rate, and amount or percentage of applied dose) should be calculated. Skin absorption may sometimes be expressed using receptor fluid data alone. However, when the test substance remains in the skin at the end of the study, it may need to be included in the total amount absorbed (see Guidance Document, paragraph 66). When infinite dose conditions of exposure are used the data may permit the calculation of a permeability constant (K_p). Under the latter conditions, the percentage absorbed is not relevant.

Test report

22. The test report must include the requirements stipulated in the protocol, including a justification for the test system used and should, comprise the following:

Test substance:

- physical nature, physicochemical properties (at least molecular weight and log P_{ow}), purity (radiochemical purity);
- identification information (e.g. batch number);
- solubility in receptor fluid.

Test preparation:

- formulation and justification of use;
- homogeneity.

Test conditions:

- sources and site of skin, method of preparation, storage conditions prior to use, any pre-treatment (cleaning, antibiotic treatments, etc.), skin integrity measurements, metabolic status, justification of use;
- cell design, receptor fluid composition, receptor fluid flow rate or sampling times and procedures;
- details of application of test preparation and quantification of dose applied;
- duration of exposure;
- details of removal of test preparation from the skin, for example, skin rinsing;
- details of analysis of skin and any fractionation techniques employed to demonstrate skin distribution;
- cell and equipment washing procedures;
- assay methods, extraction techniques, limits of detection and analytical method validation.

Results:

- overall recoveries of the experiment (Applied dose \equiv Skin washings + Skin + Receptor fluid + Cell washings);
- tabulation of individual cell recoveries in each compartment;
- absorption profile;
- tabulated absorption data (expressed as rate, amount or percentage).

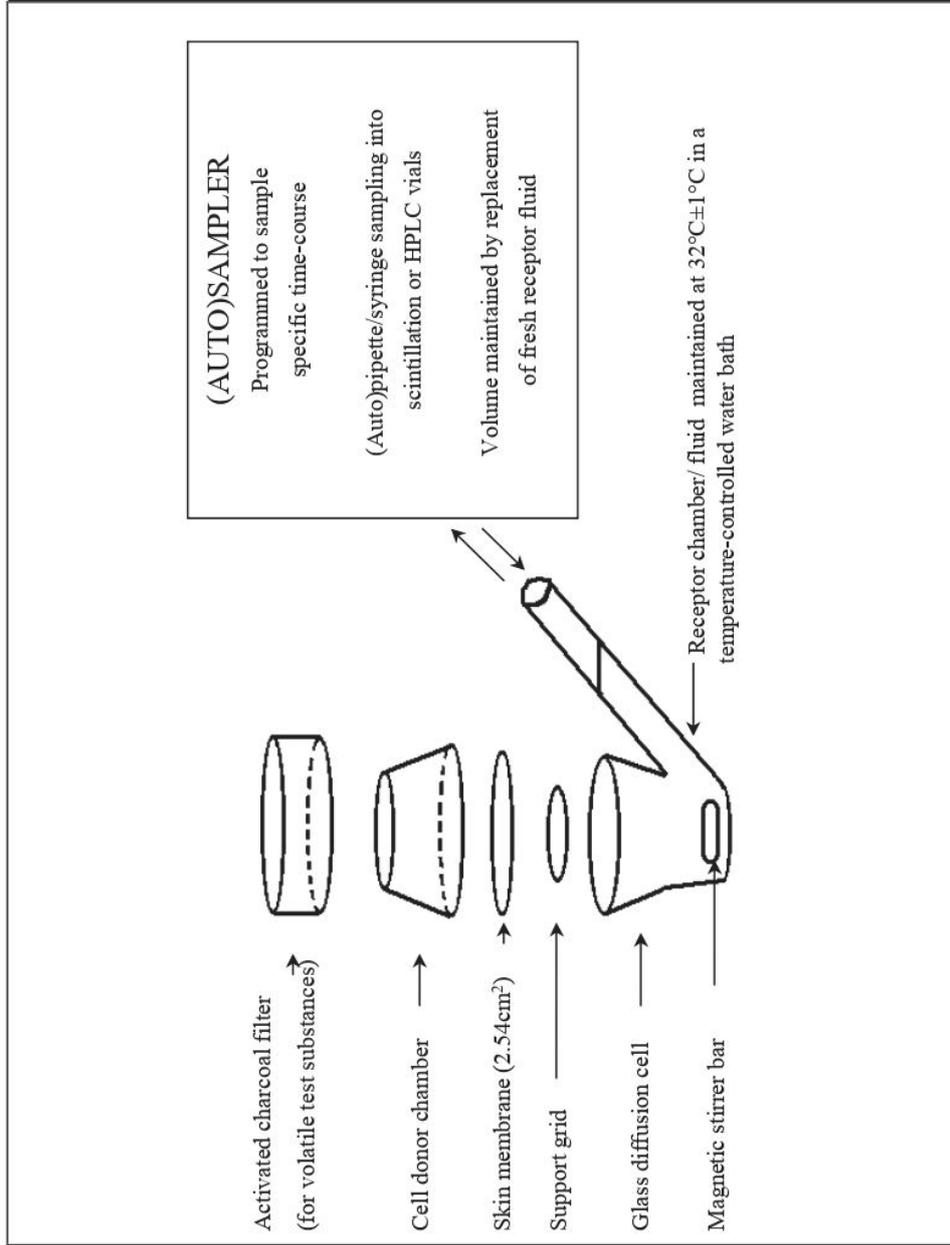
Discussion of results.

Conclusions.

LITERATURE

- (1) OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: *in vivo* Method. OECD, Paris.
- (2) OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.
- (4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.
- (5) Bronaugh RL and 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 and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications*. CRC Press, Boca Raton.
- (7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.
- (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: An example of a Typical Design of a Static Diffusion Cell for *in vitro* Percutaneous Absorption Studies



ANNEXDEFINITIONS

Unabsorbed dose: represents that washed from the skin surface after exposure and any present on the non-occlusive cover, including any dose shown to volatilise from the skin during exposure.

Absorbed dose: (*in vitro*): mass of test substance reaching the receptor fluid or systemic circulation within a specified period of time.

The absorbable dose: (*in vitro*) represents that present on or in the skin following washing.

Annexe 4

Système Vitropharma – Cellule de Franz miniaturisée

(Salmon *et al.*, 2015)

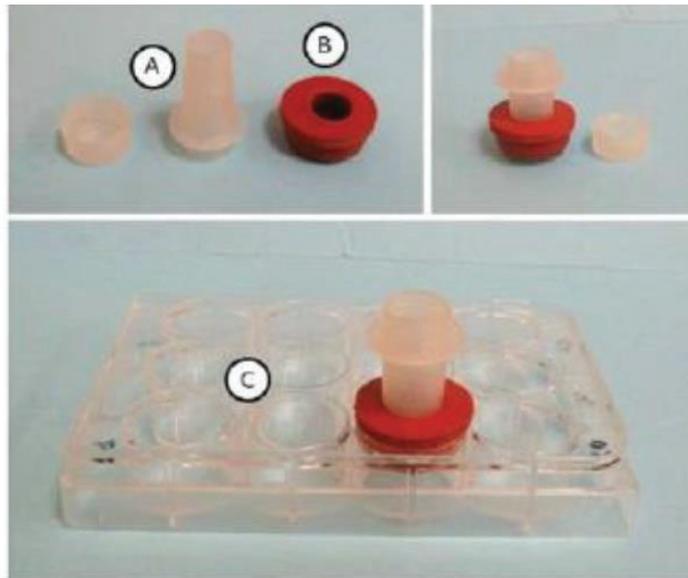


Figure 44 – Système Vitropharma, cellule miniaturisée de Franz. A: Compartiment donneur, B: joint d'étanchéité and C: compartiment récepteur (Salmon *et al.*, 2015²²⁰).

Annexe 5

Structure chimique des molécules employées au cours de ces travaux de thèse

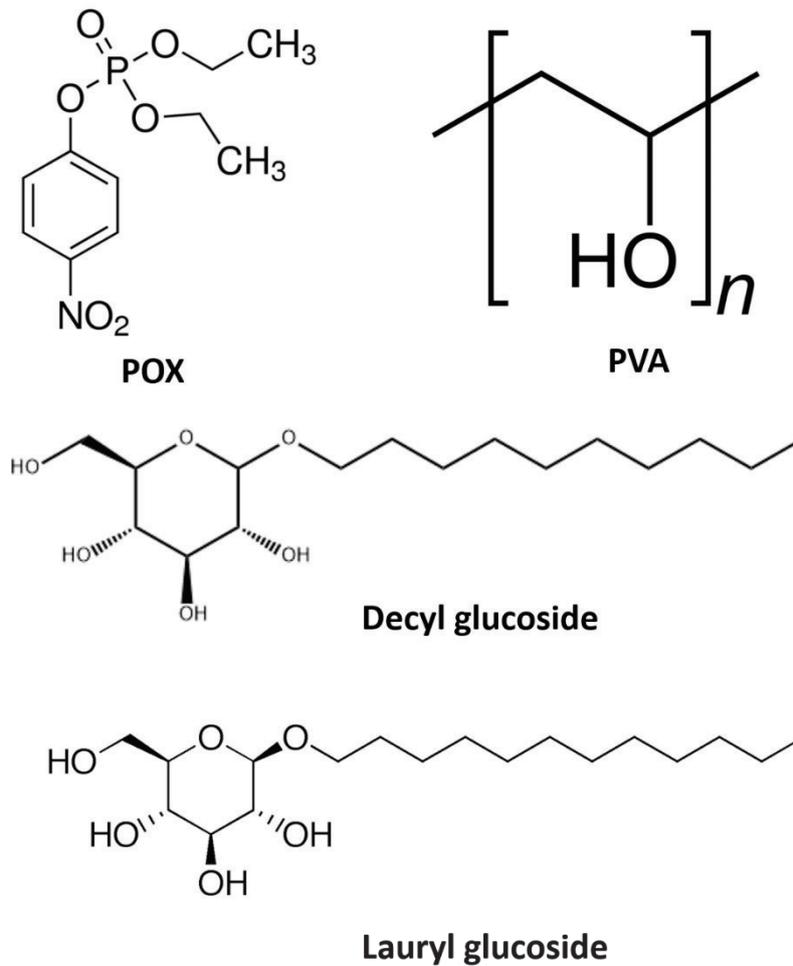


Figure 45 – Structure chimique des molécules utilisées au cours de ces travaux de thèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pitschmann, V. & Hon, Z. Drugs as Chemical Weapons: Past and Perspectives. *Toxics* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxics11010052> (2023).
2. Keaveney, A. & Mayor, A. Greek Fire, Poison Arrows & Scorpion Bombs: Biological and Chemical Warfare in the Ancient World. *Classics Ireland* **11**, 110 (2004).
3. Szinicz, L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* **214**, 167–181 (2005).
4. Mukrimaa, S. S. *et al.* *Frontline and Factory: Comparative perspectives on the chemical industry at war. Jurnal Penelitian Pendidikan Guru Sekolah Dasar* vol. 6 (2016).
5. J. F Brown. *Chemical warfare: A study in restraints. Princeton University Press* (1968)
6. Black, R. Development, Historical Use and Properties of chemical warfare agents. *Warfare Agents. Royal society of chemistry A to Z* **1**, 1–28 (2020).
7. R. Harris and J. Paxman *A higher form of killing: The secret of chemical and biological warfare. Public press* (1968)
8. Haines, D. D. & Fox, S. C. Acute and long-term impact of chemical weapons: Lessons from the Iran-Iraq war. *Forensic Sci Rev* **26**, 97–114 (2014).
9. Taneda, K. *et al.* The sarin nerve gas attack on the Tokyo subway system: Hospital response to mass casualties and psychological issues in hospital planning. *Traumatology* **1-11**, (2005).
10. Raza, S. K. & Jaiswal, D. K. Mechanism of Cyanide Toxicity and Efficacy of its Antidotes. *Def Sci J* **44**, 331–340 (1994).
11. Smith, K. J, R. Casillas, J. Graham, H. Skleton, F. Stemler, B.E. Hackley. Histopathological features seen with different animal models following cutaneous sulfur mustard exposure. *Journal of dermatological science.* **14**, 126–135 (1997).
12. Kehe, K., Balszuweit, F., Steinritz, D. & Thiermann, H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology* **263**, 12–19 (2009).
13. Mukherjee, S. & Gupta, R. D. Organophosphorus Nerve Agents: Types, Toxicity, and Treatments. *J Toxicol* **2020**, (2020).

14. Bester, S. M. *et al.* Structural Insights of Stereospecific Inhibition of Human Acetylcholinesterase by VX and Subsequent Reactivation by HI-6. *Chem Res Toxicol* **31**, 1405–1417 (2018).
15. Moshiri, M., Darchini-Maragheh, E. & Balali-Mood, M. Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences* **20**, 1–24 (2012).
16. Pitschmann, V. Overall view of chemical and biochemical weapons. *Toxins* vol. 6 1761–1784 Preprint at <https://doi.org/10.3390/toxins6061761> (2014).
17. Mostafalou, S. & Abdollahi, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch Toxicol* **91**, 549–599 (2017).
18. Eddleston, M., Buckley, N. A., Eyer, P. & Dawson, A. H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet* **371**, 597–607 (2008).
19. Eddleston, M. & Phillips, M. R. Self poisoning with pesticides. *Br Med J* **328**, 42–44 (2004).
20. Products, V., Of, I. N. F. & Ministry, T. H. E. Determination of residues of organophosphorus pesticides in fruits and vegetables. *Analyst* **102**, 858–868 (1977).
21. Russell, A. J., Berberich, J. A., Drevon, G. F. & Koepsel, R. R. Biomaterials for mediation of chemical and biological warfare agents. *Annu Rev Biomed Eng* **5**, 1–27 (2003).
22. Bismuth, C. Armes chimiques description et risques toxiques. *Reanimation Urgences* **2**, 625–633 (1993).
23. Buckley, N. A., Dawson, A. H. & Whyte, I. M. Organophosphate poisoning: Peripheral vascular resistance - A measure of adequate atropinization. *Clin Toxicol* **32**, 61–68 (1994).
24. Bhakhoa, H., Rhyman, L. & Ramasami, P. Theoretical study of the molecular aspect of the suspected novichok agent A234 of the Skripal poisoning. *R Soc Open Sci* **6**, (2019).
25. Moyer, R. A., Sidell, F. R. & Salem, H. Nerve Agents. in *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* 483–488 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00635-7.
26. Worek, F., Wille, T., Koller, M. & Thiermann, H. Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Arch Toxicol* **90**, 2131–2145 (2016).

27. Marrs, T. C., Rice, P. & Vale, J. A. The role of oximes in the treatment of nerve agent poisoning in civilian casualties. *Toxicol Rev* **25**, 297–323 (2006).
28. Henretig, F. M., Kirk, M. A. & McKay, C. A. Hazardous Chemical Emergencies and Poisonings. *New England Journal of Medicine* **380**, 1638–1655 (2019).
29. Sidell, F. R. & Borak, J. Chemical warfare agents: II. nerve agents. *Ann Emerg Med* **21**, 865–871 (1992).
30. Maxwell, D. M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* **114**, 306–312 (1992).
31. Masson, P., Carletti, E. & Nachon, F. Structure, Activities and Biomedical Applications of Human Butyrylcholinesterase. *Protein Pept Lett* **16**, 1215–1224 (2009).
32. Ave, G. & Rm, B. A . Report Title : MEDICAL ASPECTS of CHEMICAL
33. Hamilton, M. G. *et al.* Clinical aspects of percutaneous poisoning by the chemical warfare agent VX: Effects of application site and decontamination. *Mil Med* **169**, 856–862 (2004).
34. Rousseau, J. M., Rüttimann, M. & Brinquin, L. Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. 588–598 (2000).
35. Hsiao, C. T., Yang, C. C., Deng, J. F., Bullard, M. J. & Liaw, S. J. Acute pancreatitis following organophosphate intoxication. *J Toxicol Clin Toxicol* **34**, 343–347 (1996).
36. Karalliedde, L. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. *Anaesthesia* **54**, 1073–1088 (1999).
37. Tsao, T. C. Y., Juang, Y. C., Lan, R. S., Shieh, W. B. & Lee, C. H. Respiratory failure of acute organophosphate and carbamate poisoning. *Chest* **98**, 631–636 (1990).
38. Johnson, M. K. A phosphorylation site in brain and the delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds. *Biochem J* **111**, 487–495 (1969).
39. Amend, N. *et al.* A case report of cholinesterase inhibitor poisoning: cholinesterase activities and analytical methods for diagnosis and clinical decision making. *Arch Toxicol* **94**, 2239–2247 (2020).
40. Rousseau, J. M., Rüttimann, M. & Brinquin, L. Intoxications aiguës par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. 588–598 (2000).

41. Afssaps. *Fiche Piratox n°4: Organophosphorés: neurotoxiques de guerre et pesticides*. www.afssaps.sante.fr (2010).
42. Vale, J. A. *Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of Ž. organophosphorus OP insecticide poisoning*. *Toxicology Letters* vol. 102103 (1998).
43. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. *A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY*. *Biochemical Pharmacology* vol. 7 (1961).
44. Dalton, C. H. *et al.* 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**, 543–550 (2015).
45. Misik, J. *et al.* In vivo decontamination of the nerve agent VX using the domestic swine model. *Clin Toxicol* **50**, 807–811 (2012).
46. Carabias Martinez, R., Rodriguez Gonzalo, E., Moran, M. J. A. & Hernandez Mendez, J. *Sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and surface waters by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. *Journal of Chromatography* vol. 607 (1992).
47. Bartelt-Hunt, S. L., Knappe, D. R. U. & Barlaz, M. A. A review of chemical warfare agent simulants for the study of environmental behavior. *Crit Rev Environ Sci Technol* **38**, 112–136 (2008).
48. Cavalcante, S. F. A. *et al.* One-pot synthesis of NEMP, a VX surrogate, and reactivation of NeMP-inhibited electrophorus eel acetylcholinesterase by current antidotes. *J Braz Chem Soc* **30**, 1095–1102 (2019).
49. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**, 88–95 (1961).
50. Costa, L. G. *Toxicology of pesticides A brief History* (1–2 (1987)).
51. Qiao, G. L. & Riviere, J. E. Significant effects of application site and occlusion on the pharmacokinetics of cutaneous penetration and biotransformation of parathion in vivo in swine. *J Pharm Sci* **84**, 425–432 (1995).

52. Reifenrath, W. G., Hawkins, G. S. & Kurtz, M. S. Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: An in vitro-in vivo study. *J Pharm Sci* **80**, 526–532 (1991).
53. Vallet, V. *et al.* Percutaneous penetration and distribution of VX using in vitro pig or human excised skin. Validation of demeton-S-methyl as adequate simulant for VX skin permeation investigations. *Toxicology* **246**, 73–82 (2008).
54. Misik, J., Pavlikova, R., Cabal, J. & Kuca, K. Acute toxicity of some nerve agents and pesticides in rats. *Drug Chem Toxicol* **38**, 32–36 (2015).
55. Misik, J., Pavlikova, R., Josse, D., Cabal, J. & Kuca, K. In vitro skin permeation and decontamination of the organophosphorus pesticide paraoxon under various physical conditions evidence for a wash-in effect. *Toxicol Mech Methods* **22**, 520–525 (2012).
56. Zenerino, A. *et al.* New CeO₂ nanoparticles-based topical formulations for the skin protection against organophosphates. *Toxicol Rep* **2**, 1007–1013 (2015).
57. Zhu, H., Jung, E. C., Phuong, C., Hui, X. & Maibach, H. Effects of soap–water wash on human epidermal penetration. *Journal of Applied Toxicology* **36**, 997–1002 (2016).
58. Salerno, A., Pitault, I., Devers, T., Pelletier, J. & Briançon, S. Model-based optimization of parameters for degradation reaction of an organophosphorus pesticide, paraoxon, using CeO₂ nanoparticles in water media. *Environ Toxicol Pharmacol* **53**, 18–28 (2017).
59. Salerno, A. *et al.* In vitro skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO₂. *Chem Biol Interact* **267**, 57–66 (2017).
60. Danoy, A. *et al.* Aqueous suspensions of Fuller’s earth potentiate the adsorption capacities of paraoxon and improve skin decontamination properties. *J Hazard Mater* **425**, (2022).
61. Blickenstaff, N. R., Coman, G., Blattner, C. M., Andersen, R. & Maibach, H. I. Biology of percutaneous penetration. *Rev Environ Health* **29**, 145–155 (2014).
62. Chambers, E. S. & Vukmanovic-Stejic, M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* **160**, 116–125 (2020).
63. Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. & Wong, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. 92–98 (2016) doi:10.1111/exd.12832.

64. Moltrasio, C. & Romagnuolo, M. Epigenetic Mechanisms of Epidermal Differentiation. (2022).
65. Swindle, L. D., Thomas, S. G., Freeman, M. & Delaney, P. M. View of Normal Human Skin In Vivo as Observed Using Fluorescent Fiber-Optic Confocal Microscopic Imaging. *Journal of Investigative Dermatology* **121**, 706–712 (2003).
66. Matsui, T. & Amagai, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. **27**, 269–280 (2015).
67. Smeden, J. Van & Bouwstra, J. A. Stratum Corneum Lipids : Their Role for the Skin Barrier Function in Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients. **49**, 8–26 (2016).
68. Boncheva, M., Damien, F. & Normand, V. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. **1778**, 1344–1355 (2008).
69. Words, K. Enhanced Absorption through Damaged Skin : An Overview of the in vitro Human. 171–176 (2010) doi:10.1159/000288163.
70. Prost-Squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M. & Boehm, N. Functional histology of dermis. *Ann Dermatol Venereol* **135**, 5–20 (2008).
71. Khansa, I. & Janis, J. E. Management of skin and subcutaneous tissue in complex open abdominal wall reconstruction. *Hernia* **22**, 293–301 (2018).
72. Zouboulis, C. C. *et al.* Beyond acne: Current aspects of sebaceous gland biology and function. *Rev Endocr Metab Disord* **17**, 319–334 (2016).
73. A V. Rawlings, J. R. S. C. R. H. and P. A. B. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *Dermatology foundation* Preprint at (1994).
74. Pissarenko, A. *et al.* Tensile behavior and structural characterization of pig dermis. *Acta Biomater* **86**, 77–95 (2019).
75. Kretsos, K. & Kasting, G. B. A geometrical model of dermal capillary clearance. *Math Biosci* **208**, 430–453 (2007).
76. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential. *Nat Med* **19**, 1252–1263 (2013).
77. Robertson, J. & Soba, A. W. Application of RP-18 TLC Retention Data to the Prediction of the Transdermal Absorption of Drugs. 1–17 (2021).

78. Scheuplein, R. J. MECHANISM OF PERCUTANEOUS ADSORPTION sense the stratum corneum is a macroscopic Blank (I) and Blank and Scheuplcin (JJ) 1 and epidermal membranes makes possible a sion : stants so obtained arc truly representative of. *Journal of Investigative Dermatology* **45**, 334–346 (1965).
79. Boudry, I., Trescos, Y., Vallet, V., Cruz, C. & Lallement, G. Methods and models for percutaneous absorption studies of organophosphates. **56**, 292–299 (2008).
80. Lademann, J. *et al.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Penetration and storage of particles in human skin : Perspectives and safety aspects. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **77**, 465–468 (2011).
81. Law, R. M., Ngo, M. A. & Maibach, H. I. Twenty Clinically Pertinent Factors / Observations for Percutaneous Absorption in Humans. *Am J Clin Dermatol* (2019) doi:10.1007/s40257-019-00480-4.
82. Otberg, N., Richter, H., Schaefer, H., Blume-peytavi, U. & Sterry, W. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. 14–19 (2003) doi:10.1046/j.0022-202X.2003.22110.x.
83. Buist, H. *et al.* Guidance on dermal absorption. **15**, (2017).
84. Lane, M. E. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm* **447**, 12–21 (2013).
85. Wester, R. C. & Maibach, H. I. Cutaneous Pharmacokinetics : 10 Steps to Percutaneous Absorption *. **4**, (1983).
86. Qsar, P. *et al.* Parameters for Pesticide QSAR and PBPK / PD Models for Human Risk Assessment. (2012).
87. Wilkinson, S. C. *et al.* Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies. 405–413 (2006) doi:10.1007/s00420-005-0056-5.
88. Choy, Y. Bin & Prausnitz, M. R. NIH Public Access. **28**, 943–948 (2012).
89. Bartosova, L. & Bajgar, J. Transdermal Drug Delivery In Vitro Using Diffusion Cells. *Curr Med Chem* **19**, 4671–4677 (2012).
90. Supe, S. & Takudage, P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. *Skin Research and Technology* **27**, 299–308 (2021).

91. Poet, T. S. & McDougal, J. N. Skin absorption and human risk assessment. *Chem Biol Interact* **140**, 19–34 (2002).
92. Van De Sandt, J. J. M. *et al.* In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: A multi-centre comparison study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **39**, 271–281 (2004).
93. Khiao In, M. *et al.* Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia* **48**, 207–217 (2019).
94. Carneiro, G., Aguiar, M. G., Fernandes, A. P. & Ferreira, L. A. M. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin Drug Deliv* **9**, 1083–1097 (2012).
95. Millerioux, J. *et al.* Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicology in Vitro* **23**, 127–133 (2009).
96. Niehues, H. *et al.* 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Exp Dermatol* **27**, 501–511 (2018).
97. Craig, F. N., Cummings, E. G. & Sim, V. M. Environmental temperature and the percutaneous absorption of a cholinesterase inhibitor, VX. *Journal of Investigative Dermatology* **68**, 357–361 (1977).
98. Bronaugh, R. L. & Maibach, H. I. Percutaneous absorption of nitroaromatic compounds: In vivo and in vitro studies in the human and monkey. *Journal of Investigative Dermatology* **84**, 180–183 (1985).
99. Bazire, A., Baubichon, D., Cruz, C., Bifarella, R. & Josse, D. In vivo evaluation of skin decontaminants against chemical warfare agent VX. *Toxicol Lett* **196**, S245–S246 (2010).
100. Taysse, L., Daulon, S., Delamanche, S., Bellier, B. & Breton, P. Skin decontamination of mustards and organophosphates: Comparative efficiency of RSDL and Fuller’s earth in domestic swine. *Hum Exp Toxicol* **26**, 135–141 (2007).
101. B Olowokure, S. P. J. T. S. P. T. M. Global surveillance for chemical incidents of international public health concern - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16462985/>.

102. Clarkson, E. D. & Gordon, R. K. *Rapid Decontamination of Chemical Warfare Agents from the Skin. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents: Second Edition* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-800159-2.00076-2.
103. B. E bromberg, M. D. I. C. S. M. D. R. W. Hydrotherapy of chemical burns. *Plastic and reconstructive surgery* vol. 35 Preprint at (1965).
104. Lerner, J. *et al.* Original Contribution. **44**, 1–34.
105. Amlôt, R. *et al.* Comparative analysis of showering protocols for mass-casualty decontamination. *Prehosp Disaster Med* **25**, 435–439 (2010).
106. EPA-HQ-OPP-2008-0877-0465_content.pdf.
107. Moody, R. P. & Maibach, H. I. Skin decontamination: Importance of the wash-in effect. *Food and Chemical Toxicology* **44**, 1783–1788 (2006).
108. Loke, W. K. *et al.* Wet decontamination-induced stratum corneum hydration - Effects on the skin barrier function to diethylmalonate. *Journal of Applied Toxicology* **19**, 285–290 (1999).
109. Joosen, M. J. A., Van Der Schans, M. J., Kuijpers, W. C., Van Helden, H. P. M. & Noort, D. Timing of decontamination and treatment in case of percutaneous VX poisoning: A mini review. *Chem Biol Interact* **203**, 149–153 (2013).
110. Becker, C., Worek, F. & John, H. Chromatographic analysis of toxic phosphylated oximes (POX): A brief overview. *Drug Testing and Analysis* vol. 2 460–468 Preprint at <https://doi.org/10.1002/dta.167> (2010).
111. de Bruin-Hoegée, M., de Koning, M. C., Cochrane, L. & Joosen, M. J. A. Contact transfer risk from fentanyl-contaminated RSDL® Kit. *Toxicol Lett* **319**, 237–241 (2020).
112. Feschuk, A. M., Law, R. M. & Maibach, H. I. Comparative efficacy of Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL): A systematic review. *Toxicol Lett* **349**, 109–114 (2021).
113. Roul, A. *et al.* Comparison of four different fuller's earth formulations in skin decontamination. *Journal of Applied Toxicology* **37**, 1527–1536 (2017).
114. Rolland, P., Bolzinger, M. A., Cruz, C., Josse, D. & Briançon, S. Hairy skin exposure to VX in vitro: effectiveness of delayed decontamination. *Toxicol In Vitro* **27**, 358–366 (2013).
115. R.P Chilcott, J. L. and H. M. *Primary responses incident scene management (PRISM)*. vol. I (2018).

116. Hall, C. A. *et al.* Citation for published version : skin porcine model and the evaluation of WoundStat™ as a Document Version : This is the Accepted Manuscript version . Copyright and Reuse : (2017).
117. Mannis, D. & Brandl, A. Efficacy of common decontamination methods for cleaning contaminated wounds. *Health Phys* **108**, S5–S12 (2015).
118. Connolly, J. M. *et al.* Impairment of wound healing by reactive skin decontamination lotion (RSDL®) in a Göttingen minipig® model. *Cutan Ocul Toxicol* **39**, 143–157 (2020).
119. Khoshmohabat, H., Paydar, S., Kazemi, H. M. & Dalfardi, B. Overview of agents used for emergency hemostasis. *Trauma Mon* **21**, (2016).
120. Granville-Chapman, J., Jacobs, N. & Midwinter, M. J. Pre-hospital haemostatic dressings: A systematic review. *Injury* **42**, 447–459 (2011).
121. Grives, S. *et al.* Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion. *J Pharm Sci* **104**, 2008–2017 (2015).
122. Forum, C. P. Citation for published version : Document Version : This is the Accepted Manuscript version . Copyright and Reuse : This Manuscript version is distributed under the terms of the. **72**, 0–9 (2017).
123. Crosera, M. *et al.* In vitro permeation of palladium powders through intact and damaged human skin. *Toxicol Lett* **287**, 108–112 (2018).
124. Mauro, M. *et al.* Cerium oxide nanoparticles absorption through intact and damaged human skin. *Molecules* **24**, 1–10 (2019).
125. Spiandore, M. *et al.* Desorption of sulphur mustard simulants methylate and 2-chloroethyl ethyl sulphide from contaminated scalp hair after vapour exposure. *Chemosphere* **191**, 721–728 (2018).
126. Josse, D., Wartelle, J. & Cruz, C. Showering effectiveness for human hair decontamination of the nerve agent VX. *Chem Biol Interact* **232**, 94–100 (2015).
127. Rolland, P., Bolzinger, M. A., Cruz, C., Briançon, S. & Josse, D. Human scalp permeability to the chemical warfare agent VX. *Toxicology in Vitro* **25**, 1974–1980 (2011).
128. Skopp, G., Pötsch, L. & Moeller, M. R. On cosmetically treated hair - Aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci Int* **84**, 43–52 (1997).

129. Spiandore, M. *et al.* Efficacy of scalp hair decontamination following exposure to vapours of sulphur mustard simulants 2-chloroethyl ethyl sulphide and methyl salicylate. *Chem Biol Interact* **267**, 74–79 (2017).
130. Lee, S. M. & Tiwari, D. Organo and inorgano-organo-modified clays in the remediation of aqueous solutions: An overview. *Applied Clay Science* vols 59–60 84–102 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.02.006> (2012).
131. Jlassi, K., Krupa, I. & Chehimi, M. M. Overview: Clay Preparation, Properties, Modification. in *Clay-Polymer Nanocomposites* 1–28 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-46153-5.00001-X.
132. Bergaya, F. & Lagaly, G. Chapter 1 General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science. *Developments in Clay Science* vol. 1 1–18 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S1572-4352\(05\)01001-9](https://doi.org/10.1016/S1572-4352(05)01001-9) (2006).
133. Tournassat, C., Bourg, I. C., Steefel, C. I. & Bergaya, F. Surface Properties of Clay Minerals. in *Developments in Clay Science* vol. 6 5–31 (Elsevier B.V., 2015).
134. Tournassat, C., Bourg, I. C., Steefel, C. I. & Bergaya, F. Surface Properties of Clay Minerals. in *Developments in Clay Science* vol. 6 5–31 (Elsevier B.V., 2015).
135. Schoonheydt, R. A. Functional hybrid clay mineral films. *Appl Clay Sci* **96**, 9–21 (2014).
136. Sun, H., Nelson, M., Chen, F. & Husch, J. *Soil mineral structural water loss during loss on ignition analyses*.
137. Nadziakiewicz, M., Kehoe, S. & Micek, P. Physico-chemical properties of clay minerals and their use as a health promoting feed additive. *Animals* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ani9100714> (2019).
138. Galan, E. *Properties and applications of palygorskite-sepiolite clays*. *Clay Minerals* vol. 31 (1996).
139. Cao, L. *et al.* Fibrous Clays in Dermopharmaceutical and Cosmetic Applications: Traditional and Emerging Perspectives. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 625 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122097> (2022).
140. Nomicisio, C. *et al.* Natural and Synthetic Clay Minerals in the Pharmaceutical and Biomedical Fields. *Pharmaceutics* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051368> (2023).

141. Willems, M. *Adsorption of creatinine to Fuller's earth. Scand J Clin Lab Invest* vol. 50 (1990).
142. Gibbs, A. R. & Pooley, F. D. Fuller's earth (montmorillonite) pneumoconiosis. *Occup Environ Med* **51**, 644–646 (1994).
143. Macht, F., Eusterhues, K., Pronk, G. J. & Totsche, K. U. Specific surface area of clay minerals: Comparison between atomic force microscopy measurements and bulk-gas (N₂) and -liquid (EGME) adsorption methods. *Appl Clay Sci* **53**, 20–26 (2011).
144. H.H Murray. *Applied clay mineralogy Occurrences, Processing and Application of Kaolins, Bentonites, Palygorskite-Sepiolite, and Common Clays.*
145. Hua, J. Synthesis and characterization of bentonite based inorgano-organo-composites and their performances for removing arsenic from water. *Appl Clay Sci* **114**, 239–246 (2015).
146. Mishra, T. & Mahato, D. K. A comparative study on enhanced arsenic(V) and arsenic(III) removal by iron oxide and manganese oxide pillared clays from ground water. *J Environ Chem Eng* **4**, 1224–1230 (2016).
147. Kim, M. H. *et al.* Review of clay-drug hybrid materials for biomedical applications: Administration routes. *Clays Clay Miner* **64**, 115–130 (2016).
148. Pask, &, Turner ; Murray & Lyons, ; & Ovcharenko. *Applied clay mineralogy today and tomorrow.* (1955).
149. Mukhopadhyay, R., Manjaiah, K. M., Datta, S. C., Yadav, R. K. & Sarkar, B. Inorganically modified clay minerals: Preparation, characterization, and arsenic adsorption in contaminated water and soil. *Appl Clay Sci* **147**, 1–10 (2017).
150. Lenoble, V., Bouras, O., Deluchat, V., Serpaud, B. & Bollinger, J. C. Arsenic adsorption onto pillared clays and iron oxides. *J Colloid Interface Sci* **255**, 52–58 (2002).
151. Gitari, W. M., Ngulube, T., Masindi, V. & Gumbo, J. R. Defluoridation of groundwater using Fe³⁺-modified bentonite clay: optimization of adsorption conditions. *Desalination Water Treat* **53**, 1578–1590 (2015).
152. Norrish, K. *THE SWELLING OF MONTMORILLONITE.*

153. Benna, M., Kbir-Ariguib, N., Clinard, C., Bergaya, F. & Francé, F. *Static filtration of purified sodium bentonite clay suspensions. Effect of clay content. Applied Clay Science* vol. 19 www.elsevier.com/locate/clay (2001).
154. Nakato, T., Nakano, Y. & Mouri, E. Effects of sol-gel transition of clay colloids on the spectroscopic behavior of cationic dye adsorbed on the clay particles. *Appl Clay Sci* **118**, 29–37 (2015).
155. A. U Dogan, M. D. A. A. O. ,YUKSEL S. A. A. D. E. W. Baseline study of the clay minerals society sources clays: Specific surface area by the Brunauer Emmet Teller (BET) method. *Clays Clay Miner* **54**, 62–66 (2006).
156. Rautureau, M., Gomes, C. de S. F., Liewig, N. & Katouzian-Safadi, M. *Clays and health: Properties and therapeutic uses. Clays and Health: Properties and Therapeutic Uses* (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-42884-0.
157. Jlassi, K., Krupa, I. & Chehimi, M. M. Overview: Clay Preparation, Properties, Modification. in *Clay-Polymer Nanocomposites* 1–28 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-323-46153-5.00001-X.
158. Peng, X., Wang, J., Fan, B. & Luan, Z. Sorption of endrin to montmorillonite and kaolinite clays. *J Hazard Mater* **168**, 210–214 (2009).
159. Williams, L. B., Haydel, S. E. & Ferrell, R. E. Bentonite, band-aids and borborygmi. *Elements* **5**, 99–104 (2009).
160. Moosavi, M. *Bentonite Clay as a Natural Remedy: A Brief Review. Iran J Public Health* vol. 46 <http://ijph.tums.ac.ir> (2017).
161. Nadziakiewicz, M., Kehoe, S. & Micek, P. Physico-chemical properties of clay minerals and their use as a health promoting feed additive. *Animals* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ani9100714> (2019).
162. Carretero, M. I. *Clay minerals and their beneficial effects upon human health. A review.* www.elsevier.com/locate/clay.
163. Tathe, A., Ghodke, M. & Nikalje, A. P. *A brief review: Biomaterials and their application. Article in International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* <https://www.researchgate.net/publication/215564004> (2010).
164. Biswal, T., BadJena, S. K. & Pradhan, D. Sustainable biomaterials and their applications: A short review. in *Materials Today: Proceedings* vol. 30 274–282 (Elsevier Ltd, 2020).

165. Peppas, N. A. & Khare, A. R. *Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 11 (1993).
166. Buwalda, S. J. *et al.* Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release* vol. 190 254–273 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052> (2014).
167. Deligkaris, K., Tadele, T. S., Olthuis, W. & van den Berg, A. Hydrogel-based devices for biomedical applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical* vol. 147 765–774 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.snb.2010.03.083> (2010).
168. Oyen, M. L. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews* vol. 59 44–59 Preprint at <https://doi.org/10.1179/1743280413Y.0000000022> (2014).
169. Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A. & Langer, R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Advanced Materials* vol. 18 1345–1360 Preprint at <https://doi.org/10.1002/adma.200501612> (2006).
170. Patel, A. & Mequanint, K. *4 Hydrogel Biomaterials*. www.intechopen.com.
171. Van Tomme, S. R., Storm, G. & Hennink, W. E. In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 355 1–18 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.01.057> (2008).
172. Hu, Y. & Suo, Z. Viscoelasticity and poroelasticity in elastomeric gels. *Acta Mechanica Solida Sinica* **25**, 441–458 (2012).
173. Courty, S., Gornall, J. L. & Terentjev, E. M. Mechanically induced helix-coil transition in biopolymer networks. *Biophys J* **90**, 1019–1027 (2006).
174. Xiong, J. Y. *et al.* Topology evolution and gelation mechanism of agarose gel. *Journal of Physical Chemistry B* **109**, 5638–5643 (2005).
175. Bulone, D., Giacomazza, D., Martorana, V., Newman, J. & San Biagio, P. L. Ordering of agarose near the macroscopic gelation point. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* **69**, 9 (2004).
176. Peers, S., Montembault, A. & Ladavière, C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. *Journal of Controlled Release* vol. 326 150–163 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.012> (2020).

177. Borges, A. F., Silva, C., Coelho, J. F. J. & Simões, S. Oral films: Current status and future perspectives: I-Galenical development and quality attributes. *Journal of Controlled Release* vol. 206 1–19 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.006> (2015).
178. F. L Marten - Encyclopedia of polymer Science and Technology. *VINYL ALCOHOL POLYMERS*. (2002).
179. Peppas, N. A. & Benner, R. E. *Proposed method of intracordal injection and gelation of poly (vinyl alcohol) solution in vocal cords: polymer considerations*.
180. Finch, C. A. & Associates, P. *CHEMICAL MODIFICATION AND SOME CROSS-LINKING REACTIONS OF WATER-SOLUBLE POLYMERS*.
181. Jayasekara, R., Harding, I., Bowater, I., Christie, G. B. Y. & Lonergan, G. T. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films. *Polym Test* **23**, 17–27 (2004).
182. Hameed, N., Glattauer, V. & Ramshaw, J. A. M. Evaluation of polyvinyl alcohol composite membranes containing collagen and bone particles. *J Mech Behav Biomed Mater* **48**, 38–45 (2015).
183. Teodorescu, M., Bercea, M. & Morariu, S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges. *Biotechnology Advances* vol. 37 109–131 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.008> (2019).
184. Abou-Aiad, T. H. M., Abd-El-Nour, K. N., Hakim, I. K. & Elsabee, M. Z. Dielectric and interaction behavior of chitosan/polyvinyl alcohol and chitosan/polyvinyl pyrrolidone blends with some antimicrobial activities. *Polymer (Guildf)* **47**, 379–389 (2006).
185. Liu, L., Gao, Q., Lu, X. & Zhou, H. In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 11 673–683 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.001> (2016).
186. Qin, C. *et al.* Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr Polym* **63**, 367–374 (2006).
187. Phaechamud, T. & Mahadlek, J. Solvent exchange-induced in situ forming gel comprising ethyl cellulose-antimicrobial drugs. *Int J Pharm* **494**, 381–392 (2015).
188. Rowe, R. C. *The effect of the molecular weight of ethyl cellulose on the drug release properties of mixed films of ethyl cellulose and hydroxypropyl methylcellulose*. *International Journal of Pharmaceutics* vol. 29 (1986).

189. An, N. M., Kim, D. D., Shin, Y. H. & Lee, C. H. Development of a novel soft hydrogel for the transdermal delivery of testosterone. *Drug Dev Ind Pharm* **29**, 99–105 (2003).
190. Dong, Y. *et al.* *SCIENCE IN CHINA (Series B) Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra*. vol. 44 (2001).
191. Yang, W. *et al.* Polyvinyl alcohol/chitosan hydrogels with enhanced antioxidant and antibacterial properties induced by lignin nanoparticles. *Carbohydr Polym* **181**, 275–284 (2018).
192. Poonguzhali, R., Basha, S. K. & Kumari, V. S. Synthesis and characterization of chitosan-PVP-nanocellulose composites for in-vitro wound dressing application. *Int J Biol Macromol* **105**, 111–120 (2017).
193. Ammar, H. O., Ghorab, M., Mahmoud, A. A., Makram, T. S. & Ghoneim, A. M. Rapid pain relief using transdermal film forming polymeric solution of ketorolac. *Pharm Dev Technol* **18**, 1005–1016 (2013).
194. Wang, M. *et al.* Radiation synthesis of PVP/CMC hydrogels as wound dressing. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* **265**, 385–389 (2007).
195. Goosen', M. F. A. & Sefton, M. V. *Properties of a heparin-poly(vinyl alcohol) hydrogel coating*.
196. Klouda, L. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications A seven-year update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* vol. 97 338–349 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.05.017> (2015).
197. Fundueanu, G. *et al.* Poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethylacrylamide) thermosensitive microspheres: The size of microgels dictates the pulsatile release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **85**, 614–623 (2013).
198. Ward, M. A. & Georgiou, T. K. Thermoresponsive terpolymers based on methacrylate monomers: Effect of architecture and composition. *J Polym Sci A Polym Chem* **48**, 775–783 (2010).
199. Fakhari, A., Corcoran, M., Schwarz, A. & Fakhari, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon* **3**, 390 (2017).

200. Jeong, B., Kim, S. W. & Bae, Y. H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 64 154–162 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.012> (2012).
201. Cao, Y., Hui, X., Zhu, H., Elmahdy, A. & Maibach, H. In vitro human skin permeation and decontamination of 2-chloroethyl ethyl sulfide (CEES) using Dermal Decontamination Gel (DDGel) and Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL). *Toxicol Lett* **291**, 86–91 (2018).
202. Cao, Y., Hui, X., Elmahdy, A. & Maibach, H. In vitro human skin permeation and decontamination of diisopropyl methylphosphonate (DIMP) using Dermal Decontamination Gel (DDGel) and Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) at different timepoints. *Toxicol Lett* **299**, 118–123 (2018).
203. Förster, M. *et al.* Confocal raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods. *Skin Pharmacol Physiol* **24**, 103–112 (2011).
204. Salerno, A. *et al.* In vitro skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO₂. *Chem Biol Interact* **267**, 57–66 (2017).
205. Li, Y. *et al.* A Bi-Layer PVA / CMC / PEG Hydrogel with Gradually Changing Pore Sizes for Wound Dressing. **1800424**, 1–12 (2019).
206. Jiang, S., Liu, S. & Feng, W. PVA hydrogel properties for biomedical application. *J Mech Behav Biomed Mater* **4**, 1228–1233 (2011).
207. Vashisth, P. *et al.* A novel gellan-PVA nanofibrous scaffold for skin tissue regeneration: Fabrication and characterization. *Carbohydr Polym* **136**, 851–859 (2016).
208. Fang, Q. *et al.* Effect of Surfactants with Different Hydrophilic–Lipophilic Balance on the Cohesive Force between Cyclopentane Hydrate Particles. *J Mar Sci Eng* **10**, (2022).
209. Nakama, Y. Surfactants. in *Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications* 231–244 (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X.
210. Denet, E. *et al.* Metal oxide nanoparticles for the decontamination of toxic chemical and biological compounds. *Int J Pharm* **583**, (2020).
211. Yang, K. *et al.* Antimicrobial hydrogels: Promising materials for medical application. *International Journal of Nanomedicine* vol. 13 2217–2263 Preprint at <https://doi.org/10.2147/IJN.S154748> (2018).

212. Kim, J. O. *et al.* Development of polyvinyl alcohol-sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *Int J Pharm* **359**, 79–86 (2008).
213. Bogan, R., Maas, H. J. & Zimmermann, T. Chemical stability of reactive skin decontamination lotion (RSDL®). *Toxicol Lett* **293**, 264–268 (2018).
214. Pique, T. M., Pérez, C. J., Alvarez, V. A. & Vázquez, A. Water soluble nanocomposite films based on poly(vinyl alcohol) and chemically modified montmorillonites. *J Compos Mater* **48**, 545–553 (2014).
215. Dabiri, S. M. H. *et al.* Characterization of alginate-brushite in-situ hydrogel composites. *Materials Science and Engineering C* **67**, 502–510 (2016).
216. Ritz, M., Vaculíková, L., Vaculíková, V., Vaculíková, V. & Plevová, E. P. *Identification of Clay Minerals by Infrared Spectroscopy and Discriminant Analysis*.
217. Dabiri, S. M. H. *et al.* Characterization of alginate-brushite in-situ hydrogel composites. *Materials Science and Engineering C* **67**, 502–510 (2016).
218. Moody, R. P. & Maibach, H. I. Skin decontamination: Importance of the wash-in effect. *Food and Chemical Toxicology* vol. 44 1783–1788 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.05.020> (2006).
219. D. Schwartz, M., G. Hurst, C., A. Kirk, M., J.D. Reedy, S. & H. Braue, E. Reactive Skin Decontamination Lotion (RSDL) for the Decontamination of Chemical Warfare Agent (CWA) Dermal Exposure. *Curr Pharm Biotechnol* **13**, 1971–1979 (2012).
220. Salmon, D. *et al.* New easy handling and sampling device for bioavailability screening of topical formulations. *European Journal of Dermatology* **25**, 23–29 (2015).
221. James, T., Izon-Cooper, L., Collins, S., Cole, H. & Marczylo, T. The wash-in effect and its significance for mass casualty decontamination. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* vol. 25 113–134 Preprint at <https://doi.org/10.1080/10937404.2022.2042443> (2022).
222. Maibach, H. H. X. Z. H. WO2017053594A1. *World intellectual property organization* (2017).
223. Thors, L. *et al.* RSDL decontamination of human skin contaminated with the nerve agent VX. *Toxicol Lett* **269**, 47–54 (2017).

224. Salles, F. *et al.* Diffusion of Interlayer Cations in Swelling Clays as a Function of Water Content: Case of Montmorillonites Saturated with Alkali Cations. *Journal of Physical Chemistry C* **119**, 10370–10378 (2015).
225. Tazart, A., Bérard, P., Leiterer, A. & Ménétrier, F. Decontamination of radionuclides from skin: An overview. *Health Phys* **105**, 201–207 (2013).
226. Paweloszek, R. *et al.* Skin Absorption of Anions: Part Two. Skin Absorption of Halide Ions. *Pharm Res* **33**, 1576–1586 (2016).
227. Jesche, A., Fix, M., Kreyssig, A., Meier, W. R. & Canfield, P. C. X-Ray diffraction on large single crystals using a powder diffractometer. *Philosophical Magazine* **96**, 2115–2124 (2016).
228. Dorandeu, F. *et al.* 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. *Hum Exp Toxicol* **30**, 470–490 (2011).
229. Taysse, L. *et al.* 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. *Hum Exp Toxicol* **30**, 491–498 (2011).
230. Štengl, V., Králová, D., Opluštil, F. & Němec, T. Mesoporous manganese oxide for warfare agents degradation. *Microporous and Mesoporous Materials* **156**, 224–232 (2012).
231. Bandosz, T. J. *et al.* Reactions of VX, GD, and HD with Zr(OH) 4: Near instantaneous decontamination of VX. *Journal of Physical Chemistry C* **116**, 11606–11614 (2012).
232. Sharma, N. *et al.* Preparation, characterization and evaluation of the zinc titanate and silver nitrate incorporated wipes for topical chemical and biological decontamination. *Materials Science and Engineering C* **96**, 183–196 (2019).
233. Chambers, J. E. & Meek, E. C. Central neuroprotection demonstrated by novel oxime countermeasures to nerve agent surrogates. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1479 5–12 Preprint at <https://doi.org/10.1111/nyas.14352> (2020).
234. Gitari, M. W. & Mudzielwana, R. Mineralogical and Chemical Characteristics of Raw and Modified Clays and Their Application in Arsenic and Fluoride Removal: Review. in *Current Topics in the Utilization of Clay in Industrial and Medical Applications* (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.74474.

235. Gattu, S. & Maibach, H. I. Enhanced absorption through damaged skin: An overview of the in vitro human model. *Skin Pharmacology and Physiology* vol. 23 171–176 Preprint at <https://doi.org/10.1159/000288163> (2010).
236. Graham, J. S. & Schoneboom, B. A. Historical perspective on effects and treatment of sulfur mustard injuries. *Chem Biol Interact* **206**, 512–522 (2013).
237. Belhomme-Henry, C. *et al.* Texturing formulations for uranium skin decontamination. *Pharm Dev Technol* **19**, 692–701 (2014).
238. Bronaugh' And, R. L. & Stewart, R. F. *Methods for In Vitro Percutaneous Absorption Studies IV: the Flow-Through Diffusion Cell.*