

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE

ANNÉE 2008 - 2009

SÉRIE DOCTORAT N° 1031

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

M^{lle} Aurélie SPAGNUL

**DÉVELOPPEMENT D'UNE FORME PHARMACEUTIQUE VÉHICULANT UN
CALIXARÈNE DESTINÉE AU TRAITEMENT D'UNE PEAU SAINTE OU LÉSÉE
CONTAMINÉE PAR DE L'URANIUM**

Soutenue le : 16 novembre 2009

JURY :

M. Marc BENDERITTER

Rapporteur

M^{me} Marie-Alexandrine BOLZINGER

Rapporteur

M^{me} Céline BOUVIER-CAPELY

M. Elias FATTAL

M. Jean-Louis GROSSIORD

M. Bernard LE GUEN

Ce travail de thèse a été réalisé conjointement dans deux laboratoires de recherche :

UMR CNRS 8612 – Laboratoire de Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie

5 rue Jean-Baptiste Clément

92296 Châtenay-Malabry Cedex

Laboratoire de RadioChimie (LRC)

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)

Direction de la RadioProtection de l'Homme (DRPH)

Service de Dosimétrie Interne (SDI)

31 avenue de la Division Leclerc

92262 Fontenay-aux-Roses Cedex

Grâce à un financement de la Délégation Générale pour l'Armement (DGA)

J'adresse mes plus sincères remerciements

A Madame le Docteur Marie-Alexandrine Bolzinger, Maître de Conférences (Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1) et Monsieur le Docteur Marc Benderitter, Chef du Laboratoire de Radiopathologie et Thérapie Expérimentale (IRSN|DRPH|SRBE|LRTE), pour avoir consenti à être rapporteurs de cette thèse.

A Monsieur le Docteur en Médecine Bernard Le Guen, Conseiller Médical EDF, et Monsieur le Professeur Jean-Louis Grossiord, Chef du Laboratoire de Physique Pharmaceutique (Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11), pour me faire l'honneur d'être membres du jury de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Patrick Couvreur pour m'avoir accueillie à l'UMR CNRS 8612.

A Monsieur le Professeur Elias Fattal, Chef de l'Equipe V de Vectorisation de Molécules Fragiles (UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11), pour avoir accepté de diriger ma thèse ainsi que pour m'avoir conseillée et fait confiance tout au long de ces trois années.

A Monsieur le Docteur Patrick Gourmelon, Directeur de la Direction de la RadioProtection de l'Homme (IRSN|DRPH), pour m'avoir accueillie au sein de cette direction et avoir manifesté un vif intérêt pour ce sujet de thèse.

A Monsieur le Docteur Jean-René Jourdain et Monsieur Jean-Michel Deligne, respectivement ancien et actuel Chef du Service de Dosimétrie Interne (IRSN|DRPH|SDI), ainsi qu'à Madame le Docteur Michèle Agarande, Adjointe au Chef du SDI, pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse dans des conditions optimales. Qu'ils soient également remerciés pour leur sympathie, leurs encouragements et leur soutien.

A Monsieur le Docteur François Rebière, Chef du Laboratoire de RadioChimie (IRSN/DRPH/SDI/LRC), pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de cette thèse. Merci également de m'avoir fait confiance et de m'avoir conseillée et motivée durant ces trois années.

A Madame le Docteur Céline Bouvier-Capely, Chercheur au LRC (IRSN), qui a beaucoup contribué à ce travail de thèse par ses idées, son investissement, son encadrement chaleureux et sa présence quotidienne à mes côtés.

*A Monsieur le Docteur Guillaume Phan, Chercheur au LRC (IRSN), pour son implication dans ce sujet de thèse et pour m'avoir assistée dans les expérimentations *ex vivo* menées sur les explants de peau d'oreille de porc. Merci également pour ton enthousiasme, ta bonne humeur et ta sympathie.*

*A Madame le Docteur Géraldine Landon, Chercheur au LRC (IRSN), pour s'être intéressée à ce sujet de recherche et pour avoir accepté de contribuer à ces travaux de thèse en complétant les expérimentations *ex vivo*. Merci également pour ta gentillesse.*

A Madame le Docteur Christine Fessier et Monsieur David Suhard, Chercheurs au LRC (IRSN), pour leur participation à ce travail de thèse, notamment par la réalisation des images ioniques SIMS des explants de peau. Merci de votre patience, de votre investissement et de votre disponibilité.

A Madame le Docteur Madeleine Besnard (Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11) pour m'avoir formée avec rigueur et gentillesse aux techniques de mesure de taille d'échantillons dispersés ainsi qu'au prélèvement des explants de peau d'oreille de porc.

A Madame Eléonore Jouanny et Monsieur le Docteur Nicolas Huang, du Laboratoire de Physique Pharmaceutique (Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11), pour leur sympathie et le temps qu'ils ont bien voulu accorder pour me former à la technique de mesure de tension interfaciale.

A Monsieur le Professeur Michel Manfait, Monsieur le Docteur Ali Ffayli (Unité MéDIAN, UMR CNRS 6142, Université de Reims Champagne-Ardenne) et Madame le Professeur Arlette Baillet-Guffroy (Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11) pour leur collaboration et les expérimentations de microscopie confocale Raman qu'ils ont accepté de mener sur les explants de peau d'oreille de porc.

A toute l'Equipe V (UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud 11), en particulier à Madame le Docteur Amélie Bochot, Monsieur le Docteur Nicolas Tsapis, Laure, Emilia, Simona, Franceline, Helder et Mouhamad, pour leurs conseils, leur amitié et leur soutien.

A Madame le Docteur Isabelle Dublineau, Chef du Laboratoire de Radiotoxicologie Expérimentale (IRSN/DRPH/SRBE/LRTOX) et Monsieur le Docteur Maâmar Souidi, Chercheur au LRTOX, pour m'avoir permis de réaliser les expérimentations d'ultrafiltration dans leur laboratoire.

A Monsieur le Docteur Fabrice Petitot, Chercheur au LRTOX (IRSN), pour s'être intéressé à mon travail de thèse et pour les échanges que nous avons eus sur le sujet. Merci également pour les « tuyaux » concernant le fonctionnement des cellules de Franz ainsi que pour m'avoir initiée à la technique dite du tape stripping.

A Madame le Docteur Valérie Buard et Madame Cécile Martin du LRTE (IRSN) pour m'avoir formée à la cryotomie, au traitement et à la coloration des coupes de peau ainsi que pour m'avoir permis de réaliser ces manipulations au sein de ce laboratoire.

A Messieurs les Docteurs en Médecine Alain Acker, Stéphane Henry et Bernard Auriol, du groupe AREVA, pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail de thèse ainsi que pour leurs conseils et encouragements.

A tout le sympathique personnel du Laboratoire d'Evaluation de la Dose Interne (IRSN|DRPH|SDI|LEDI) et particulièrement à ses anciens et actuels doctorants : Stéphanie, Lama, Estelle et Jad, pour leur sympathie et leur soutien.

A Juliette, secrétaire du Service de Dosimétrie Interne (IRSN|SDI), pour son accueil chaleureux, son sourire et sa constante bonne humeur. Merci également de m'avoir aidée dans les démarches administratives.

A toutes les personnes composant l'équipe du LRC (IRSN) que je n'ai pas encore citées : Annabelle, Alexandre, Jean-Philippe, Soufiane, Olivia, Marc et Riad. Merci pour votre accueil, votre collaboration, votre soutien, votre gentillesse et vos attentions. Ce fût un véritable plaisir d'évoluer à vos côtés durant ces trois années de thèse dans une atmosphère plus qu'agréable !

Côté perso...

A Norma, Florent et Christophe, mes « amis de Paris », pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble et ceux à venir.

A Stéphanie, qui m'a écoutée avec patience parler de mes petites misères et qui m'a accompagnée durant mon périple de thèse.

A Patricia, ma meilleure amie qui habite à des centaines de kilomètres de moi et qui n'a jamais refusé de décrocher le combiné pour m'entendre geindre ! Je te remercie de ton écoute, de tes conseils et de ton soutien. Merci également pour les deux petites filleules, Callia et Cristalia, que tu as fait naître durant ma thèse et que je n'ai pas eu le plaisir de voir assez souvent...

A Maria, une amie de valeur. Je te remercie pour toutes les discussions et tous les agréables moments que nous avons partagés. Merci également à sa petite famille, Myriam, Alexis et Mohamed, qui m'a toujours accueillie dans la joie et la bonne humeur.

A Vincenzo qui a partagé avec moi les bons moments durant ces trois années de thèse et qui m'a aidée à traverser les mauvais. Merci de ta présence, de ton soutien sans faille, de tes nombreux et toujours avisés conseils... En un mot, merci de ton amitié qui m'est si précieuse.

A mes grand-mères qui m'ont toujours soutenue.

A mes parents pour leur présence, leur soutien et leur amour.

INTRODUCTION GENERALE	4
TRAVAUX ANTERIEURS	
CHAPITRE I. LES RISQUES LIES A L'EXPOSITION A L'URANIUM DANS L'INDUSTRIE NUCLEAIRE...9	
I.1. Présentation de l'élément uranium	9
I.1.1. Généralités	9
I.1.2. Principales propriétés chimiques	10
I.1.3. Principales propriétés physiques.....	13
I.2. L'uranium dans l'industrie nucléaire	14
I.2.1. La fission nucléaire et ses applications.....	14
I.2.2. La production nucléaire d'énergie électrique : le cycle du combustible nucléaire.....	15
I.3. Les risques liés à l'emploi de l'uranium dans l'industrie nucléaire.....	19
I.3.1. Les voies d'atteinte de l'homme : distinction entre exposition externe et contamination....	19
I.3.2. Les modes de contamination interne	20
I.4. Eléments de toxicologie de l'uranium	21
I.4.1. Biocinétique de l'uranium	21
<i>I.4.1.1. Entrée dans l'organisme.....</i>	<i>21</i>
<i>I.4.1.2. Transport dans la circulation sanguine.....</i>	<i>22</i>
<i>I.4.1.3. Rétention dans les organes cibles.....</i>	<i>23</i>
<i>I.4.1.4. Excrétion.....</i>	<i>25</i>
I.4.2. Toxicités chimique et radiologique.....	26
I.5. Surveillance du personnel nucléaire et prise en charge des contaminations.....	28
I.5.1. Surveillance des travailleurs	28
I.5.2. Prise en charge du personnel en cas de contamination par l'uranium	29
CHAPITRE II. LA CONTAMINATION CUTANEE PAR L'URANIUM	33
II.1. La peau humaine.....	33
II.1.1. Structure	33
II.1.2. Absorption percutanée.....	38
<i>II.1.2.1. La couche cornée : barrière de la peau</i>	<i>38</i>
<i>II.1.2.2. Les voies de pénétration cutanée.....</i>	<i>39</i>
<i>II.1.2.3. La cinétique de diffusion percutanée.....</i>	<i>40</i>
<i>II.1.2.4. Les facteurs affectant l'absorption cutanée</i>	<i>42</i>
II.2. Les modèles d'étude de la diffusion transdermique	46
II.2.1. Modèles <i>in vivo</i>	46
II.2.2. Modèles <i>ex vivo</i>	47
II.2.3. Modèles <i>in vitro</i>	50

II.3. Physiologie de la contamination cutanée par l'uranium	51
II.3.1. L'absorption cutanée de l'uranium.....	51
II.3.1.1. Absorption cutanée de l'uranium à travers la peau intacte	51
II.3.1.2. Passage percutané de l'uranium en cas de blessure.....	57
II.3.2. Le modèle biocinétique de la contamination cutanée par l'uranium.....	66
II.4. Innovations récentes dans le traitement d'urgence spécifique de la contamination cutanée par l'uranium	68
CHAPITRE III. LE 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-<i>p</i>-tertBUTYLCALIX[6]ARENE : UN CHELATEUR D'INTERET DANS LE SECTEUR NUCLEAIRE.....	74
III.1. Présentation générale de la famille des calixarènes	74
III.1.1. Définitions et structure	74
III.1.2. Applications	76
III.2. Le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-<i>p</i>-tertbutylcalix[6]arène.....	77
III.2.1. Formule	77
III.2.2. Chélation de l'uranium.....	79
III.2.3. Utilisation en analyse radiotoxicologique.....	80
III.3. Intérêt du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-<i>p</i>-tertbutylcalix[6]arène en décontamination cutanée.....	80
CONCLUSION	82
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I. CONCEPTION ET CARACTERISATION D'UNE FORME GALENIQUE DESTINEE A L'USAGE CUTANE VEHICULANT LE 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-<i>p</i>-tertBUTYLCALIX[6]ARENE & EVALUATION DU POTENTIEL DE CETTE FORME POUR LA DECONTAMINATION D'UNE SOLUTION CHARGEE EN URANIUM.....	98
Publication 1 : Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium extraction from contaminated solutions	100
Abstract	101
Introduction.....	102
Materials and methods	103
Results and discussion	105
Conclusion and perspectives	114
References	115

CHAPITRE II. EVALUATION <i>IN VITRO</i> DE L'EFFICACITE DE LA NANOEMULSION DE CALIXARENE POUR L'EXTRACTION DE L'URANIUM DEPUIS UNE SOLUTION CONTAMINEE & ETUDE DES PARAMETRES INFLUENÇANT CETTE EFFICACITE	118
Publication 2 : Quick and efficient extraction of uranium from a contaminated solution by a calixarene nanoemulsion	120
Abstract	121
Introduction.....	122
Materials and methods	122
Results and discussion	125
Conclusion and perspectives	132
References	133
CHAPITRE III. EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA NANOEMULSION DE CALIXARENE COMME TRAITEMENT DE LA CONTAMINATION CUTANEE : ETUDE <i>EX VIVO</i> SUR DES EXPLANTS DE PEAU D'OREILLE DE PORC INTACTE OU LESEE CONTAMINES PAR DE L'URANIUM	135
Publication 3 : <i>Ex vivo</i> reduction of uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene nanoemulsion	137
Abstract	138
Introduction.....	139
Materials and methods	140
Results	144
Discussion	151
Conclusion and perspectives	155
References	156
CHAPITRE IV. VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE	160
Publication 4 : A new formulation containing calixarene molecules as an emergency treatment of uranium skin contamination.....	162
Abstract	163
Introduction.....	164
Materials and methods	165
Results and discussion	167
Conclusion and perspectives	170
References	172
Brevet : Formulations pharmaceutiques de molécules de calix[6]arènes pour le traitement de contaminations cutanées par des actinides	174
DISCUSSION GENERALE.....	175
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	192

INTRODUCTION GENERALE

La contamination par voie cutanée représente le second mode de contamination des travailleurs de l'industrie nucléaire, après l'inhalation. La contamination cutanée par l'uranium, radioélément constituant le combustible de la plupart des réacteurs nucléaires producteurs d'énergie électrique, peut conduire à une forte exposition interne des individus après transfert du radioélément de la zone cutanée contaminée vers la circulation sanguine. Après distribution dans l'organisme *via* la circulation systémique, une partie de l'uranium ainsi incorporé est retenue au niveau de deux principaux organes qui sont les reins et le squelette, où vont se manifester ses toxicités chimique et radiologique, et l'autre partie est excrétée par la voie urinaire. Le traitement actuel de la contamination cutanée par l'uranium débute par un simple rinçage de la zone contaminée qui peut être réalisé sur le lieu de l'accident. Après transfert de la victime au service médical du centre nucléaire, un traitement décorporant visant à accélérer l'excrétion urinaire du radioélément est administré par voie intraveineuse. Malheureusement, les décorporants actuellement employés sont peu efficaces pour éliminer l'uranium incorporé et aucun traitement n'est disponible pour limiter l'entrée du radionucléide dans l'organisme durant le transfert de la victime au service médical.

Afin d'améliorer la prise en charge des victimes, de nouveaux traitements sont aujourd'hui à l'étude. En effet, de nombreux travaux ayant pour objectif de synthétiser des agents décorporants plus affins de l'uranium ont été menés et de nouveaux traitements d'urgence applicables sur la peau contaminée ont été très récemment développés. Cependant, aucune de ces études n'a permis d'aboutir, à l'heure actuelle, à la mise au point d'un système efficace pour le traitement de la contamination cutanée par l'uranium.

Dans ces travaux de thèse, la stratégie adoptée a consisté à mettre au point un traitement local de la contamination cutanée par l'uranium permettant de piéger le radioélément au niveau de la zone cutanée contaminée et donc de réduire son transfert vers la circulation sanguine. Le traitement qui a été développé est basé sur l'utilisation d'un chélateur de l'uranium de la famille des calixarènes, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène. Nous avons en effet souhaité mettre à profit dans cette étude les propriétés chélatantes et la forte affinité vis-à-vis de l'uranium de cette molécule initialement développée pour l'analyse radiotoxicologique des urines dans le cadre de la surveillance médicale des travailleurs de l'industrie nucléaire.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de développer une formulation contenant ce calixarène tricarboxylique qui soit destinée à l'application cutanée. L'enjeu était de trouver une forme pharmaceutique permettant de solubiliser ce calixarène très hydrophobe et se trouvant à l'état solide à température ambiante tout en le rendant disponible pour la chélation de l'uranium présent dans une solution aqueuse. Le système qui a été retenu est une émulsion de type huile dans eau, plus précisément une nanoémulsion. Le second objectif de ce travail a consisté à évaluer l'efficacité de la nanoémulsion de calixarène en tant que traitement de la contamination cutanée par l'uranium.

Pour ce faire, nous avons dans un premier temps étudié *in vitro* la capacité de la nanoémulsion de calixarène à extraire les ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée. L'efficacité de décontamination cutanée de la nanoémulsion de calixarène a ensuite été évaluée *ex vivo* sur des explants de peau d'oreille de porc en cellule de diffusion. Les accidents de contamination cutanée pouvant se produire aussi bien sur une peau intacte que sur une blessure, l'étude *ex vivo* a été menée sur des biopsies de peau intacte et sur un modèle de peau lésée obtenu par excoriation.

Ce manuscrit de thèse se compose de deux parties :

- La première partie, basée sur une étude bibliographique, expose les risques engendrés par une contamination cutanée par l'uranium ainsi que les traitements actuels ou en cours de développement. L'intérêt du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène en tant que chélateur de l'uranium pour le traitement des contaminations cutanées par ce radioélément y est également discuté.
- La seconde partie du manuscrit présente quant à elle, en quatre chapitres, les travaux de recherche qui ont été menés au cours de cette thèse :
 - Le chapitre I présente la nanoémulsion de type huile dans eau qui a été développée pour véhiculer le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène en vue d'une application cutanée. Dans ce chapitre consacré à la préparation et la caractérisation physico-chimique de cette forme, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de la disponibilité des molécules de calixarène véhiculées par la nanoémulsion pour la chélation de l'uranium.
 - Le chapitre II est consacré, comme travail préliminaire à toute étude sur la peau, à l'évaluation *in vitro* de l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène sur une solution aqueuse contaminée par de l'uranium. Les principaux paramètres susceptibles d'influer sur cette efficacité y ont été étudiés afin de déterminer les conditions optimales d'utilisation de la nanoémulsion de calixarène.
 - Dans le chapitre III, l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène est évaluée *ex vivo* sur des explants de peau d'oreille de porc contaminés par une solution d'uranium. Cette étude a été menée sur la peau intacte et sur un modèle de peau lésée réalisé par excoriation.
 - Le chapitre IV regroupe les principales valorisations dont ce travail de thèse a fait l'objet : une publication faisant suite à la présentation des travaux de thèse lors d'un congrès international et une demande de dépôt de brevet.

Finalement, nous présenterons une discussion et une conclusion générale de l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse ainsi que les perspectives qui peuvent être envisagées pour la poursuite de ce travail.

TRAVAUX ANTERIEURS

Chapitre I. Les risques liés à l'exposition à l'uranium dans l'industrie nucléaire

L'uranium est actuellement au cœur des développements scientifiques et technologiques réalisés dans le cadre de l'utilisation civile de l'énergie nucléaire de fission et des débats sur l'avenir du nucléaire.

Ce chapitre dédié à la présentation de l'uranium s'attache à décrire sa présence dans l'environnement, sa chimie et son utilisation comme élément combustible des réacteurs.

I.1. Présentation de l'élément uranium

I.1.1. Généralités

L'uranium a été découvert en 1789 par le chimiste allemand Martin Heinrich Klaproth et la radioactivité naturelle de cet élément fut découverte en 1896 par le physicien français Henri Becquerel.

L'uranium est un élément de symbole U et de numéro atomique $Z = 92$ appartenant à la famille des actinides. C'est un métal gris, dur et très dense naturellement présent dans l'environnement. On le trouve en quantités variables dans les sols, les roches, l'eau, l'air et les organismes vivants. A titre d'exemple, la quantité moyenne d'uranium contenue dans le corps humain est d'environ 90 μg . Afin de donner un ordre de grandeur des concentrations en uranium naturellement présentes dans l'environnement, quelques données chiffrées ont été regroupées dans le tableau 1.

Matrice environnementale	Concentration en uranium ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Eaux minérales (France)	$1\cdot 10^{-6}$ à 0,077
Eaux de rivières/mares (France sud-ouest)	$1\cdot 10^{-5}$ à $8\cdot 10^{-5}$
Fruits	$2,4\cdot 10^{-4}$
Céréales	$1,6\cdot 10^{-3}$
Légumes verts	$1,6\cdot 10^{-3}$
Eau de mer	$3\cdot 10^{-3}$
Roche basaltique	0,5
Sol calcaire	1
Ecorce terrestre	2
Roche granitique	5
Gisement uranifère	10 000

Tableau 1. Concentrations en uranium rencontrées dans diverses matrices environnementales exprimées en milligramme par kilogramme de matière (Ansoborlo *et al.* 2002).

I.1.2. Principales propriétés chimiques

L'uranium élémentaire est une substance extrêmement réactive, capable de former des composés avec la plupart des éléments de la classification périodique. De par sa forte électropositivité, l'uranium présente une affinité marquée pour l'oxygène et ne se rencontre naturellement que dans des composés oxygénés (Bonin *et al.* 2001, Madic *et al.* 2001). L'uranium n'existe donc pas dans la nature à l'état de métal chimiquement pur, ni en alliage.

La présente étude portant sur le traitement des contaminations cutanées ou des blessures contaminées par des solutions d'uranium, ce paragraphe résume les principales propriétés de l'uranium en solution aqueuse afin de bien appréhender le comportement de cet élément dans ce milieu.

En phase aqueuse, l'uranium peut exister sous quatre états d'oxydation compris entre III et VI. L'état d'oxydation le plus stable est l'uranium (VI). En effet, l'uranium (III) (U^{3+}) est oxydé par les protons et les molécules d'eau et le degré d'oxydation V (UO_2^+) est thermodynamiquement instable vis-à-vis de la dismutation. Quant à l'état d'oxydation IV (U^{4+}), il est le plus courant en condition réductrice, mais la solubilité de l'uranium sous cette forme est faible.

En fonction du pH de la solution aqueuse, diverses espèces de l'élément uranium peuvent être observées. En effet, les ions uranium sont hydrolysés lors de l'accroissement du pH d'une solution acide d'uranium. L'aptitude des ions uranium à l'hydrolyse décroît selon la séquence $U(IV) > U(VI) > U(III) > U(V)$, les données relatives à U(III) et U(V) étant plutôt de nature qualitative de par la difficulté de l'étude de ces états d'oxydation instables.

Les propriétés thermodynamiques des ions uranium en solution énoncées ci-dessus sont rassemblées sur le diagramme de Pourbaix (figure 1). Ce dernier permet de définir les domaines de stabilité thermodynamique de chaque espèce en fonction du potentiel des couples oxydant-réducteur mis en jeu et du pH de la solution. On y retrouve la prédominance du domaine d'existence de $U(VI)_{aq}$ ainsi que l'instabilité thermodynamique de $U(III)_{aq}$ et $U(V)_{aq}$. D'après ce diagramme, en milieu aqueux non complexant et non réducteur, les ions uranium demeurent donc sous la forme d'ions uranyle UO_2^{2+} hydratés de formule $UO_2(H_2O)_5^{2+}$ tant que le pH de la solution est inférieur à 5.

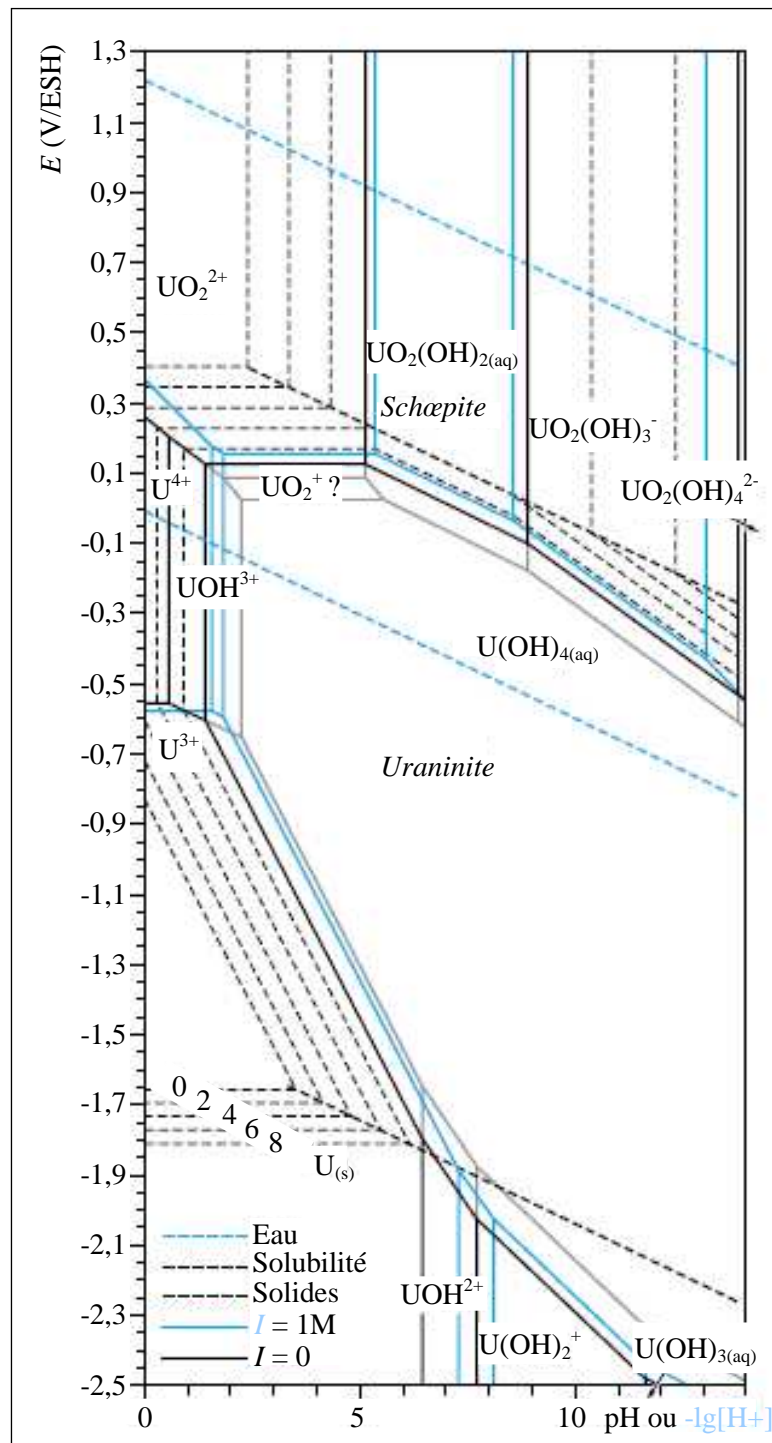


Figure 1. Diagramme de Pourbaix de l'uranium en milieu aqueux non complexant pour une concentration en uranium égale à $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$.

La *schæpïte* correspond à $\text{UO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}_{(s)}$ et l'*uraninite* à $\text{UO}_{2(s)}$ (Vitorge 1999).

La chimie de ces ions uranyle concerne principalement le remplacement des molécules d'eau d'hydratation par des ligands compétiteurs au niveau du plan équatorial du motif linéaire actinyle $\text{O}=\text{U}=\text{O}$. Plus généralement, les ions uranium étant considérés comme des « acides durs » au sens de Pearson, ils réagissent préférentiellement avec des « bases dures » que sont par exemple

les ligands comportant des atomes donneurs d'électron tels que l'oxygène et le fluor. L'interaction d'un ligand avec les ions uranium est généralement plus forte avec U(IV) qu'avec U(VI), peu de ligands ayant été observés avec les ions U(III) et U(V) étant donné leur faible stabilité thermodynamique. Les stabilités de quelques complexes formés entre les ions uranyle UO_2^{2+} , qui pour rappel sont les ions les plus couramment rencontrés en solution, et certains ligands inorganiques et organiques sont présentées dans le tableau 2.

Ligands		Complexes d'uranium (VI) ($\log\beta$) *	
Inorganiques	F ⁻	UO_2F^+	(5,09)
		$\text{UO}_2\text{F}_{2(\text{aq})}$	(8,62)
		UO_2F_3^-	(10,9)
		$\text{UO}_2\text{F}_4^{2-}$	(11,7)
	Cl ⁻	$\text{UO}_2(\text{Cl}_2)_{(\text{aq})}$	(-1,20)
		UO_2Cl^+	(0,17)
	CO ₃ ²⁻	$\text{UO}_2(\text{CO}_3)_{(\text{aq})}$	(9,67)
		$\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$	(16,94)
		$\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$	(21,6)
	SO ₄ ²⁻	$\text{UO}_2(\text{SO}_4)_2^{2-}$	(1,14)
		$\text{UO}_2(\text{SO}_4)_{(\text{aq})}$	(3,15)
	Phosphate	$\text{UO}_2(\text{PO}_4)^-$	(13,23)
		$\text{UO}_2(\text{H}_2\text{PO}_4)^+$	(1,12)
		$\text{UO}_2(\text{HPO}_4)_{(\text{aq})}$	(7,24)
	Organiques	Acétate (L ⁻)	UO_2L^+
UO_2L_2			(4,36)
UO_2L^{3-}			(6,34)
Transferrine (Tf)		$(\text{UO}_2)_2\text{Tf}$	(16)

* β : constante de formation du complexe ion(s) uranyle-ligand(s)

Tableau 2. Stabilité de quelques complexes formés entre les ions uranyle UO_2^{2+} et certains ligands inorganiques et organiques (Grenthe *et al.* 1992, Vitorge 1999, Madic *et al.* 2001).

I.1.3. Principales propriétés physiques

Les dix-sept isotopes de l'uranium identifiés à ce jour sont tous radioactifs, ce qui signifie que ces noyaux atomiques instables se désintègrent spontanément en dégageant de l'énergie sous forme de particules (α , β) et/ou de rayonnements (γ , X) (figure 2). Seuls trois de ces dix-sept isotopes existent à l'état naturel et composent l'uranium tel qu'il est extrait de son minerai ; ce sont les isotopes ^{238}U , ^{235}U et ^{234}U qui sont respectivement présents en proportion massique moyenne de 99,275 %, 0,720 % et 0,005 % (Bonin *et al.* 2001).

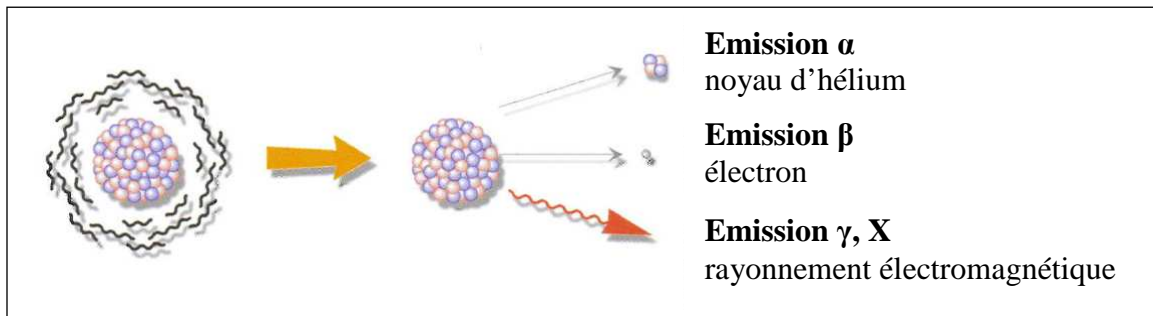


Figure 2. La radioactivité : désintégration d'un noyau instable s'accompagnant de l'émission de rayonnements et/ou de particules (Delacroix *et al.* 2006).

Les principales propriétés nucléaires des trois isotopes de l'uranium naturel sont résumées dans le tableau 3. Ces isotopes radioactifs se désintègrent principalement par émission α (noyau d'hélium ^4_2He), la désintégration par fission spontanée étant également possible mais moins probable. De ces trois isotopes, seuls ^{238}U et ^{235}U sont primordiaux, ce qui signifie qu'ils existent depuis l'origine de la terre, ^{234}U étant quant à lui un produit de la décroissance de ^{238}U .

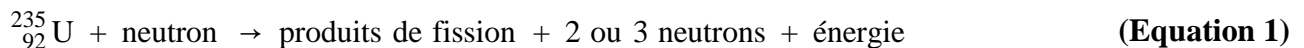
Isotope	Abondance (masse %)	Période radioactive (an)	Activité massique ($\text{Bq}\cdot\text{g}^{-1}$)	Part dans l'activité totale de U naturel (%)	Emissions principales par désintégration (keV) (rendements d'émission %)
^{234}U	0,0054	$2,46\cdot 10^5$	$2,30\cdot 10^8$	49,5	α 4 774,6 (71,37) ; 4 722,4 (28,42) γ 53,20 (0,1253) X 15,3 (10,2)
^{235}U	0,7110	$7,04\cdot 10^8$	$8,00\cdot 10^4$	2,3	α 4 397,8 (55) ; 4 366 (17) γ 185,72 (57,2) X 15,75 (51)
^{238}U	99,2836	$4,47\cdot 10^9$	$1,24\cdot 10^4$	48,2	α 4 198 (77,5) ; 4 151 (22,3) γ 49,55 (0,0697) X 15,31 (7,94)

Tableau 3. Les principales propriétés nucléaires des trois isotopes de l'uranium naturel (Aigueperse *et al.* 2001, Garnier-Laplace *et al.* 2001, LNHB 2007).

I.2. L'uranium dans l'industrie nucléaire

I.2.1. La fission nucléaire et ses applications

L'isotope ^{235}U est le seul des trois isotopes composant l'uranium naturel à présenter la particularité d'être susceptible de subir la fission nucléaire, c'est pourquoi on le qualifie de fissile. En effet, sous l'impact d'un neutron (particule constitutive du noyau atomique dépourvue de charge électrique), le noyau de ^{235}U se scinde en deux noyaux plus petits appelés produits de fission. La réaction de fission s'accompagne d'un dégagement important d'énergie ainsi que de la libération de deux ou trois neutrons (équation 1).



L'énergie dégagée lors de cette réaction est en grande partie emportée par les produits de fission qui sont alors éjectés avec une très grande vitesse. Ces derniers sont ralentis par des chocs successifs avec les atomes avoisinants et s'arrêtent au bout de quelques dizaines de micromètres. Les neutrons produits peuvent à leur tour provoquer la fission d'autres noyaux de ^{235}U et la création de nouvelles quantités d'énergie ainsi que la libération de nouveaux neutrons et ainsi de suite, aboutissant ainsi à une réaction en chaîne.

C'est sur cette réaction en chaîne que repose la production d'électricité par les réacteurs nucléaires. En effet, l'énergie dissipée sous forme de chaleur lors de la réaction en chaîne est récupérée et transformée en électricité par des turbines à vapeur. Afin de libérer régulièrement de l'énergie et éviter un emballement du réacteur, la réaction en chaîne est contrôlée en stabilisant le nombre de fissions simultanées par capture d'un certain nombre de neutrons excédentaires.

Bien que les noyaux des deux autres isotopes de l'uranium naturel ^{234}U et ^{238}U soient trop stables pour subir la fission, ^{238}U présente tout de même un intérêt pour la production nucléaire d'énergie électrique. En effet, le noyau de ^{238}U est capable de capturer un neutron, ce qui conduit à sa transmutation en noyau de plutonium ^{239}Pu qui lui est fissile et donc susceptible de produire de l'énergie de la même façon que ^{235}U (Viala 2001).

La seconde principale application de la fission de ^{235}U est l'armement nucléaire. Le principe de la bombe atomique repose cette fois sur le fait que la réaction en chaîne doit s'emballer pour libérer instantanément un maximum d'énergie.

I.2.2. La production nucléaire d'énergie électrique : le cycle du combustible nucléaire

La France est dotée d'un parc de 58 réacteurs nucléaires répartis sur 19 sites (figure 3) permettant, selon les chiffres de fin 2007, la production de 76,9 % de la production totale d'électricité du pays (CEA 2008).

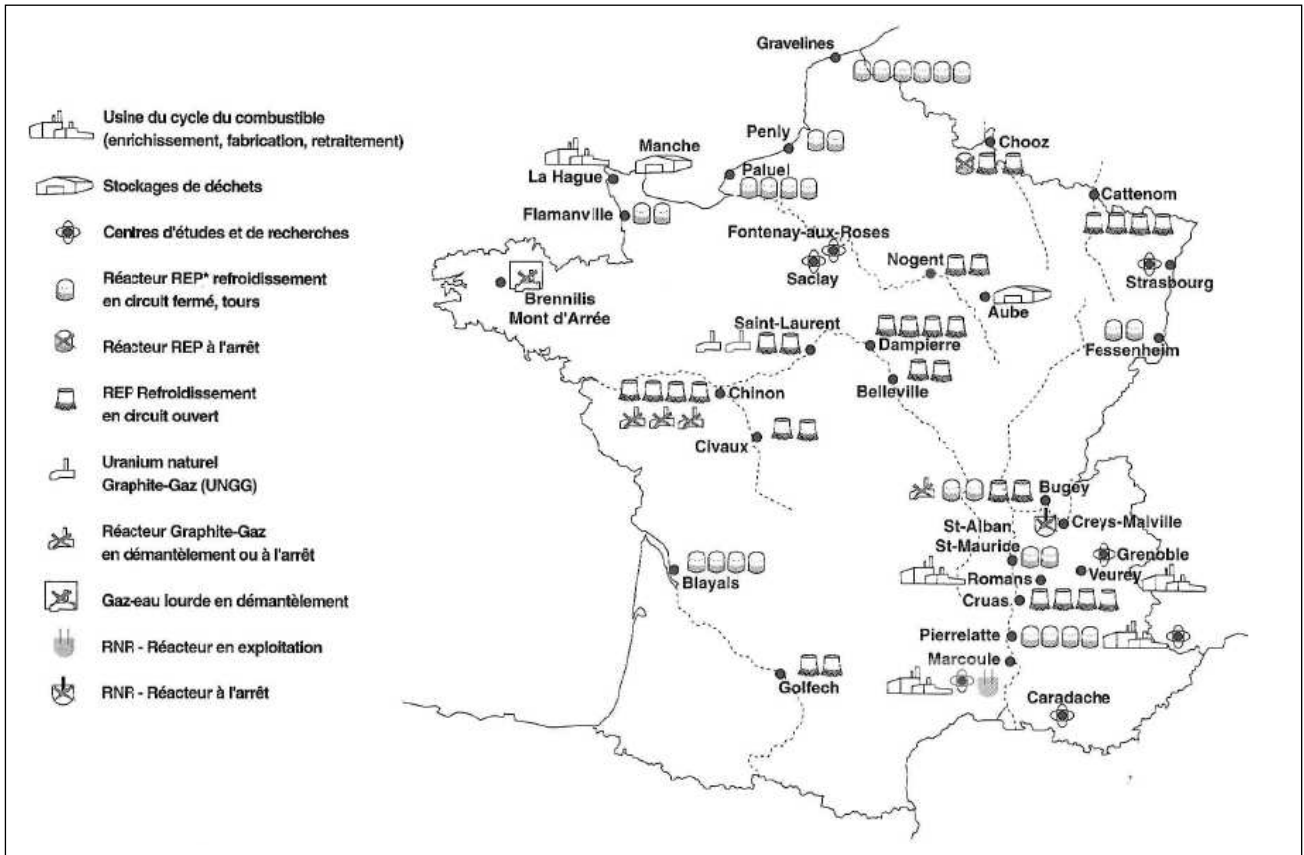


Figure 3. Carte des sites nucléaires industriels français (Viala 2001).

L'ensemble des opérations nécessaires pour approvisionner les réacteurs nucléaires en combustible nucléaire puis pour stocker, retraiter et recycler ce combustible est appelé le cycle du combustible nucléaire (figure 4). L'étude des étapes de ce cycle proposée dans ce chapitre va permettre d'appréhender la diversité des composés industriels d'uranium qui y sont produits.

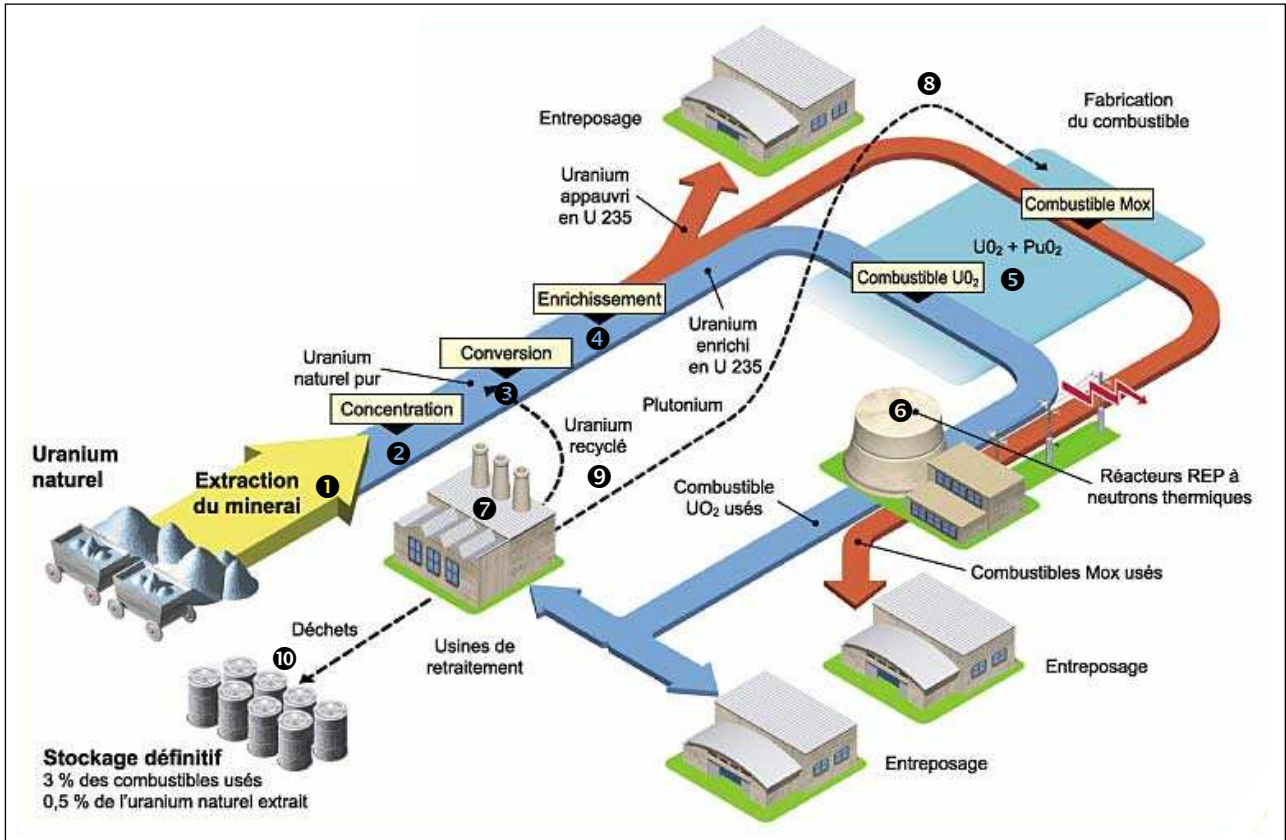


Figure 4. Le cycle du combustible nucléaire actuel en France (CEA1).

Le cycle du combustible nucléaire débute par l'exploitation de minerais contenant de l'uranium appelés minerais uranifères (uraninite, schœpite, pechblendé...) (étape ❶, figure 4). La teneur moyenne en uranium dans les minerais de l'écorce terrestre est de 3 grammes par tonne et elle est extrêmement variable d'un sol à l'autre.

La teneur en uranium dans les minerais extraits étant relativement faible, une étape de concentration de l'uranium est nécessaire (étape ❷, figure 4) : les roches extraites des mines sont concassées et broyées, puis l'uranium est extrait par une solution chimique (le plus souvent de l'acide sulfurique dilué). La solution contenant l'uranium est ensuite traitée afin de précipiter l'uranium sous forme de sel. Le concentré obtenu se présente sous la forme d'une pâte jaune appelée « yellow cake » (figure 5) qui contient environ 75 % d'oxyde d'uranium en masse. Le « yellow cake » ne présentant pas un degré de pureté nucléaire suffisant, il est purifié (étape ❸, figure 4) et transformé en un composé solide chimiquement pur appelé diuranate d'ammonium ($U_2O_7(NH_4)_2$).

La proportion massique en ^{235}U , seul isotope naturel de l'uranium pouvant subir la fission nucléaire, n'est à ce stade pas suffisante (0,7 %) pour alimenter les réacteurs. En effet, dans le cas des réacteurs à eau sous pression (REP), la proportion en ^{235}U doit se situer entre 3 et 5 %. L'opération consistant à augmenter la teneur en ^{235}U est appelée enrichissement (étape ❹, figure 4). L'enrichissement nécessite une conversion préalable de l'uranium en hexafluorure d'uranium (UF_6)

qui présente la particularité de se trouver à l'état gazeux dès la température de 56°C. Au cours des divers traitements chimiques de la conversion, l'uranium passe par les formes chimiques UO_2 , UO_3 et UF_4 . L'étape d'enrichissement en elle-même est difficile car ^{238}U (isotope majoritairement présent en masse) et ^{235}U ont des propriétés physico-chimiques très similaires et ne se distinguent légèrement que par leurs masses respectives. C'est précisément sur cette différence de masse entre ces deux radioisotopes que sont basés les procédés industrialisés permettant l'enrichissement en ^{235}U que sont la diffusion gazeuse et la centrifugation.

L'hexafluorure d'uranium issu de l'étape d'enrichissement est ensuite transformé en poudre d'oxyde d'uranium (UO_2) et conditionné en petites pastilles cylindriques. Ces pastilles sont empilées dans des tubes métalliques appelés crayons. Les crayons sont ensuite assemblés et constituent ainsi le combustible nucléaire (figure 6) (étape 5, figure 4). Le cœur du réacteur nucléaire est alors chargé avec plusieurs assemblages de crayons.



Figure 5. Le yellow cake (ASN).



Figure 6. Le combustible nucléaire (EDF).

Au cours de son utilisation (étape 6, figure 4), le combustible subit des transformations qui le rendent moins performant : diminution de la teneur en ^{235}U fissile, formation de plutonium suite au bombardement de ^{238}U par les neutrons et apparition de déchets sous forme de produits de fission qui perturbent la réaction en chaîne en absorbant des neutrons (ASN, CEA1). De nouveaux isotopes de l'uranium tels que ^{236}U apparaissent également au cours de l'utilisation du combustible. Le combustible qui est retiré du réacteur après une période de 3 à 4 ans d'exploitation contient environ 97 % de matière énergétique récupérable sous forme d'uranium (majoritairement ^{238}U et 1% de ^{235}U n'ayant pas subi la fission) ou de plutonium et 3 % de déchets. Le combustible utilisé étant très radioactif en raison de la présence des produits de fission, il est temporairement stocké dans des

piscines remplies d'eau afin de laisser diminuer son activité, l'eau protégeant des rayonnements. Cette étape sert également à refroidir le combustible utilisé car les atomes radioactifs qui le constituent dégagent beaucoup de chaleur lors de leur désintégration. Le combustible utilisé est ensuite transporté dans des usines de retraitement.

Dans les usines de retraitement (étape ⑦, figure 4), la matière encore utilisable pour la production d'électricité, constituée par le plutonium et l'uranium, est récupérée par divers traitements mécaniques et chimiques. Le plutonium issu du retraitement est utilisé pour fabriquer un nouveau combustible appelé MOX (étape ③, figure 4) constitué d'un mélange de poudres d'oxyde d'uranium (UO₂) appauvri en ²³⁵U (provenant essentiellement des usines d'enrichissement de l'uranium naturel) et d'oxyde de plutonium (PuO₂). Le combustible MOX est déjà utilisé en France dans certains réacteurs à eau sous pression (REP). Quant à l'uranium récupéré au cours du retraitement (étape ⑨, figure 4), il est encore légèrement plus riche en ²³⁵U que l'uranium naturel (~ 1 % de ²³⁵U en masse) et pourra à nouveau être enrichi à plus de 3 % pour suivre une voie analogue à celle du combustible nucléaire. Les produits de fission et les actinides radioactifs sont quant à eux vitrifiés et stockés en surface comme déchets nucléaires dans l'attente d'une solution définitive de stockage (étape ⑩, figure 4). Notons qu'en fonction des pays, le combustible utilisé est soit retraité par la filière précédemment décrite, ce qui est le cas de la France, soit directement traité comme un déchet à stocker définitivement.

De l'extraction du minerai jusqu'au retraitement du combustible nucléaire, l'uranium subit donc de nombreuses transformations chimiques et peut se trouver en solution, sous forme de poudre ou d'aérosol plus ou moins solubles ou encore sous forme gazeuse. Le tableau 4 rend compte de la diversité chimique des principaux composés d'uranium rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire.

Composés d'uranium	Forme chimique
Oxydes	U ₃ O ₈ , UO ₂ , UO ₃ , UO ₄ Oxydes mixtes (U _{métal} + UO ₂ + U ₃ O ₈) MOX : (U,Pu)O ₂
Halogénures	UF ₆ , UF ₄ , UO ₂ F ₂ , UO ₂ Cl ₂ , UCl ₄
Divers	U ₂ O ₇ (NH ₄) ₂ UO ₂ (NO ₃) ₂ Pechblende, uraninite, schœpite... (minerais) U _{métal} Alliages, hydrures

Tableau 4. Les principaux composés de l'uranium rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire (Ansoborlo *et al.* 2002).

I.3. Les risques liés à l'emploi de l'uranium dans l'industrie nucléaire

Le cycle du combustible fait intervenir l'élaboration et l'utilisation de différents composés d'uranium. La plupart des opérations est automatisée mais l'intervention de l'homme est parfois requise. La technologie n'étant pas toujours réalisée en enceinte de confinement, il n'y a pas de barrière absolue entre les composés et le personnel.

Dans ce contexte, ce chapitre s'attache à présenter les risques liés à la manipulation de l'uranium dans l'industrie nucléaire. Les voies d'atteinte de l'homme seront tout d'abord présentées. La contamination interne, qui représente le risque principal présenté par l'uranium, sera ensuite particulièrement décrite ainsi que ses effets sur la santé. Enfin, les moyens mis en œuvre dans l'industrie nucléaire pour protéger le personnel des contaminations et prendre en charge les victimes contaminées par de l'uranium seront exposés.

I.3.1. Les voies d'atteinte de l'homme : distinction entre exposition externe et contamination

De façon générale, l'exposition de l'homme aux radionucléides peut avoir lieu de deux façons.

Lorsque les radionucléides demeurent à l'extérieur de l'organisme, ils provoquent une **exposition externe** par irradiation. Cette irradiation ne peut avoir lieu que si les rayonnements émis par les radionucléides sont suffisamment pénétrants, c'est-à-dire s'ils ne sont pas facilement arrêtés par une barrière telle que l'air ou des écrans physiques avant d'atteindre l'homme (figure 7). Ce sont principalement les rayonnements X, γ , neutroniques, et, dans une moindre mesure, les rayonnements β qui sont responsables de l'exposition externe (Métivier *et al.* 2001).

Lorsque les radionucléides sont transférés dans l'organisme, on parle d'exposition interne ou **contamination**. Contrairement à l'exposition externe, tous les rayonnements peuvent contribuer à l'exposition interne.

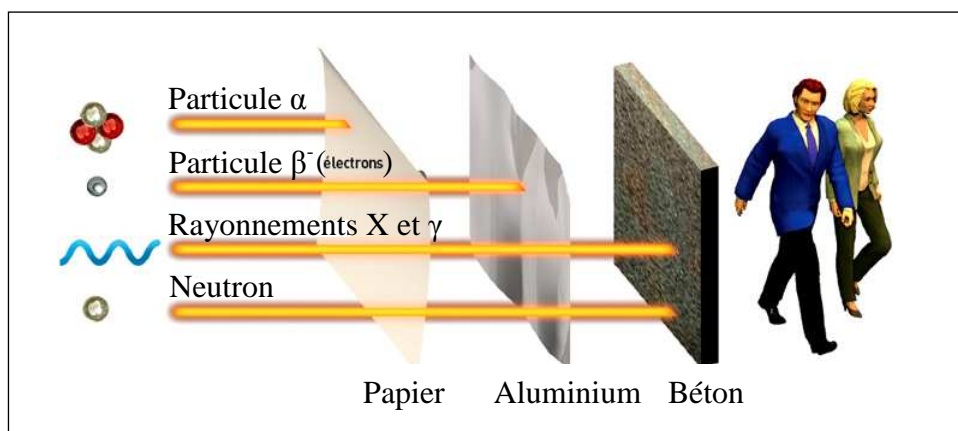


Figure 7. Le pouvoir de pénétration des rayonnements émis lors de la désintégration des radionucléides (CEA2).

Les isotopes de l'uranium rencontrés dans le cycle du combustible nucléaire émettent principalement des rayonnements α au cours de leur désintégration. Ces rayonnements α sont très peu pénétrants : quelques centimètres d'air, une feuille de papier ou les couches superficielles de la peau suffisent à les arrêter (figure 7). Le risque d'une exposition externe est par conséquent extrêmement faible. Cependant, ces rayonnements peu pénétrants cèdent toute leur énergie sur un faible parcours (quelques dizaines de micromètres dans un tissu biologique), ce qui les rend capables d'ioniser les atomes de la matière qu'ils traversent et d'induire localement des dégâts cellulaires plus importants que ceux causés, par exemple, par le rayonnement γ (Métivier *et al.* 2001). Ainsi les rayonnements α sont qualifiés de fortement ionisants.

C'est pour ces raisons de faible pénétrabilité et de forte capacité ionisante des rayonnements α issus de la désintégration de l'uranium que le risque principal lié à la manipulation de ce radioélément est celui d'une contamination interne. Par conséquent, seules ces contaminations seront décrites par la suite.

I.3.2. Les modes de contamination interne

L'entrée des radionucléides dans l'organisme peut se faire par trois voies principales :

- l'inhalation après dissémination de gaz, vapeurs ou aérosols dans l'atmosphère,
- l'ingestion après contamination d'objets portés à la bouche,
- le transfert à travers la peau avec ou sans blessure associée.

Les risques de contamination interne ne concernent pas uniquement le personnel de l'industrie nucléaire. En effet, des radionucléides qui sont naturellement présents dans l'environnement peuvent parfois se trouver en plus forte concentration dans certains compartiments naturels et parvenir jusqu'à l'homme par l'air, l'eau ou les aliments. La radioactivité rajoutée par les activités industrielles est généralement ponctuelle et localisée (Calmet *et al.* 2003). Pour la population, la contamination est essentiellement chronique et elle a le plus fréquemment lieu par ingestion répétée de radioélément (WHO 2001, Laroche *et al.* 2003). Le personnel médical utilisant des radionucléides est également concerné par le risque de contamination.

Dans l'industrie électronucléaire, la contamination peut se produire au niveau des différentes étapes du cycle du combustible de façon chronique par incorporation répétée de radioélément sur une durée plus ou moins longue, ou de façon aiguë suite à une incorporation ponctuelle (incident). A cela s'ajoute des risques de contamination lors du démantèlement des centrales arrivées au terme de leur durée d'exploitation, lors d'une mauvaise utilisation de sources radioactives ou encore dans les laboratoires de recherche rattachés. Les principales voies d'incorporation des radionucléides

dans l'industrie nucléaire sont l'inhalation et la blessure, l'ingestion étant minimisée par les consignes d'hygiène aux postes de travail (Bhattacharyya *et al.* 1995, Le Guen *et al.* 1998, Laroche *et al.* 2003). L'incorporation par inhalation représente le mode de contamination le plus fréquent qui peut avoir lieu suite à la dispersion atmosphérique de radionucléides lors de pertes de confinement ou plus rarement d'incendies (Gerber *et al.* 1992). L'examen de la publication de Blanchin *et al.* (Blanchin *et al.* 2004) portant sur la prise en charge des incidents d'exposition interne survenus sur le site de fabrication du combustible MOX à Cadarache (France) entre 1996 et 2002 permet d'illustrer la fréquence des contaminations : 1529 incidents d'exposition interne ont été traités durant cette période parmi lesquels 1351 suspicions d'inhalation (88,4 %), 173 suspicions de contamination par plaie (11,3 %) et 5 suspicions de contamination mixte par inhalation et plaie (0,3 %). Dans 1,5 % des cas, ces incidents ont conduit à une exposition interne des victimes jugée significative.

I.4. Eléments de toxicologie de l'uranium

Bien qu'omniprésent dans l'environnement, l'uranium n'a pas de fonction métabolique connue. Il est donc considéré comme un élément non essentiel (Craft *et al.* 2004). L'uranium présente une double toxicité : une **toxicité chimique** due à sa nature de métal lourd et une **toxicité radiologique** de par sa nature de radioélément (Galle 1997).

Comme cela a précédemment été illustré dans le chapitre décrivant le cycle du combustible nucléaire, les composés industriels d'uranium sont très divers par leur nature chimique, physique et par leur composition isotopique. Leur capacité à pénétrer dans l'organisme (solubilisation dans le sang) et leur toxicité chimique et radiologique seront conditionnées par tous ces facteurs (Le Guen *et al.* 1998).

I.4.1. Biocinétique de l'uranium

Pour évaluer la toxicité de l'uranium, il est nécessaire de connaître sa biocinétique, c'est-à-dire son comportement dans l'organisme : absorption, distribution, accumulation dans les organes de rétention et élimination.

I.4.1.1. Entrée dans l'organisme

Quel que soit le mode de contamination (inhalation, voie cutanée ou ingestion), la cinétique d'absorption de l'uranium dépend de la forme physico-chimique sous laquelle le composé d'uranium se trouve initialement (Ansoborlo *et al.* 2002). Ainsi, les composés d'uranium solubles, tels que le nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$), vont rapidement diffuser à travers les membranes biologiques, atteindre la circulation sanguine et être distribués dans l'ensemble de l'organisme. Les

composés moins solubles diffusent quant à eux moins rapidement dans le sang (Bleise *et al.* 2003) et induisent plutôt une toxicité localisée au niveau du site de dépôt, ce qui est particulièrement le cas de l'appareil respiratoire en cas d'inhalation de composés insolubles (Hengé-Napoli *et al.* 2001). Ainsi, les composés d'uranium ont été classés dans le tableau 5 selon trois catégories de solubilité : « F » (Fast), « M » (Moderate) et « S » (Slow) (ICRP-66 1994, Le Guen *et al.* 1998).

Composés de type F	Composés de type M	Composés de type S
UF ₆ , UO ₂ F ₂ , UO ₂ (NO ₃) ₂ UO ₇ (NH ₄) ₂ sulfates et carbonates d'uranyle	UO ₃ UF ₄ UCl ₄	UO ₂ , U ₃ O ₈ autres oxydes d'uranium uranium métal

« F » (composé soluble ; diffusion rapide) : période biologique d'absorption de 10 minutes

« M » (composé moyennement soluble ; diffusion moyennement rapide) : périodes biologiques d'absorption de 10 minutes (10 %) et de 140 jours (90 %)

« S » (composé peu soluble ; diffusion lente) : périodes biologiques d'absorption de 10 minutes (0,1 %) et de 7 000 jours (99,9 %)

Tableau 5. Classement de la transférabilité des principaux composés de l'uranium rencontrés dans l'industrie électronucléaire (ICRP-66 1994, Le Guen *et al.* 1998).

1.4.1.2. Transport dans la circulation sanguine

Quelles que soient la voie d'entrée et la forme chimique initiale, l'uranium solubilisé plus ou moins rapidement pénètre dans le flux sanguin sous la forme d'ions uranyle UO₂²⁺ qui, pour rappel, constitue la forme chimique la plus stable en solution (Madic *et al.* 2001). Ces ions uranyle vont en grande majorité se complexer avec des ligands présents dans la circulation sanguine. En effet, les ions uranyle présents dans le plasma suite à une contamination sont associés pour environ 50 % à des ligands de faible poids moléculaire (ions citrates, ions carbonates) et les 50 % restants sont principalement associés à des protéines plasmatiques (albumine, transferrine) et secondairement à des protéines présentes à la surface des globules rouges (lipoprotéines) (Chevari *et al.* 1968, Durbin 1984, Galle 1997). La stabilité des complexes formés entre l'uranium et les ions carbonates (UO₂(CO₃)₃⁴⁻ et UO₂(CO₃)₂²⁻) conduit à une augmentation de la solubilité de l'uranium dans le sang (Durakovic 1999). L'uranium entré dans la circulation sanguine est ensuite transféré aux organes et tissus cibles dans un délai moyen d'environ une heure (Ansoborlo *et al.* 2002).

I.4.1.3. Rétention dans les organes cibles

Quelques jours après une injection ou une inhalation de composés solubles d'uranium, la plupart de la charge systémique se retrouve dans le squelette (10-36%), les reins (10-25%) et en très faible proportion dans le foie et les tissus mous (Durbin *et al.* 1998, Hengé-Napoli *et al.* 1998, Hengé-Napoli *et al.* 2001, Ansoborlo *et al.* 2002), le reste étant éliminé par voie urinaire ou fécale. La rétention de l'uranium dans ses deux principaux organes cibles que sont les reins et le squelette va à présent être détaillée.

Fixation rénale

Un schéma fonctionnel du rein est proposé en figure 8 afin d'illustrer ce paragraphe.

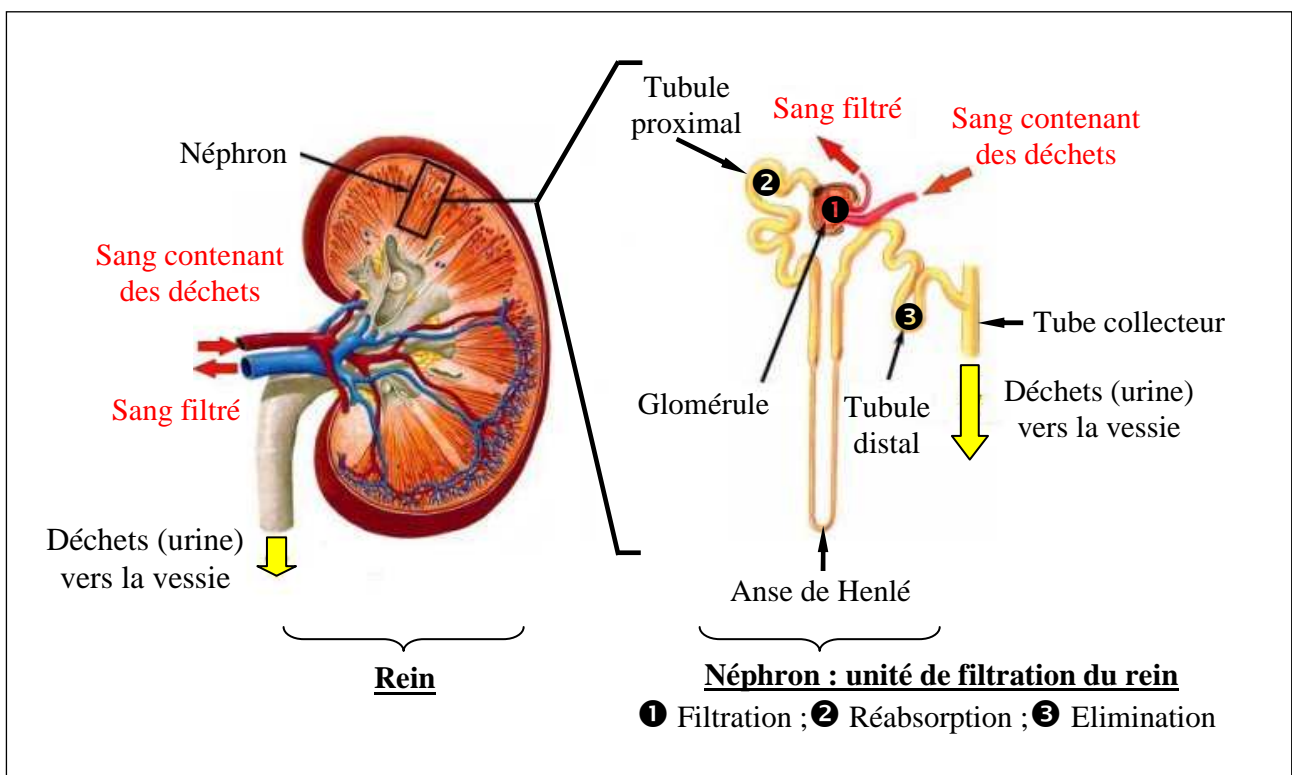


Figure 8. Schéma fonctionnel du rein (UNCKC).

Le traitement de l'uranium par les reins débute par un processus appelé filtration glomérulaire. Cette filtration, qui consiste à faire passer l'uranium du milieu sanguin au milieu urinaire, a lieu dans les glomérules des néphrons du rein. Le processus de filtration glomérulaire ne laissant passer que l'eau, les substances dissoutes et les petites protéines (< 60 kDa) (Calmet *et al.* 2003), seuls les ions uranyle libres ou liés à des ions carbonates ou citrates pénètrent dans la lumière du néphron (Galle 1997). A mesure que des complexes uranium-carbonate sont éliminés du compartiment sanguin, les complexes uranium-protéine moins stables se dissocient au profit des complexes formés avec les carbonates, permettant ainsi l'élimination progressive de l'uranium du sang. Les

complexes uranium-carbonate qui étaient stables au pH sanguin (7,35 à 7,45) (Guilmette *et al.* 2003) peuvent se dissocier à un degré variable dans le tubule rénal si l'environnement y est acide. Une partie des ions uranyle libres est alors directement excrétée dans les urines, l'autre fraction est quant à elle réabsorbée avec l'eau et les électrolytes par les cellules tubulaires proximales (Muller *et al.* 2008). Au cours de cette réabsorption, une part des ions uranyle libres représentant environ 20 % de la charge systémique en uranium est retenue dans les cellules épithéliales du tubule proximal où elle est concentrée sous forme de calcul microscopique insoluble qui est ensuite déversé dans la lumière urinaire et éliminé par le flux urinaire (Galle 1997, Le Guen *et al.* 1998, Hengé-Napoli *et al.* 2001). Si le pH régnant dans le tubule rénal est alcalin, la majeure partie des complexes carbonate-uranium qui sont stables dans ces conditions est directement excrétée dans l'urine.

La quantité d'uranium excrétée dépend donc entre autres du pH des urines. En effet, si le pH dans la lumière du tubule rénal augmente, la fraction d'uranium libre diminue, ce qui limite sa réabsorption, sa rétention et donc la manifestation de sa toxicité au niveau des cellules du tubule proximal.

Fixation osseuse

Le squelette constitue l'organe majeur de rétention à long terme de l'uranium (Hengé-Napoli *et al.* 2001). Les ions uranyle UO_2^{2+} vont se fixer au niveau des surfaces osseuses suivant une réaction d'échange ionique avec le calcium Ca^{2+} constitutif des os. L'uranium se dépose plus particulièrement à proximité des zones vascularisées et de calcification active (zone de croissance).

Alors que le rein peut éliminer assez rapidement l'uranium selon le mécanisme décrit précédemment, l'élimination de l'uranium stocké dans l'os est beaucoup plus lente. En effet, en 5 jours, la moitié de l'uranium présent à la surface osseuse retourne au plasma et l'autre moitié est internalisée dans le volume osseux suite aux phénomènes de croissance et de remodelage osseux. La période d'élimination de l'uranium contenu dans ce volume osseux est de 30 jours : 75 % de la quantité éliminée retournent à la surface osseuse (d'où une partie de l'uranium est à nouveau relarguée dans le plasma sanguin et une autre transférée dans le volume osseux) et 25 % sont fixés dans une zone osseuse non échangeable (ICRP-69 1995, Métivier *et al.* 2001). L'élimination de l'uranium fixé dans cette zone osseuse non échangeable vers le plasma dépend alors de la vitesse du remodelage osseux qui elle-même est âge-dépendante. Une fraction de l'uranium absorbé peut ainsi rester piégée dans les os durant plusieurs dizaines d'années.

I.4.1.4. Excrétion

Le rein constitue l'organe principal d'excrétion de l'uranium. En effet, quelles que soient la voie d'entrée et la forme chimique, 60 à 80 % de la charge systémique sont éliminés en 2 à 6 jours. La majeure partie de la quantité d'uranium restant dans le sang est éliminée avec une période de 30 à 340 jours (Durbin 1984, Hengé-Napoli *et al.* 2001). L'excrétion fécale de l'uranium présent dans le sang est négligeable puisque seulement 0,5 à 2 % sont éliminés *via* les selles (Hengé-Napoli *et al.* 2001).

L'excrétion par voie fécale devient prépondérante en cas d'ingestion et d'inhalation de composés insolubles d'uranium. En effet, les composés insolubles ingérés ne sont pas réabsorbés par la circulation systémique au niveau du tractus gastro-intestinal et sont donc excrétés directement par la voie fécale. Concernant l'inhalation de composés insolubles d'uranium, une fraction substantielle des particules inhalées qui est éliminée par expiration est avalée, transférée dans le système digestif et excrétée dans les fèces (Gerber *et al.* 1992, Galle 1997).

Après son passage dans la circulation sanguine, l'uranium fait donc l'objet de recyclages entre le sang et les organes fixateurs. La figure 9 présente le modèle de biocinétique de l'uranium chez l'homme adulte proposé par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) (ICRP-69 1995). Ce modèle, qui est basé sur de nombreuses données expérimentales, tient compte du recyclage de l'uranium entre la circulation sanguine et les organes de rétention.

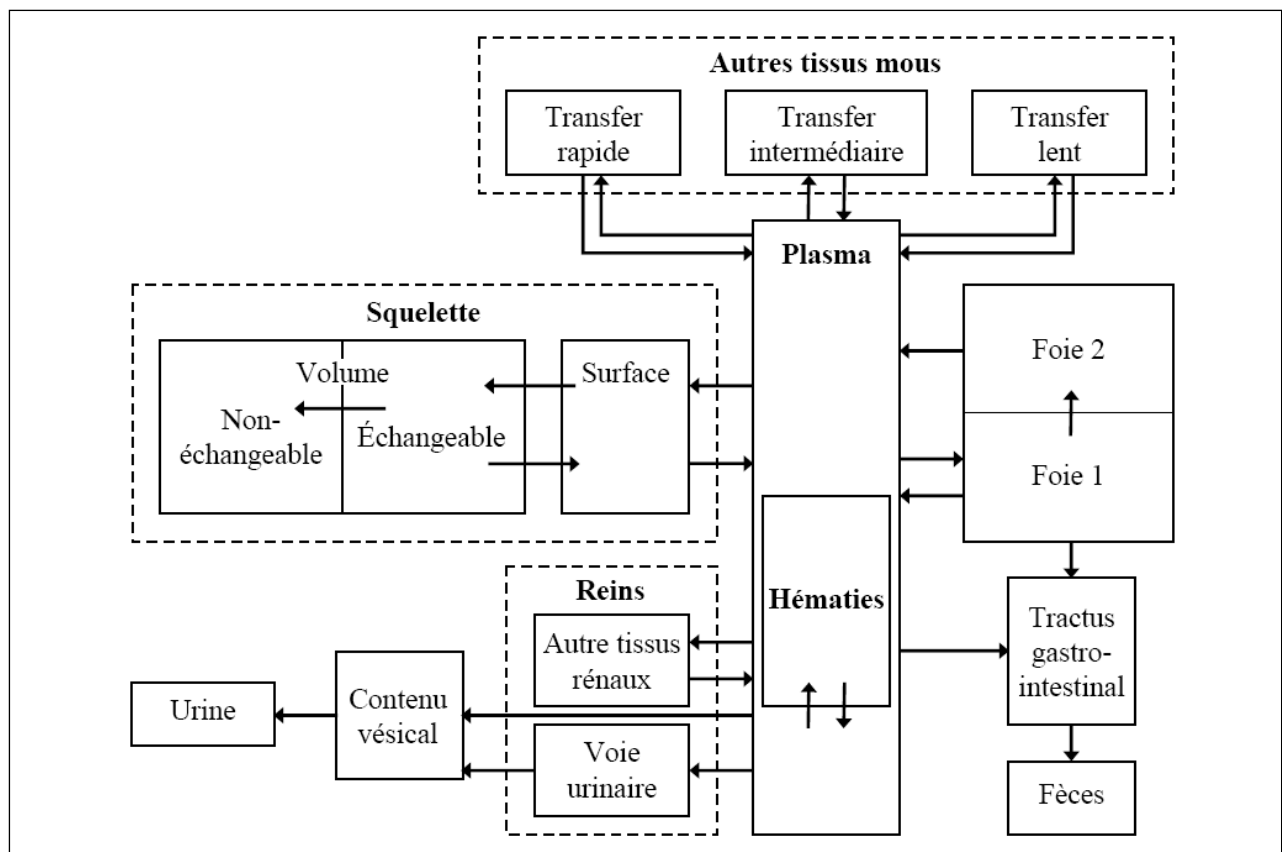


Figure 9. Le modèle biocinétique de l'uranium chez l'homme adulte (ICRP-69 1995).

I.4.2. Toxicités chimique et radiologique

Chimiotoxicité

De par ses propriétés de métal lourd, l'uranium constitue un composé chimiotoxique (Kathren *et al.* 2008b). La toxicité chimique de l'uranium est indépendante de l'isotopie et de l'enrichissement en ^{235}U (WHO 2001) ; elle est uniquement fonction de la quantité d'uranium incorporée qui est elle-même fonction de la voie d'entrée et de la solubilité du composé d'uranium (Laroche *et al.* 2003, Kathren *et al.* 2008a, Kathren *et al.* 2008b).

Le rein, organe de stockage à court terme de l'uranium (Le Guen *et al.* 1998), est généralement reconnu comme étant le siège de la toxicité chimique de l'uranium. L'uranium est donc un élément qualifié de néphrotoxique. En effet, l'intense réabsorption qui a lieu au niveau des cellules tubulaires proximales du rein conduit à une accumulation d'uranium au niveau de ces cellules. Si la concentration en uranium y est massive, il provoque des lésions membranaires qui entraînent la mort des cellules concernées, des changements morphologiques des structures rénales et des anomalies fonctionnelles du rein, notamment au niveau des phénomènes de réabsorption (Diamond *et al.* 1989, Hengé-Napoli *et al.* 2001, Bailey *et al.* 2002, Banday *et al.* 2008, Zhu *et al.* 2009). A plus faible concentration, l'uranium provoque la modification du métabolisme des cellules. Dans ce cas, les conséquences ne se situent plus au niveau de la structure et de la fonction du rein mais au niveau du fonctionnement de ces cellules (Bailey *et al.* 2002). La sévérité et la réversibilité des lésions dépendent non seulement de la concentration en uranium dans les reins, mais également du temps d'exposition (Souidi *et al.* 2009). De nombreuses études menées en laboratoire sur des mammifères ont montré que les effets chimiotoxiques de l'uranium sur les reins sont très variables d'une espèce à l'autre et qu'ils peuvent aller jusqu'à la mort des sujets. Cependant, l'homme semble moins sensible à la toxicité de l'uranium que les autres mammifères étudiés (Kathren *et al.* 2008a).

La Commission Internationale de Protection Radiologique a recommandé une concentration maximale admissible en uranium de $3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de rein, valeur au-delà de laquelle se manifestent des effets néphrotoxiques (ICRP-2 1959). Cependant, cette valeur qui a été déterminée par conversion d'une valeur limite d'exposition aux rayonnements ne reflète pas réellement la toxicité chimique de l'uranium et elle est aujourd'hui très discutée. En effet, des effets néphrotoxiques de l'uranium ont été constatés à des concentrations en uranium dans les reins bien inférieures (Diamond *et al.* 1989, Bailey *et al.* 2002).

Radiotoxicité

La radiotoxicité se définit comme la toxicité due aux rayonnements ionisants émis par les radionucléides incorporés, sachant que les rayonnements α émis par l'uranium sont les plus ionisants. Tous les isotopes de l'uranium étant radioactifs, cet élément est considéré comme un

composé potentiellement radiotoxique. La toxicité radiologique varie en fonction du degré d'enrichissement en ^{235}U du composé d'uranium en présence (Laroche *et al.* 2003, Kathren *et al.* 2008a). Les lésions ne peuvent apparaître que dans les tissus où le temps de rétention de l'uranium est important. D'après la biocinétique de l'uranium chez l'homme (*cf.* chapitre I § I.4.1.4), la radiotoxicité se manifeste essentiellement au niveau du squelette et se traduit par l'apparition de cancers des os (Bleise *et al.* 2003, Miller *et al.* 2005, Souidi *et al.* 2009).

Les effets radiologiques de l'uranium sur l'organisme dépendent de la dose, c'est-à-dire de la quantité d'énergie déposée par les rayonnements ionisants par unité de masse (unité légale : le gray, Gy), de son débit, qui traduit l'intensité de l'irradiation et qui se définit comme la quantité d'énergie absorbée par la matière par unité de masse et de temps (unité légale : le gray par seconde, $\text{Gy}\cdot\text{s}^{-1}$), et de la durée d'exposition (Laroche *et al.* 2003).

Dans le tableau 6 ont été regroupés les différents composés d'uranium et la prépondérance du risque chimique ou radiologique associé en fonction de l'exposition et du taux d'enrichissement en ^{235}U .

Produit industriel			Nature de la toxicité	
Forme chimique de l'uranium	Classe de transférabilité	Enrichissement en ^{235}U (%)	Incorporation unique	Incorporation chronique
UF ₆ , UO ₂ F ₂ UO ₂ (NO ₃) ₂ UO ₇ (NH ₄) ₂ sulfates et carbonates d'uranyle	F	< 3 > 3	Chimique Chimique	Chimique Radiologique
UO ₃ , UF ₄ , UCl ₄	M	< 30 > 30	Chimique Chimique et radiologique	Radiologique
UO ₂ , U ₃ O ₈ autres oxydes d'uranium uranium métal	S	0 – 100	Radiologique	Radiologique

Tableau 6. Nature de la toxicité de l'uranium en fonction de l'exposition (nature du composé d'uranium incorporé et fréquence de contamination) et de l'enrichissement en ^{235}U (Le Guen *et al.* 1998).

De façon générale, pour les éléments radioactifs à longue période, la toxicité chimique représente un risque beaucoup plus grand que la toxicité radiologique (Calmet *et al.* 2003). En effet, la toxicité chimique de l'uranium prédomine sur sa toxicité radiologique car la quantité d'uranium incorporée, même fortement enrichi, nécessaire pour produire une forte irradiation est beaucoup plus importante que la quantité d'uranium qui produirait un effet chimiotoxique fatal (Kathren *et al.* 2008a). Ainsi, la réglementation française a fixé des limites de masses ingérée et inhalée de composés chimiques d'uranium à respectivement 150 mg et 2,5 mg par jour, et ce, quelle que soit la composition isotopique de l'élément (Calmet *et al.* 2003).

I.5. Surveillance du personnel nucléaire et prise en charge des contaminations

Les diverses opérations du cycle du combustible doivent être réalisées dans des conditions rigoureuses de prévention des accidents et de protection des personnes (ASN).

I.5.1. Surveillance des travailleurs

La directive européenne 96/29 de la Communauté Européenne de l'Energie Atomique (EURATOM) fixe les normes de base de radioprotection pour les expositions professionnelles, médicales et du public (EURATOM 1996).

Concernant l'exposition externe, la législation est basée sur le principe que l'exposition aux rayonnements ionisants doit se situer à un niveau aussi bas que possible. La surveillance de l'exposition externe est assurée au niveau du poste de travail par des appareils de mesure de la dose appelés dosimètres d'ambiance et au niveau des opérateurs par le port de dosimètres individuels (Cossonnet *et al.* 2001, Le Guen *et al.* 2001).

La surveillance de l'exposition interne (ou contamination) repose soit sur des mesures *in vivo* par anthroporadiométrie (figure 10) qui sont basées sur la détection et l'analyse des rayonnements émis par les radionucléides incorporés, soit sur des analyses radiotoxicologiques qui consistent à doser les radionucléides dans les urines et/ou dans les selles.

Pour les postes de travail où le risque de contamination du travailleur par inhalation est identifié, la surveillance est assurée par des appareils supplémentaires de mesure de concentration atmosphérique et par la réalisation de frottis surfaciques au niveau de ces postes de travail.

La fréquence des examens de surveillance des travailleurs est adaptée à chaque poste de travail.

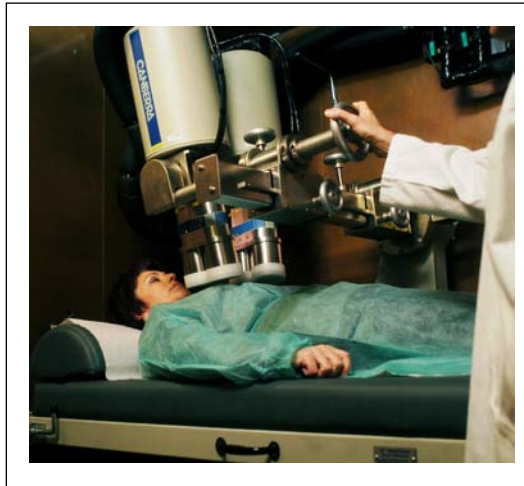


Figure 10. L'anthroporadiométrie pulmonaire (Franck *et al.* 2007)

La limite de doses efficaces reçues par expositions externe et interne est fixée à 20 mSv sur douze mois consécutifs pour le personnel de l'industrie nucléaire (Code-du-travail 2008) et à 1 mSv par an pour le public (Code-de-la-santé-publique 2006). La dose efficace est une grandeur mesurant l'impact sur les tissus biologiques d'une exposition à un rayonnement ionisant. Elle se définit comme la dose absorbée corrigée d'un facteur sans dimension prenant en compte la dangerosité relative du rayonnement considéré et la sensibilité du tissu irradié (unité légale : le sievert, Sv).

I.5.2. Prise en charge du personnel en cas de contamination par l'uranium

Quel que soit le degré de radiocontamination, l'urgence médico-chirurgicale prime : les gestes vitaux doivent toujours être mis en œuvre d'emblée. Cependant, les contaminations des blessés sont à traiter si possible au stade précoce où les traitements ont alors leur maximum d'efficacité (ASN 2008). Pour toute personne suspectée de contamination, un traitement d'urgence doit être mis en œuvre (ASN 2008). Après déshabillage codifié de la victime visant à limiter la dispersion des radionucléides présents sur ses habits (figure 11) et une décontamination générale (douche, lavages non agressifs), la personne est conduite au service médical où un traitement lui sera administré dès lors que le ou les radionucléides contaminants potentiels auront été identifiés. Le bénéfice apporté par le traitement devra toujours être mesuré par rapport aux effets néfastes qui peuvent y être associés.

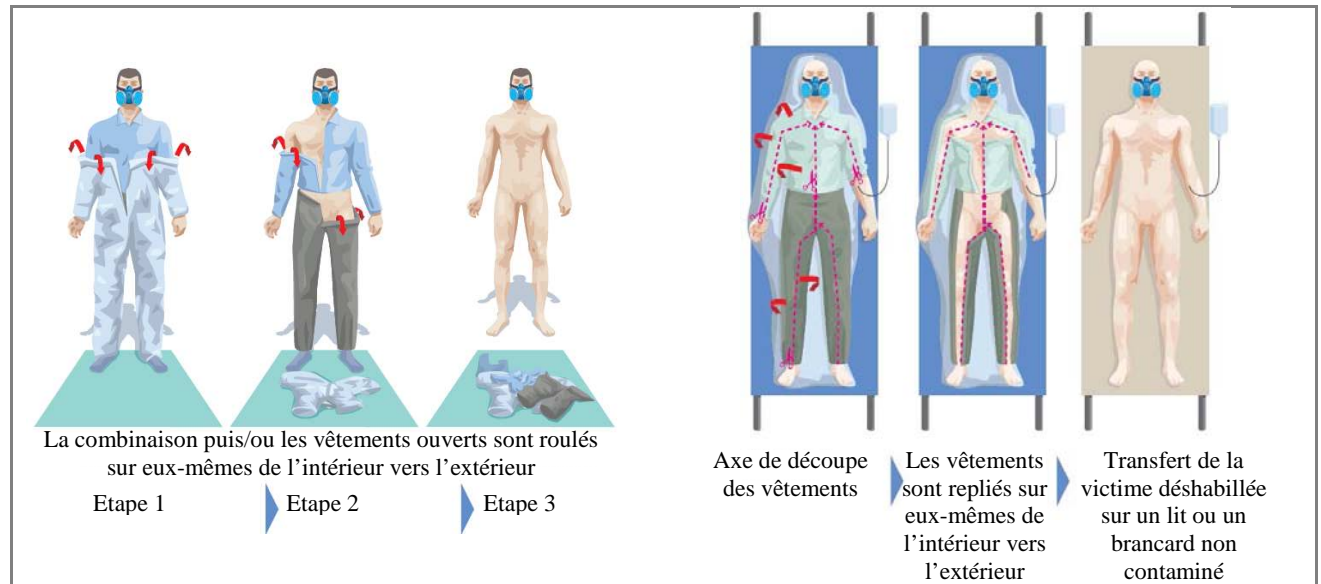


Figure 11. Procédure de déshabillage d'une victime valide (à gauche) et invalide (à droite) (ASN 2008).

Les deux principales méthodes de traitement des personnes contaminées visent soit à réduire le déplacement des radionucléides à partir du site d'entrée, soit à accélérer leur élimination de l'organisme par les voies naturelles (Bhattacharyya *et al.* 1995).

Les procédures utilisées pour limiter le transfert des radionucléides à partir du site d'entrée dans la circulation sanguine sont majoritairement non spécifiques, c'est-à-dire applicables à tout radionucléide et tout composé radioactif. Ces procédures non spécifiques comprennent :

- en cas d'ingestion : le lavage d'estomac, l'administration de laxatifs nettoyant l'appareil gastro-intestinal et l'administration d'antiacides ou d'adsorbants,
- en cas de contamination par voie cutanée : le lavage de la plaie et l'excision chirurgicale permettant d'évacuer les substances radioactives de la blessure,
- en cas de contamination par inhalation : le lavage pulmonaire.

Une fois la substance radioactive diffusée dans le sang, des traitements visant à empêcher son dépôt dans les tissus et à accélérer son excrétion doivent rapidement être administrés. Ces traitements dits de décorporation sont eux plus spécifiques aux radionucléides incorporés et sont basés sur la formation de complexes entre le ligand administré et les radionucléides incorporés qui sont alors excrétés par les voies naturelles.

Les interventions possibles en cas de contamination sont résumées dans le tableau 7.

Mode de contamination	Intervention possible
Inhalation	Lavage pulmonaire Chélation locale (inhalateur) et/ou systémique
Voie cutanée	Irrigation Excision Chélation locale et/ou systémique
Ingestion	Lavage gastrique Lavement Administration d'antiacides Administration d'adsorbants

Tableau 7. Les traitements possibles en fonction du mode de contamination (Wood *et al.* 2000).

En cas de contamination par les actinides, un traitement de décorporation par injection intraveineuse d'une solution contenant 0,5 gramme de sel calcique d'acide diéthylène-triamine-pentaacétique (Ca-DTPA) doit être administré dans les 2 heures suivant la contamination (Bhattacharyya *et al.* 1995, Grappin *et al.* 2007). Si un médecin n'est pas rapidement disponible pour réaliser l'injection, l'inhalation de 1 gramme de DTPA en aérosol, traitement initialement développé pour la contamination par inhalation (Tymen *et al.* 2000b, Gervelas *et al.* 2007, Sérandour *et al.* 2007), devrait être envisagée (Bhattacharyya *et al.* 1995). Le Ca-DTPA (figure 12) est un agent chélatant qui a la capacité de s'associer fortement aux actinides sous forme de chélate stable dans le sang qui est facilement éliminé par les voies naturelles. Le chélate se distingue du simple complexe par le fait que le cation piégé est fixé au chélateur par au moins deux liaisons de coordination à la manière d'une pince (figure 13).

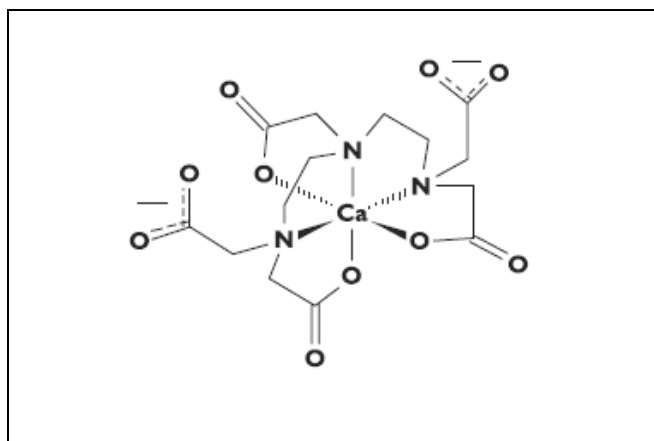


Figure 12. Structure chimique du Ca-DTPA²⁻

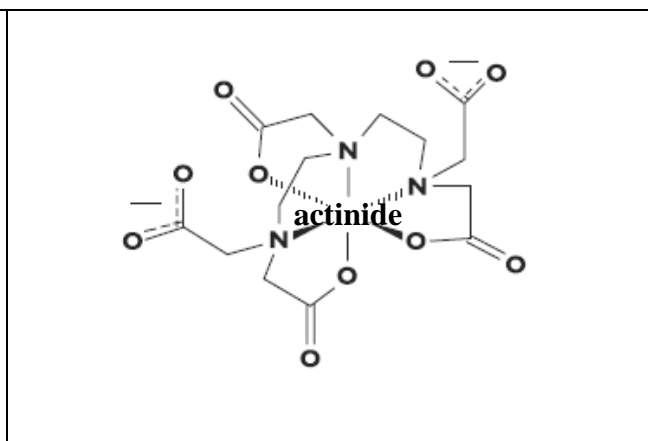


Figure 13. Chélate actinide-DTPA

Cependant, dans le cas d'une contamination par l'uranium, l'efficacité de décorporation du DTPA est discutée (Pavlakakis *et al.* 1996, Galle 1997, Durbin *et al.* 1998, Durbin 2008). De plus, le DTPA semble potentialiser la néphrotoxicité induite par l'uranium (Muller *et al.* 2006). De nouveaux agents chélatants spécifiques de l'uranium ont alors été synthétisés (Hengé-Napoli *et al.* 1999, Burgada *et al.* 2000, Durbin 2008), mais, jusqu'à ce jour, aucun d'entre eux n'est recommandé par l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN) pour la décorporation de ce radionucléide. L'ASN, qui tient compte de la prépondérance du risque chimiotoxique rénal de l'uranium, préconise une élimination de ce radioélément incorporé par injection intraveineuse d'une solution de bicarbonate de sodium. Cet acte permet une alcalinisation du sang et des urines qui augmente la fraction des ions uranyle complexés aux ions carbonates (Hengé-Napoli *et al.* 2001), ce qui limite la réabsorption tubulaire de l'uranium dans les reins et conduit à une augmentation de l'élimination de ce radionucléide par la voie urinaire (*cf.* chapitre I § I.4.1.3). L'efficacité de ce traitement est cependant discutée.

A l'issue de ce paragraphe, il apparaît que le mode de contamination par voie cutanée, seconde cause de contamination du personnel de l'industrie nucléaire, n'a pas fait l'objet de développement de traitement adapté. En effet, alors que pour la contamination par inhalation des inhalateurs d'agents chélatants ont été mis au point, notamment des turbo-inhalateurs de DTPA (Giraud 2000, Tymen *et al.* 2000b), en cas de contamination cutanée, seul un lavage est effectué. Dans le cas d'une contamination cutanée par l'uranium, le traitement d'urgence préconisé par l'ASN consiste en un lavage avec une solution de Ca-DTPA ou à apposer un pansement absorbant imbibé de cette solution (Giraud 2000, ASN 2008). Malheureusement, le DTPA n'étant pas un bon chélateur de l'uranium, ce traitement d'urgence des contaminations cutanées ne garantit pas l'extraction du contaminant du site de dépôt.

Un intérêt particulier doit donc être porté sur le développement de systèmes permettant de piéger l'uranium au niveau de la zone cutanée contaminée car, comme il le sera démontré dans le chapitre suivant, la contamination cutanée peut conduire à une forte exposition interne des individus.

Chapitre II. La contamination cutanée par l'uranium

La contamination par voie cutanée, seconde cause de contamination interne des travailleurs de l'industrie nucléaire, peut conduire à une forte exposition interne des individus après passage du radionucléide dans l'organisme.

Ce chapitre dédié à l'étude de la contamination cutanée par l'uranium débutera par une présentation de la structure de la peau et par une description du phénomène d'absorption cutanée. Les différents modèles expérimentaux permettant l'étude de la diffusion percutanée de molécules d'intérêt seront ensuite décrits. Suite à cette partie introductive, les principaux travaux menés sur l'étude de la diffusion de l'uranium à travers la peau intacte ou lésée et sur les effets toxiques observés suite à ce type de contamination seront exposés. Enfin, les principales études portant sur le développement de systèmes de décontamination de la peau intacte ou de blessures contaminées par de l'uranium visant à limiter l'entrée de ce radioélément dans l'organisme seront discutés.

II.1. La peau humaine

La peau assure le contact entre le corps et l'environnement extérieur. Elle développe une surface totale d'environ 2 m^2 et représente environ 10 % de la masse corporelle, ce qui la place au rang de plus vaste organe du corps (Schaefer *et al.* 1996, Hadgraft 2001b).

Les fonctions de la peau sont considérées comme indispensables à la vie : elle joue un rôle essentiel de protection des agressions mécaniques, caloriques, lumineuses et elle prévient des pertes hydriques et de l'entrée d'éléments étrangers dans l'organisme (Hewitt 1976, Hadgraft 2001b).

II.1.1. Structure

La structure cutanée est hétérogène et se compose de trois couches superposées qui, de la surface de la peau vers l'intérieur (de haut en bas sur la figure 14), se nomment épiderme (①), derme (②) et hypoderme (③). Les follicules pileux (④), les glandes sébacées (⑤), qui sont annexées aux follicules pileux et secrètent le sébum, ainsi que les glandes sudoripares (⑥), qui secrètent la sueur, correspondent à des annexes épidermiques qui sont formés par des invaginations de l'épiderme dans le derme et qui représentent environ 0,1 % de la surface totale de la peau (Schaefer *et al.* 1996). Les différentes structures de la peau vont à présent être décrites.

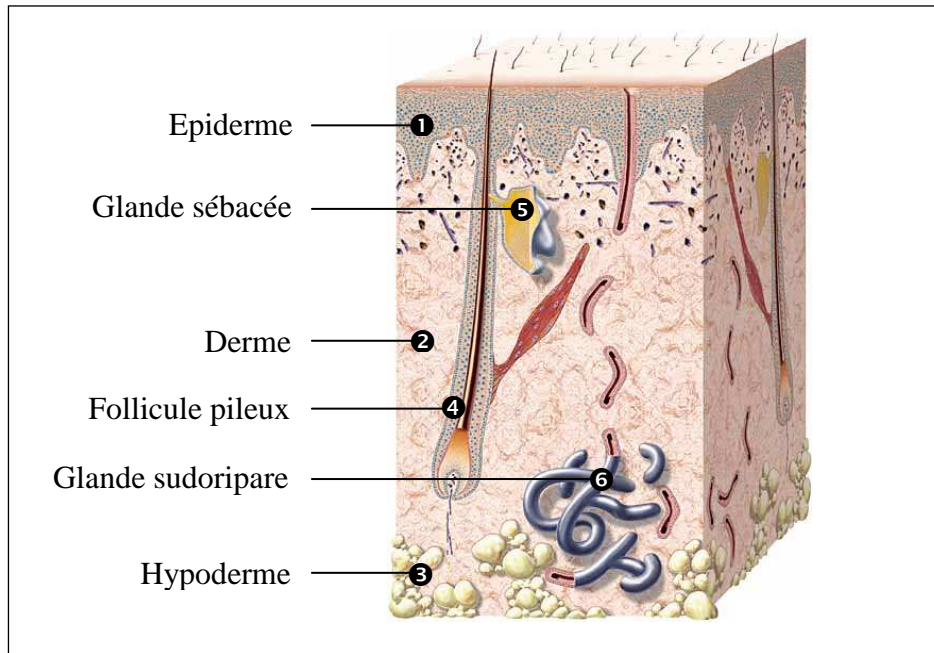


Figure 14. Structure de la peau (Laboratoires-Dermatologiques-Eucerin).

• **L'épiderme** (❶ figure 14) constitue la couche supérieure de la peau et présente une épaisseur moyenne de 100 μm qui peut varier de 50 à 300 μm selon les régions anatomiques (Agache 2000). Il est principalement constitué de cellules vivantes, les kératinocytes, qui ont la particularité de se transformer progressivement au cours du phénomène de kératinisation pour former les quatre couches de l'épiderme. Ainsi, de l'intérieur vers l'extérieur de l'épiderme (de bas en haut sur la figure 15) se trouvent la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (Civatte 1982, Martini 2006).

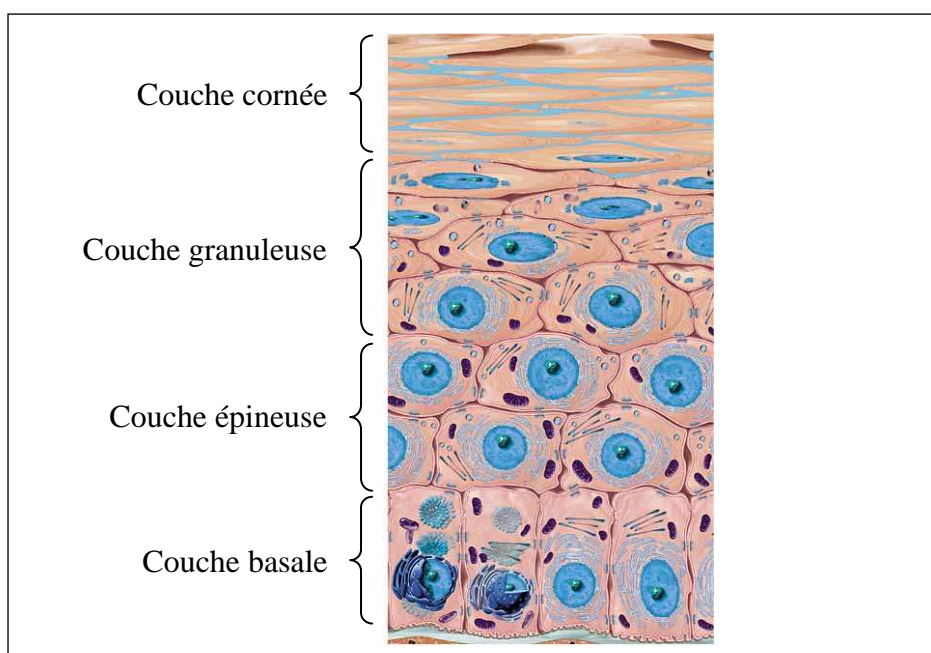


Figure 15. Structure de la couche épidermique de la peau (Laboratoires-Dermatologiques-Eucerin).

La couche basale (*stratum germinativum*) de l'épiderme est constituée d'une unique rangée de cellules jouant le rôle de cellules mères : elles se multiplient et produisent les cellules de la couche immédiatement supérieure qui est appelée couche épineuse. Dans la couche basale se trouvent également des cellules nommées mélanocytes qui sont responsables de la pigmentation de la peau.

La couche épineuse (*stratum spinosum*), ou corps muqueux de Malpighi, est constituée de cellules polyédriques solidement attachées entre elles par des liens de nature protéique appelés desmosomes. En cheminant vers le haut, ces cellules se différencient et deviennent de plus en plus actives dans les synthèses.

La couche granuleuse (*stratum granulosum*) est constituée de 4 à 5 couches de cellules (ICRP-59 1991). A ce niveau débute le processus de kératinisation, c'est-à-dire l'enrichissement des cellules épidermiques en kératine, avec l'élaboration de molécules fondamentales qui seront responsables des caractères physico-chimiques des couches supérieures. A l'intérieur des cellules apparaissent en effet des grains de kératohyaline constitués de protéines qui seront responsables de l'agrégation des cellules dans la couche cornée. Des organites lipidiques, appelés corps d'Odland, ou kératinosomes, se forment sur la face externe des membranes des cellules. Ils libèrent par la suite des lipides qui constitueront le ciment intercellulaire de la couche cornée (Agache 2000). Les kératinocytes vont s'aplatir au fur et à mesure de leur montée vers la surface épidermique et perdre leur noyau pour se transformer en cornéocytes, cellules constitutives de la couche cornée.

L'ensemble des couches basale, épineuse et granuleuse de l'épiderme est couramment appelé épiderme viable.

La couche cornée (*stratum corneum*), couche la plus externe de la peau, a une épaisseur comprise entre 10 et 40 μm selon les régions anatomiques (Ya-Xian *et al.* 1999, Reddy *et al.* 2000, Hadgraft 2001b, Tymen *et al.* 2002, Petitot *et al.* 2004, Martini 2006). Elle est elle-même formée de trois couches qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont la couche claire (*stratum lucidum*), qui est présente uniquement dans la paume des mains et la plante des pieds, la couche compacte (*stratum compactum*), qui représente la couche cornée proprement dite, puis la couche desquamante (*stratum disjonctum*) (figure 16).



Figure 16. Cliché de la couche desquamante de la couche cornée
(Laboratoires-Dermatologiques-Eucerin).

Les cellules de la couche cornée, nommées cornéocytes, sont aplaties et parfois considérées comme des cellules mortes car elles sont dépourvues de noyau et sont presque exclusivement constituées de kératine (Agache 2000). Les cornéocytes présentent cependant toujours une activité enzymatique qui participe aux phénomènes de métabolisation. Ils sont également riches en substances plus ou moins hygroscopiques qui assurent la fixation de l'eau, la couche cornée contenant environ 15 % d'eau en masse. L'organisation des cornéocytes peut être représentée de façon schématique par un « mur de briques » comprenant en moyenne 15 à 20 couches de cellules riches en protéines (ICRP-59 1991, Schaefer *et al.* 1996, Ya-Xian *et al.* 1999) (figure 17, à gauche), le ciment unissant ces cellules étant constitué de bicouches lipidiques (acides gras polyinsaturés, cholestérol, céramides) (Schmitt 2000, Hadgraft 2001b) (figure 17, à droite). Les desmosomes, structures protéiques reliant les cellules entre elles, se sont à ce stade transformés en cornéodesmosomes suite à des modifications biochimiques. La desquamation des cornéocytes, c'est-à-dire la mue et la disparition de la couche cornée supérieure, est régulée par la cohésion entre les cellules, qui est assurée par le ciment lipidique et par la présence des cornéodesmosomes, et elle est induite par des enzymes qui dégradent certaines protéines constitutives des cornéodesmosomes.

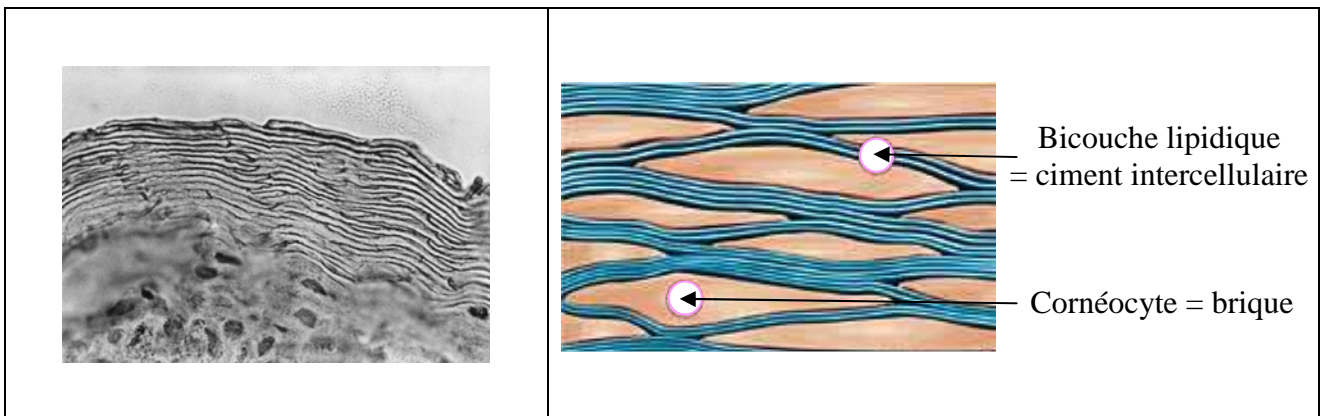


Figure 17. A gauche : Observation microscopique de la couche cornée sur une coupe transversale de peau dorsale humaine (x 400) (Ya-Xian *et al.* 1999). A droite : Structure schématique de la couche cornée (Laboratoires-Dermatologiques-Eucerin).

La kératinisation comprend donc deux phénomènes simultanés : une migration verticale et une différenciation des cellules. Elle s'étale sur environ un mois, deux semaines étant nécessaires pour la migration des cellules de la couche basale à la couche cornée (Agache 2000, Martini 2006). Ce phénomène de renouvellement cellulaire qui s'effectue selon un processus continu de reproduction, différenciation, kératinisation et desquamation s'appelle le « turnover épidermique ».

Dans l'épiderme se trouvent également des cellules de Langerhans qui assurent les défenses immunologiques de la peau (2 à 4 % de la population cellulaire), ainsi que des récepteurs sensitifs nommés cellules de Merkel (1 % des cellules épidermiques) (Schaefer *et al.* 1996, Martini 2006).

L'épiderme étant dépourvu de vascularisation, les cellules épidermiques reçoivent les nutriments par diffusion passive dans le fluide interstitiel à partir du derme, qui lui est vascularisé (Schaefer *et al.* 1996).

L'adhérence entre l'épiderme et le derme sous-jacent est réalisée grâce à la jonction dermoépidermique qui est située sous la couche basale. L'ensemble couche basale et jonction dermoépidermique a une structure caractéristique ondulée qui assure une importante surface de contact entre l'épiderme et le derme (Schaefer *et al.* 1996) (figure 14).

- **Le derme** (❷ figure 14) a une épaisseur variant de 500 μm à 3 mm. On distingue le derme papillaire, le plus proche de l'épiderme, et le derme réticulaire qui est plus profond et qui représente 80 % de l'épaisseur totale du derme. Tous deux sont des tissus conjonctifs qui consistent principalement en une matrice extracellulaire sécrétée par des cellules appelées fibroblastes. Cette matrice comprend des protéines fibreuses de soutien incluses dans une substance fondamentale gélatineuse constituée de protéoglycanes (Agache 2000, Martini 2006).

Les protéines synthétisées par les fibroblastes sont le collagène, macromolécule assemblée en fibres conférant à la peau sa résistance, et l'élastine, macromolécule essentiellement localisée dans le derme papillaire qui s'organise en faisceaux et qui confère à la peau son élasticité.

Le gel dans lequel baignent les protéines citées ci-dessus est constitué de protéoglycanes (tels que l'acide hyaluronique) qui sont des molécules formées d'une protéine porteuse associée à des saccharides et à des molécules sulfatées. Ces protéoglycanes captent les molécules d'eau et constituent un gel. Le derme est donc riche en eau, il en contient environ 70 à 80 % en masse (Schaefer *et al.* 1996, Martini 2006).

- **L'hypoderme** (❸ figure 14) est un tissu conjonctif lâche qui possède la même structure que le derme, avec majoritairement du collagène et du gel de protéoglycanes. Il est de plus chargé en adipocytes, cellules graisseuses qui confèrent à l'hypoderme un pouvoir isolant et qui constituent une réserve d'énergie (Schaefer *et al.* 1996). Il n'existe pas de séparation nette entre le derme et l'hypoderme.

La vascularisation lymphatique et artérioveineuse parcourt l'hypoderme, le derme et s'arrête sous la jonction dermoépidermique. Le système artérioveineux permet l'irrigation des follicules pilosébacés et des glandes sudoripares (Schaefer *et al.* 1996, Martini 2006).

Enfin, la sensibilité tactile, douloureuse et thermique est quant à elle assurée par un réseau de nerfs qui est présent dans le derme, l'épiderme ne recevant que des terminaisons nerveuses (Hewitt 1976).

II.1.2. Absorption percutanée

L'absorption percutanée se définit comme le passage dans la circulation sanguine d'une substance déposée sur la peau. Ce processus est divisé en trois grandes étapes qui sont **la pénétration**, c'est-à-dire l'entrée de la substance dans la couche supérieure de la peau, **la perméation** qui correspond au passage de la substance à travers les couches successives de la peau et enfin **l'absorption**, ou **la résorption**, qui correspond à l'entrée de la substance dans le système vasculaire (Wiechers 1989).

II.1.2.1. La couche cornée : barrière de la peau

La couche cornée, couche la plus superficielle de l'épiderme, joue un rôle important de barrière qu'elle assure en s'opposant aussi bien à la pénétration de substances exogènes auxquelles la peau est exposée qu'aux déperditions hydriques (Ya-Xian *et al.* 1999, Schmitt 2000, Hadgraft 2004, Martini 2006). Cette fonction de barrière de la couche cornée est rendue possible grâce à sa composition et à son organisation de type « mur de briques » (Schaefer *et al.* 1996).

La couche cornée peut également constituer un réservoir suite à l'insertion de substances fortement lipophiles au sein du ciment lipidique intercellulaire. La substance ainsi pénétrée peut ensuite lentement diffuser vers les couches inférieures du *stratum corneum* puis dans l'épiderme (Marty 1976, Roberts *et al.* 1998).

Enfin, la couche cornée peut être considérée comme un tamis puisque seules les particules de petite taille peuvent la traverser (Reddy *et al.* 2000, Barry 2002).

Notons que les jonctions intercellulaires (desmosomes) et la jonction dermoépidermique ne constituent pas des barrières importantes à la diffusion puisqu'elles n'empêchent que le passage de grosses molécules, c'est-à-dire de taille supérieure respectivement à 50 kDa et 40 kDa (Schaefer *et al.* 1996).

Par conséquent, l'absorption percutanée est essentiellement contrôlée par la couche cornée (Schaefer *et al.* 1996, Hadgraft 2001b, Hadgraft *et al.* 2003).

II.1.2.2. Les voies de pénétration cutanée

Le passage d'une substance à travers la couche cornée peut se faire selon trois voies (figure 18) : la voie intercellulaire, la voie transcellulaire ou encore le passage par les appendices cutanés (Schaefer *et al.* 1996, Hadgraft 2001b). Ces voies de passage ne s'excluent pas mutuellement, l'entrée d'éléments exogènes dans la peau se faisant souvent selon une combinaison de ces trois modes de pénétration.

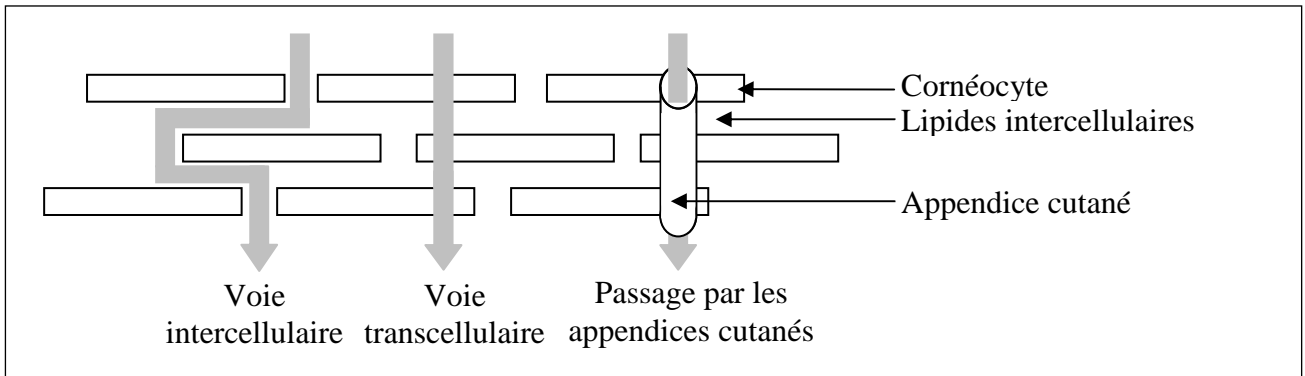


Figure 18. Les trois voies possibles de pénétration d'une substance dans la couche cornée qui est ici représentée selon le schéma « mur de briques » (Menon *et al.* 1998, Roberts *et al.* 2002).

La principale voie de pénétration à travers la couche cornée est la voie intercellulaire (Roberts *et al.* 1998, Hadgraft 2001b, Grams *et al.* 2002). Les lipides intercellulaires étant arrangés en bicouches, ils délimitent des espaces hydrophobes qui permettent le passage de molécules apolaires et des zones hydrophiles qui permettent le passage de molécules polaires (figure 19) (Bérard *et al.* 2003). Le passage intercellulaire se fait selon un chemin tortueux : une molécule doit parcourir environ 350 à 880 μm pour traverser la couche cornée, strate qui, pour rappel, ne mesure que 10 à 40 μm d'épaisseur (Potts *et al.* 1991, Schaefer *et al.* 1996, Bérard *et al.* 2003).

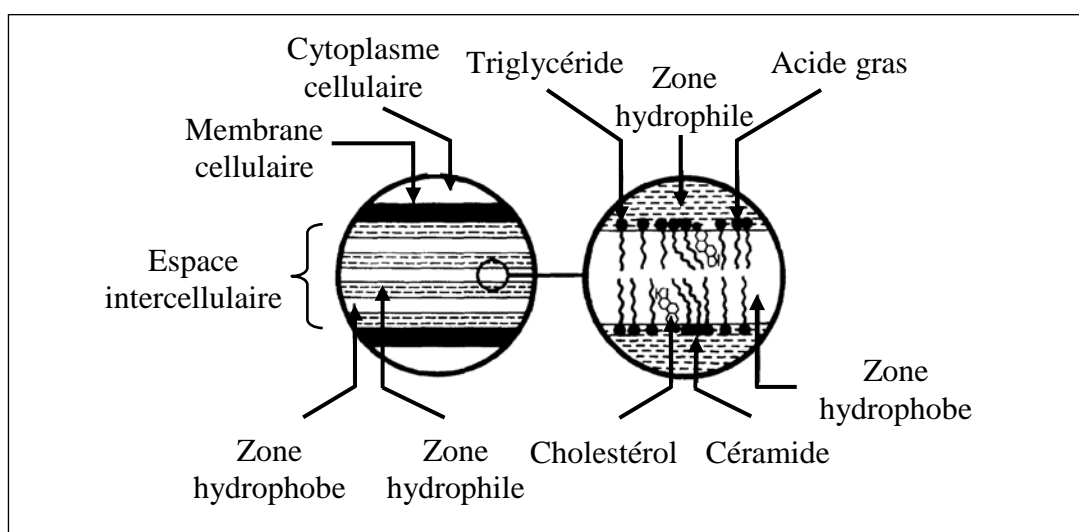


Figure 19. Structure des bicouches lipidiques intercellulaires de la couche cornée (Moghimi *et al.* 1996).

Le passage par la voie transcellulaire nécessite des transferts successifs à travers les cornéocytes polaires et l'espace intercellulaire apolaire. La distance parcourue par une molécule pour traverser la couche cornée selon cette voie correspond environ à l'épaisseur du *stratum corneum*, soit 10 à 40 μm (Bérard *et al.* 2003).

Le passage à travers les appendices cutanés a quant à lui souvent été considéré comme négligeable puisque ces appendices ne représentent que 0,1 % de la surface cutanée. Cependant, des études ont montré que cette voie peut conduire à une absorption percutanée significative (Illel *et al.* 1991, Hueber *et al.* 1994, Schaefer *et al.* 1996, Barry 2002, Bérard *et al.* 2003, Meidan *et al.* 2005).

II.1.2.3. La cinétique de diffusion percutanée

Après application d'une forme galénique destinée à l'administration cutanée, une molécule doit, pour être absorbée, diffuser depuis son véhicule dans la couche cornée, puis, à partir du *stratum corneum*, elle doit passer à travers les assises épidermiques et dermiques pour atteindre la circulation sanguine (figure 20).

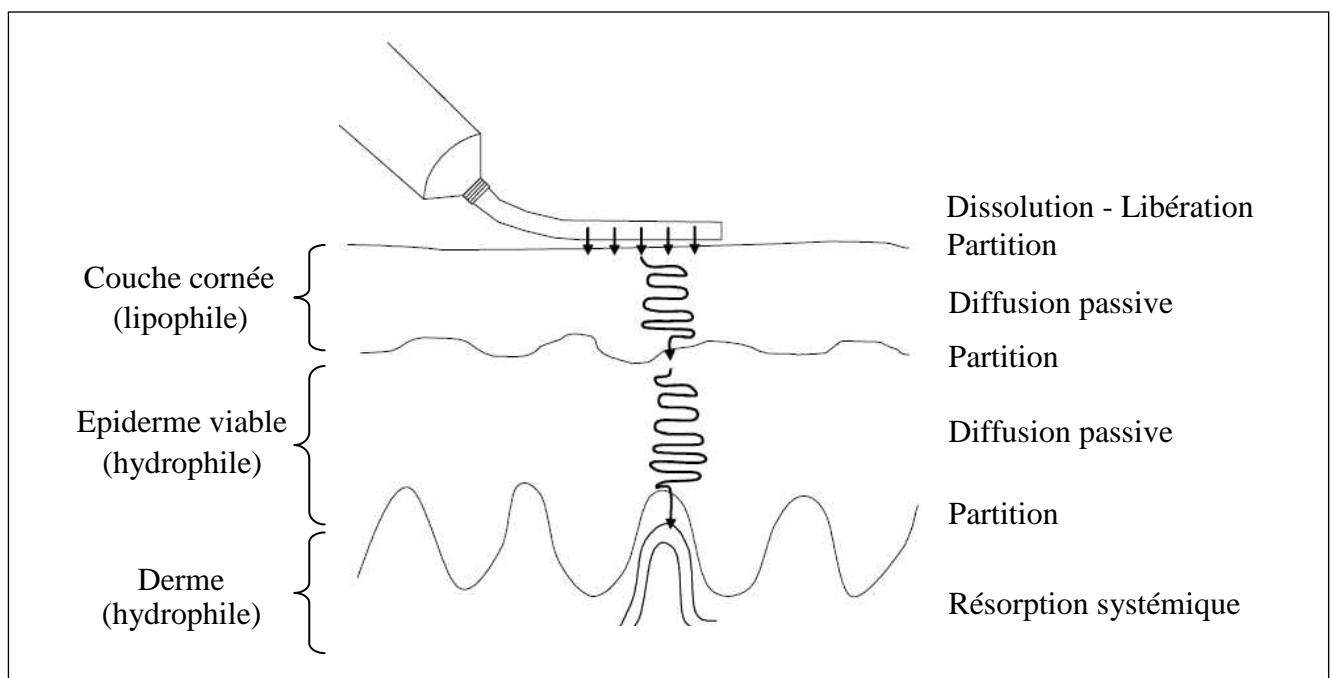


Figure 20. Représentation schématique de l'absorption percutanée d'un principe actif depuis son véhicule (Bucks *et al.* 1999, Pellanda 2006).

L'étape de pénétration débute par un partage de la substance étudiée entre son véhicule et la couche cornée. Ce partage est favorisé par la lipophilie du principe actif, c'est-à-dire son affinité pour les lipides (Marty 1976), et il est gouverné par le coefficient de partage (K) qui traduit l'affinité de la substance entre la couche cornée et son véhicule.

Une fois dans le *stratum corneum*, la substance diffuse de manière passive des strates les plus externes de la couche cornée, où la concentration en cette substance est élevée, vers les couches inférieures du *stratum corneum*, où la concentration est moindre (ECETOC 1993, Schaefer *et al.* 1996). Après une phase d'amorçage, le flux de substance qui diffuse à travers la couche cornée atteint un maximum qui se maintient tant qu'il reste une quantité suffisante de produit à la surface de la peau. Lorsque l'état d'équilibre est atteint, le flux est constant et la diffusion à travers le *stratum corneum* obéit à la première loi de Fick qui stipule que la vitesse de diffusion est proportionnelle à la différence de concentration de part et d'autre de la couche cornée (ΔC) et inversement proportionnelle à la distance parcourue par la molécule pour traverser la couche cornée (e) (Zatz 1993, Agache 2000, Martini 2006) :

$$J = \frac{K \times D \times \Delta C}{e} = K_p \times \Delta C \quad \text{(Equation 2)}$$

Où :

- J représente le flux massique de passage de la molécule étudiée à travers la couche cornée par unité d'aire et par unité de temps ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$),
- ΔC est la différence de concentration en substance d'intérêt entre la concentration déposée sur la peau et la concentration sous la couche cornée ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$),
- K est le coefficient de partage de la substance entre la couche cornée et son véhicule (sans unité),
- D est le coefficient de diffusion du composé dans la couche cornée ($\text{cm}^2 \cdot \text{h}^{-1}$) qui traduit la mobilité de la substance à travers le *stratum corneum*,
- e est la distance réellement parcourue par la molécule pour traverser la couche cornée (cm), distance souvent assimilée à l'épaisseur du *stratum corneum* qui constitue un paramètre plus facilement mesurable (*cf.* chapitre II § II.1.2.2),
- K_p est le coefficient de perméabilité qui traduit la vitesse de la diffusion ($\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$) et qui ne dépend que des caractéristiques de la molécule et de la couche cornée.

La molécule diffuse ensuite passivement à travers les assises épidermiques et dermiques pour être résorbée par la circulation sanguine. Le transfert à travers l'épiderme viable et le derme est fonction de l'hydrophilie de la molécule, c'est-à-dire de son affinité pour l'eau.

Il est donc nécessaire que la molécule soit à la fois liposoluble (soluble dans les lipides) et hydrosoluble (soluble en phase aqueuse) pour diffuser à travers les différents tissus qui composent la peau (Marty 1976).

La peau étant constituée d'un empilement de couches, le flux de diffusion global d'une molécule à travers la peau devrait s'exprimer par une somme de flux correspondant à la diffusion à travers ces différentes strates, chacune de ces couches présentant son propre jeu de paramètres K, D et e. Cependant, l'étape limitante de l'absorption cutanée étant la diffusion à travers la couche cornée, le flux global de la diffusion percutanée à l'état d'équilibre est déterminé selon l'équation 2 avec les paramètres K, D et e de la couche cornée (Zatz 1993, Hadgraft *et al.* 2003, Martini 2006).

II.1.2.4. Les facteurs affectant l'absorption cutanée

La peau ne constitue pas une barrière absolue à la pénétration. En effet, le degré d'absorption cutanée d'une substance varie en fonction de l'état de la peau, des propriétés physico-chimiques de la substance, de la forme galénique véhiculant cette substance et des conditions d'application. L'influence de ces différents facteurs sur l'absorption cutanée va à présent être décrite.

- **Influence des facteurs biologiques liés à la peau**

L'absorption cutanée varie tout d'abord en fonction du site anatomique au niveau duquel a lieu le dépôt de la substance (Wester *et al.* 1999c). En effet, l'absorption peut varier en fonction de l'épaisseur de la couche cornée et de la densité des appendices cutanés (Schaefer *et al.* 1996). Les zones anatomiques de l'homme ont alors été classées selon l'ordre de perméabilité décroissant suivant (Roberts *et al.* 2002) : scrotum > cuir chevelu > front > zone postauriculaire > abdomen > bras > paume des mains > plante des pieds.

Une élévation de la température conduit à une augmentation de la solubilité de la molécule dans son véhicule et de la diffusion de substances exogènes à travers la peau. De plus, elle s'accompagne de modifications physiologiques telles que l'accroissement du débit sanguin et de l'humidité conduisant à une augmentation de la résorption des substances par le sang (Schaefer *et al.* 1996). En effet, l'humidité influe sur l'absorption percutanée en entraînant une élévation du taux d'hydratation de la peau et notamment de la couche cornée conduisant à une altération de la structure de cette couche qui favorise le passage de substances à travers cette dernière (Schaefer *et al.* 1996, Surber *et al.* 2002, Martini 2006).

Certaines pathologies cutanées peuvent également altérer la fonction de barrière de la couche cornée en induisant une modification de sa composition pouvant entraîner une augmentation de l'absorption cutanée (Proksch *et al.* 2008).

Enfin, en cas d'altération de la couche cornée par des solvants ou par lésion de la peau, le *stratum corneum* ne joue plus son rôle de barrière à la diffusion. Par conséquent, une élévation de l'absorption cutanée peut alors être constatée (Bos *et al.* 2000, Tymen *et al.* 2002, Petitot *et al.* 2004, Nielsen 2005).

• Influence des caractéristiques physico-chimiques de la molécule

La taille et la polarité de la molécule sont les principaux facteurs influant sur sa diffusion percutanée (Seiller *et al.* 1996). La pénétration est facilitée lorsque la masse moléculaire est peu élevée, c'est-à-dire lorsqu'elle est, selon les auteurs, inférieure à 350 Da (Reddy *et al.* 2000) ou à 500 Da (Bos *et al.* 2000, Martini 2006). La valeur du coefficient de partage (K) influe également sur la pénétration de la molécule dans la peau. Ce paramètre, qui traduit la solubilité relative de la molécule et l'importance de sa fixation au sein de la couche cornée, ne reflète pas nécessairement son aptitude à la diffusion. En effet, les substances très lipophiles présentant un coefficient de partage élevé, de valeur supérieure à 4 (Reddy *et al.* 2000), peuvent être incapables de quitter la couche cornée pour diffuser dans l'épiderme vivant et le derme qui sont des structures aqueuses (Walters *et al.* 2002). Dans ce cas, elles s'accumulent dans le ciment intercellulaire du *stratum corneum*. Inversement, une substance très hydrophile présentant un coefficient de partage inférieure à 1 ne peut diffuser que si la peau est hydratée au maximum (ECETOC 1993, Tymen *et al.* 2002, Martini 2006). Les substances les plus aptes à pénétrer dans la peau sont donc des molécules amphiphiles qui présentent une bonne solubilité dans la couche cornée, l'épiderme viable et le derme, et qui montrent des valeurs de coefficient de partage comprises entre 1 et 3,5 (ECETOC 1993, Seiller *et al.* 1996, Hadgraft *et al.* 2003).

La forme de la molécule a également une influence sur son insertion au sein de la couche cornée, les molécules de forme ramassée ayant plus de facilité à s'insinuer entre les cellules cornées que les longues molécules linéaires plus ou moins ramifiées (Martini 2003).

Le coefficient de diffusion (D) de la molécule est affecté par l'établissement de liaisons hydrogène entre cette molécule et les constituants de la couche cornée, retardant ainsi la diffusion. Les groupements fonctionnels d'une molécule peuvent être classés en fonction de la force des liaisons hydrogène qu'ils sont susceptibles d'établir au sein du *stratum corneum* et donc en fonction de leur capacité à retarder la diffusion de la molécule dans cette couche de la peau (Hadgraft 2001b) selon l'ordre décroissant suivant : carboxylique > alcool > phénol > cétone > éther. Il a également été établi que lorsqu'une molécule peut établir plus de dix liaisons hydrogènes, sa perméabilité est considérée comme négligeable (Pugh *et al.* 1998, Cronin *et al.* 1999).

Le degré d'ionisation de la substance influe également sur l'absorption cutanée. L'emploi d'une molécule ionisée au pH de la surface cutanée, qui est compris entre 4,2 et 5,8 (Seiller *et al.* 1996), permet d'augmenter favorablement la solubilité de cette molécule dans un véhicule aqueux, ce qui conduit à une diminution du coefficient de perméabilité (K_p) et donc à une réduction de la vitesse de l'absorption cutanée (Hadgraft *et al.* 2000, Valenta *et al.* 2000).

Enfin, notons que pour des substances présentant un coefficient de partage supérieur à 4 et/ou une taille importante (supérieure à 350 Da), la desquamation peut participer à l'élimination de la substance de la surface de la peau (Reddy *et al.* 2000).

• **Influence de la forme galénique et des excipients**

L'absorption d'une molécule dépend inévitablement de la nature et de la forme du véhicule dans lequel cette molécule est introduite (Lalor *et al.* 1994). Le véhicule et les constituants de ce dernier doivent être choisis en fonction du degré de pénétration cutanée et de la vitesse de délivrance de la molécule souhaités. Ainsi, les formes galéniques ont été classées en trois catégories en fonction du degré de pénétration de la molécule atteint grâce à son véhicule : les formes cosmétiques qui permettent une délivrance de substances limitée à la surface de la peau, les formes topiques qui délivrent les composés dans les structures cutanées et enfin les formes transdermiques qui permettent la traversée de la peau et la résorption par la circulation systémique (Schaefer *et al.* 1996).

L'absorption cutanée peut être modulée par les constituants, ou excipients, de la forme galénique. Certaines molécules sont effectivement connues pour leur capacité à accélérer ou à retarder l'absorption cutanée par désorganisation de la couche cornée suite à leur insertion au sein des lipides (Hadgraft 2001b).

Dans le cas de véhicules particuliers, la taille des particules influe sur l'absorption cutanée (Shim *et al.* 2004, Vogt *et al.* 2005, Knorr *et al.* 2009). En effet, les particules solides de diamètre supérieur à 10 μm restent à la surface de la peau, celles de taille comprise entre 3 et 10 μm pénètrent dans les follicules pileux et les particules de taille inférieure à 3 μm pénètrent dans les couches les plus externes du *stratum corneum* (Rolland *et al.* 1993, Schaefer *et al.* 1996, Toll *et al.* 2004).

Le pH de la phase aqueuse de la forme galénique peut également affecter l'absorption cutanée en modifiant le degré d'ionisation de la substance, l'ionisation diminuant la vitesse d'absorption comme précédemment indiqué. En outre, l'intégrité de la barrière cutanée pourrait être affectée en cas d'endommagement du *stratum corneum* par un pH très élevé ou très bas, ce qui conduirait à une augmentation de la pénétration cutanée. Le pH de la surface cutanée étant compris entre 4,2 et 5,8 et la peau possédant un bon pouvoir tampon, il est recommandé que le pH de la phase aqueuse des formes galéniques destinées à l'usage cutané soit compris entre 4 et 7 (ECETOC 1993, Seiller *et al.* 1996, Hadgraft 2001a, Hadgraft 2001b).

• Influence des conditions d'application

L'absorption cutanée dépend de la dose appliquée, c'est-à-dire la quantité de substance déposée sur la peau (figure 21).

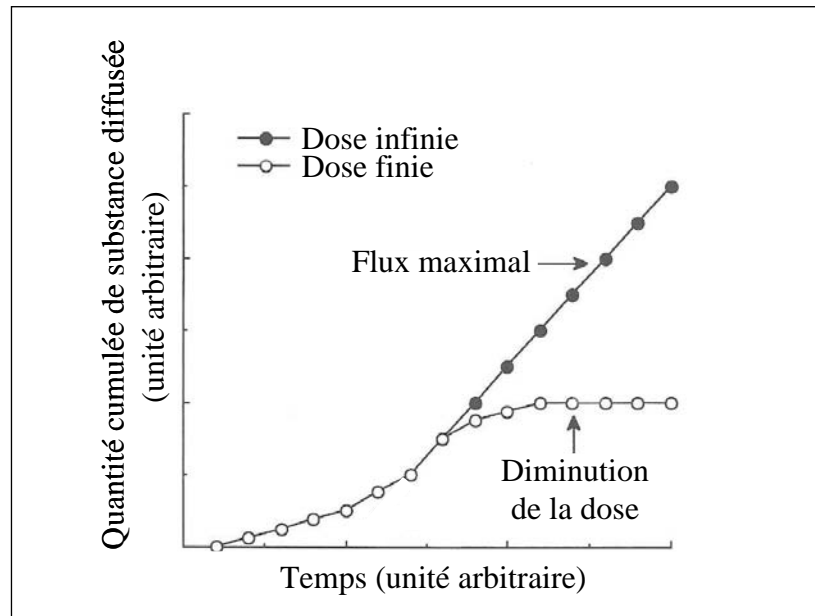


Figure 21. Quantité cumulée de substance ayant diffusée à travers la peau en fonction du temps et de la dose de produit appliquée sur la peau (Brain *et al.* 2002).

La dose est dite « infinie » lorsque la substance est appliquée en quantité bien supérieure à la quantité maximale pouvant être absorbée durant le temps d'application. La diminution de la concentration déposée au cours de l'absorption cutanée est alors négligeable, c'est pourquoi la dose appliquée paraît infinie. Cette condition permet d'atteindre le flux maximal d'absorption qui est gouverné par la première loi de Fick. En revanche, si la quantité de substance déposée sur la peau est insuffisante pour atteindre ou maintenir le flux d'absorption maximal, la dose est dite « finie ». Dans ce cas, la concentration déposée diminue significativement au cours du temps d'exposition, entraînant ainsi une diminution du flux d'absorption cutanée (Agache 2000, Brain *et al.* 2002, Surber *et al.* 2002).

Après application d'une dose de substance sur la peau, l'absorption cutanée varie en fonction de la surface de peau exposée ainsi que de la durée et de la fréquence d'application (Surber *et al.* 2002). Il est important de noter que, suite à l'élimination du produit déposé sur la peau par lavage, la proportion de substance ayant pénétré dans la couche cornée durant le temps d'application peut continuer à diffuser et atteindre la circulation sanguine (ECETOC 1993).

Enfin, l'occlusion de la surface de la peau par recouvrement avec un film imperméable ou par application d'une forme galénique contenant des huiles ou des cires connues pour leur pouvoir

occlusif modifie l'absorption cutanée. En effet, l'occlusion bloque au niveau de la surface cutanée la perte insensible en eau (PIE), ou transepidermal water loss (TEWL) en anglais, qui correspond à la diffusion passive naturelle de l'eau de l'intérieur vers l'extérieur du corps et qui est évaluée en moyenne à $5 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ (Martini 2006). Ceci conduit à une forte augmentation de l'hydratation de la couche cornée dont le contenu massique en eau passe d'environ 15 % à plus de 50 %. Cette surhydratation se traduit par un gonflement en eau des cornéocytes, une élévation du contenu en eau dans l'espace lipidique intercellulaire de la couche cornée, une augmentation de la température de la surface cutanée, qui passe de 32 à 37°C, et une augmentation du pH à la surface de la peau. En règle générale, l'occlusion conduit à une augmentation de l'absorption cutanée (Zatz 1993, Schaefer *et al.* 1996, Seiller *et al.* 1996, Bucks *et al.* 1999, Roberts *et al.* 2002, Golda *et al.* 2005).

II.2. Les modèles d'étude de la diffusion transdermique

Il existe trois grandes approches expérimentales pour apprécier l'absorption cutanée d'une substance : l'approche *in vivo* qui peut être menée chez l'homme ou chez l'animal, l'approche *ex vivo* qui emploie des explants cutanés d'origine humaine ou animale et l'approche *in vitro* qui est basée sur l'emploi de membranes mimant la peau. Ces différentes techniques vont être présentées dans les paragraphes suivants.

II.2.1. Modèles *in vivo*

Les mesures d'absorption cutanée *in vivo* sont réalisées sur des sujets vivants. Elles consistent à déposer une quantité connue de substance sur une aire déterminée de peau et à recueillir à des temps définis des échantillons de sang et d'excreta (fèces, urines) afin d'y déterminer la quantité de substance présente. Le dosage dans les excreta consiste en une méthode indirecte d'évaluation de l'absorption cutanée par suivi de l'élimination urinaire ou fécale de la molécule d'intérêt. La quantité de substance présente dans les fluides corporels étant très faible et souvent en dessous des limites de détection des techniques employées pour déceler la présence du produit, il est préférable de marquer la substance d'intérêt à l'aide d'isotopes radioactifs (Wester *et al.* 1999b) car la détection des molécules par suivi de la radioactivité qui leur est associée est beaucoup plus sensible. A cette procédure peut s'ajouter une détermination de la quantité de substance ayant pénétré dans le *stratum corneum* après un temps d'exposition déterminé. En effet, après élimination de la substance déposée, la méthode dite du « tape stripping », qui consiste en des applications successives d'adhésifs sur la surface cutanée, permet de récupérer les différentes strates de la couche cornée et d'y déterminer la quantité de substance présente. Des biopsies de peau peuvent également être réalisées afin de déterminer le contenu en molécule d'intérêt dans chaque couche cutanée (ECETOC 1993, Zatz 1993, Howes *et al.* 1996, Agache 2000).

La mesure de l'absorption cutanée sur des volontaires est considérée comme l'approche la plus satisfaisante pour fournir des données pertinentes et précises chez l'homme. Cependant, pour des raisons pratiques et éthiques, elle n'est pas toujours réalisable. C'est pourquoi des modèles animaux sont souvent employés. De nombreuses espèces animales ont été utilisées, mais la plus courante demeure le rat. Cependant, l'emploi d'un modèle animal peut conduire à une surestimation de l'absorption cutanée car la peau animale est généralement plus perméable que la peau humaine. En pratique, les animaux sont disposés dans des cages à métabolisme qui permettent le recueil des excréta et des gaz expirés par l'animal. L'emploi de molécules radiomarquées permet la réalisation d'un bilan de matière par la détermination de la quantité de substance présente dans les excréta, l'air expiré, le sang, la couche cornée et, après sacrifice de l'animal, dans les organes et la carcasse (Howes *et al.* 1996, OECD/OCDE-427 2004).

La microdialyse cutanée permet également d'accéder *in vivo* chez l'homme et l'animal à l'absorption cutanée d'une substance. Cette technique consiste à insérer une sonde constituée d'une membrane de dialyse perfusée dans le derme. La substance ayant diffusé à travers l'épiderme et se retrouvant dans le milieu extracellulaire du derme est récupérée par le fluide qui perfuse le tube de dialyse. La microdialyse cutanée présente le désavantage d'être invasive et l'insertion du cathéter peut être mal tolérée par le sujet (Anderson *et al.* 1998, Brain *et al.* 2002).

II.2.2. Modèles *ex vivo*

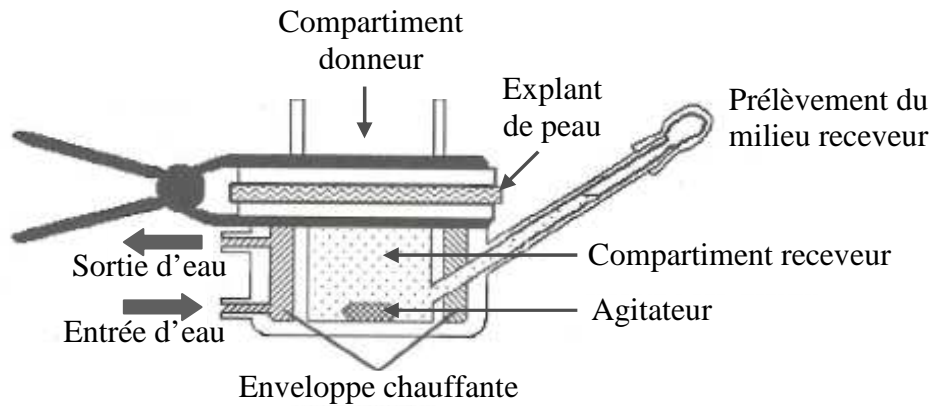
L'approche expérimentale *ex vivo* est largement employée pour quantifier l'absorption cutanée (Franz 1975). Elle consiste à déposer un explant de peau sur une cellule de diffusion également appelée cellule de Franz, la peau délimitant deux compartiments : un compartiment donneur, ou épidermique, et un compartiment receveur, ou dermique. La substance à étudier est déposée sur la face épidermique de l'explant et la face dermique est mise en contact avec un milieu receveur thermostaté qui assure le maintien de l'intégrité de la peau. La quantité de substance ayant diffusé à travers la peau est périodiquement dosée dans le milieu receveur. Il est important de noter que la propriété de barrière de la couche cornée est maintenue suite au prélèvement des échantillons de peau (Howes *et al.* 1996).

Il existe deux types de cellule de Franz : les cellules statiques, où le milieu receveur présente un volume fixe, et les cellules dynamiques, ou à flux continu, dans lesquelles le fluide receveur est constamment renouvelé. Les cellules peuvent être orientées horizontalement ou verticalement. Les différents types de cellule sont représentés sur la figure 22. Les cellules statiques offrent une mise en œuvre relativement plus simple que les autres types de cellule de diffusion. Cependant, le fait que le milieu receveur ne soit pas renouvelé provoque une accumulation de substance dans le liquide receveur qui peut conduire à un phénomène de saturation. Le gradient de concentration à l'origine de la diffusion cutanée disparaît alors, ce qui provoque l'arrêt de l'absorption cutanée. Les

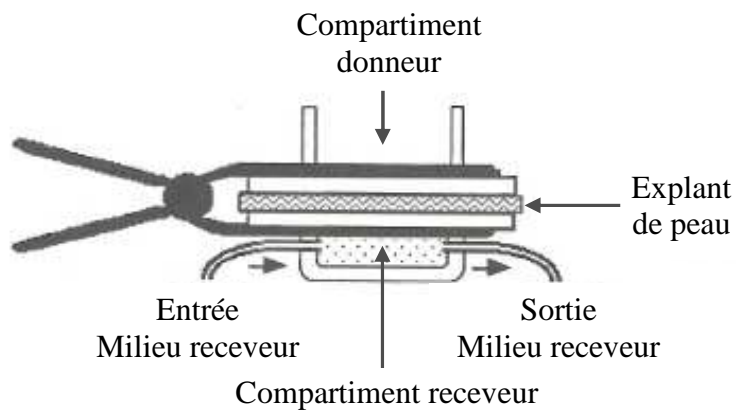
cellules dynamiques permettent de s'affranchir de ce problème d'accumulation de substance dans le milieu receveur, mais le renouvellement continu du fluide receveur nécessite l'emploi de techniques de détection de la substance diffusée plus sensibles que dans le cas des cellules statiques (Brain *et al.* 2002). Enfin, dans les cellules verticales, les compartiments donneur et receveur sont tous deux remplis. L'emploi de ces cellules est peu adapté à la mesure de l'absorption cutanée car les explants de peau peuvent être altérés suite à une hydratation excessive de la couche cornée causée par l'effet occlusif résultant du remplissage du compartiment donneur. Ce système est plus adapté pour la mesure des flux et des coefficients de partage et de diffusion (ECETOC 1993).

Le choix du liquide receveur est fonction des propriétés physico-chimiques de la substance à étudier et de la nécessité de maintenir l'intégrité de la peau. Il est recommandé que la concentration en substance diffusée dans le milieu receveur soit dix fois inférieure à sa limite de solubilité afin d'éviter tout phénomène de saturation (OECD/OCDE-428 2004) ; les conditions de passage percutané de la substance ainsi obtenues sont appelées conditions « sink ». Il est également nécessaire que le milieu receveur ne s'oppose pas au passage de la substance du derme vers le compartiment receveur, c'est pourquoi un agent solubilisant tel que l'albumine de sérum bovin peut y être ajouté (Bronaugh 1998). La température ayant une influence sur l'absorption cutanée, la cellule de diffusion doit assurer le maintien des explants à une température constante et proche de la température normale de surface de la peau, soit $32 \pm 1^\circ\text{C}$ (Brain *et al.* 1998, OECD/OCDE-428 2004). Enfin, une agitation continue du milieu receveur doit être maintenue (SCCNFP 2003) et le pH du fluide receveur doit être aussi proche que possible du pH physiologique de valeur 7,4 (Brain *et al.* 2002).

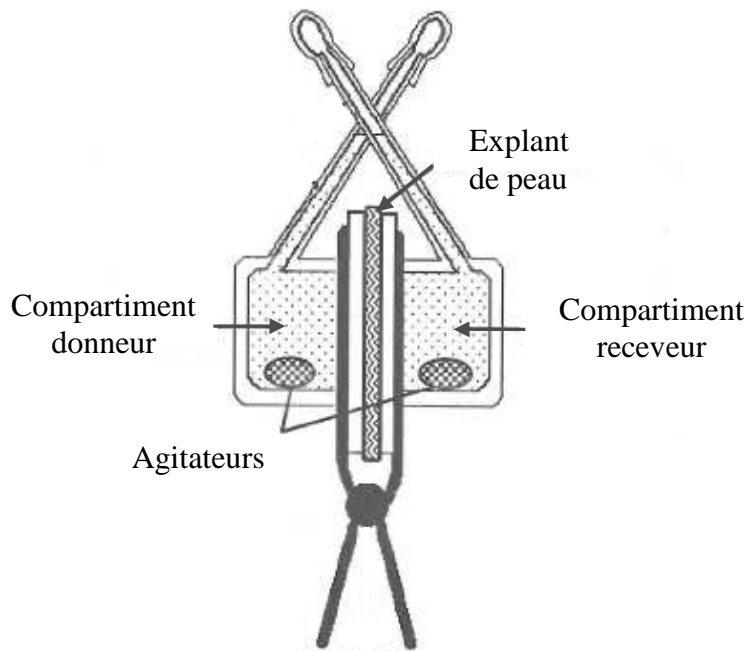
Les explants de peau peuvent être d'origine humaine, essentiellement obtenus suite à des plasties chirurgicales, ou d'origine animale. La peau fraîchement excisée doit être utilisée dans les 24 heures ou elle peut être conservée jusqu'à une année par congélation, la perméabilité de la peau n'étant pas altérée par ce processus de conservation (Bronaugh *et al.* 1986, SCCNFP 2003). Les études peuvent être menées sur des explants de peau entière dans lesquels l'épiderme et le derme sont présents, ou sur des explants dermatomés, c'est-à-dire d'épaisseur réduite (200 à 400 μm) suite à l'élimination du derme profond. En effet, la présence du derme profond et l'absence de circulation sanguine peuvent ajouter une barrière supplémentaire à la diffusion des molécules lipophiles qui s'accumulent dans le derme. Il est également possible de n'utiliser que la couche épidermique de la peau qui est obtenue en séparant l'épiderme du reste de l'explant par action thermique, chimique ou enzymatique. Cependant, ces traitements peuvent altérer la barrière cutanée (Zatz 1993).



Cellule horizontale statique



Cellule horizontale dynamique



Cellule verticale

Figure 22. Les différents types de cellule de diffusion (Brain *et al.* 2002).

Il est essentiel que les explants de peau soient correctement préparés car toute manipulation inappropriée peut endommager la couche cornée. Afin de vérifier le maintien de la fonction de barrière de la peau, l'intégrité des explants cutanés doit être mesurée par des méthodes physiques ou chimiques. Les méthodes les plus couramment utilisées sont la mesure de la perte insensible en eau (PIE), qui augmente en cas de lésion, l'étude du passage percutané d'une substance de référence et la mesure de la résistance électrique de la peau. En règle générale, l'intégrité de la peau ne peut être maintenue en cellule de diffusion au-delà de 24 heures (SCCNFP 2003, OECD/OCDE-428 2004).

L'obtention d'explants de peau humaine étant difficile, des explants cutanés d'origine animale sont souvent employés. Cependant, tout comme dans le cas des études *in vivo*, la peau animale est plus perméable que la peau humaine (Bronaugh *et al.* 1999). Ainsi, les modèles de peau animale ont été classés en fonction de leur capacité à représenter la perméabilité de la peau humaine dans des expérimentations *ex vivo* selon l'ordre croissant suivant : souris < lapin < rat < cochon d'inde < porc < primate. L'emploi de modèles animaux dits « hairless » semble être préférable car ils présentent un système pileux extrêmement peu développé et une densité de glandes sébacées proche de celle de l'homme (Illel *et al.* 1991, Howes *et al.* 1996). Le modèle de peau animale le plus représentatif de la peau humaine et le plus aisément accessible est la peau de porc (Bartek *et al.* 1972, Simon *et al.* 2000, SCCNFP 2003, Hadgraft 2004) et, plus particulièrement, la peau située sur la face externe des oreilles de cet animal (Jacobi *et al.* 2007).

Les mesures *ex vivo* de l'absorption cutanée d'une substance peuvent être menées en condition occlusive, par recouvrement de l'explant de peau à l'aide d'un film occlusif, en condition semi-occlusive ou encore non occlusive. Enfin, la mise en œuvre de la technique dite du « tape stripping » (*cf.* chapitre II § II.2.1) sur les montages de peau dans des cellules de diffusion permet d'accéder à la quantité de substance présente dans la couche cornée.

Les conditions expérimentales *ex vivo* sont donc contrôlées, seuls les explants de peau employés et les substances testées varient (Brain *et al.* 2002).

II.2.3. Modèles *in vitro*

La mesure de l'absorption cutanée selon l'approche *in vitro* est basée sur l'emploi de cellules de diffusion, tout comme pour les expérimentations *ex vivo*, mais les explants de peau sont remplacés par des membranes synthétiques (Shah *et al.* 1989, Dias *et al.* 1999, Clément *et al.* 2000, Geinoz *et al.* 2002) ou de la peau reconstituée ou cultivée (Rheinwald *et al.* 1975, ESAC 2007, ESAC 2008, Schäfer-Korting *et al.* 2008, Macfarlane *et al.* 2009). Cette approche présente l'avantage d'éviter l'emploi d'animaux de laboratoire. Cependant, les membranes cultivées et artificielles ne constituent actuellement pas une alternative fiable pour la prévision de l'absorption percutanée à travers la peau humaine (Schmook *et al.* 2001, SCCNFP 2003, Schäfer-Korting *et al.* 2008).

Ces différentes approches expérimentales de mesure de l'absorption cutanée d'une substance ont été employées dans le secteur nucléaire afin d'étudier le passage percutané des radionucléides en cas de contamination cutanée. Une revue bibliographique des études menées sur la diffusion de l'uranium à travers la peau va à présent être présentée.

II.3. Physiologie de la contamination cutanée par l'uranium

La contamination par voie cutanée peut avoir lieu suite à une contusion, une brûlure chimique, (Bérard *et al.* 1994), une brûlure thermique, une piqûre (Bailey *et al.* 2003), une plaie (Piechowski *et al.* 2003, Blanchin *et al.* 2004), une excoriation ou encore un dépôt de radionucléides sur la peau non lésée. Les zones corporelles principalement concernées par cette voie d'entrée des radioéléments dans l'organisme sont les mains, la tête et les membres supérieurs et inférieurs.

Dans cette section du manuscrit de thèse seront tout d'abord présentées les principales études qui ont été réalisées sur l'absorption cutanée de l'uranium. Le modèle de biocinétique de l'uranium suite à une contamination cutanée sera ensuite exposé. Enfin, les travaux menés sur le développement de traitements d'urgence adaptés à la contamination cutanée par l'uranium seront discutés.

II.3.1. L'absorption cutanée de l'uranium

La contamination par voie cutanée représentant un mode de contamination préoccupant dans l'industrie nucléaire (*cf.* chapitre I § I.3.2) et l'uranium étant un élément toxique situé au cœur du cycle du combustible nucléaire (*cf.* chapitre I § I.2 et § I.4), plusieurs travaux portant sur l'étude de l'absorption cutanée de l'uranium ont été menés afin d'évaluer le risque d'exposition interne des individus en cas de contamination par ce radioélément par voie cutanée.

Ce paragraphe dédié à l'étude de la contamination cutanée par l'uranium est divisé en deux grandes parties : la première partie est consacrée à l'étude de l'absorption cutanée de l'uranium à travers une peau intacte et la seconde partie porte sur l'étude du passage de l'uranium à travers des blessures provoquées au niveau du tissu cutané.

II.3.1.1. Absorption cutanée de l'uranium à travers la peau intacte

Les travaux menés sur l'étude de l'absorption cutanée de l'uranium à travers la peau intacte semblent indiquer que la peau constitue une bonne barrière contre l'entrée de l'uranium dans l'organisme.

En effet, Tymen *et al.* (Tymen *et al.* 2000a) et Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2004) ont mis en évidence au cours d'études menées *ex vivo* en cellule de Franz sur des explants de peau entière, c'est-à-dire des explants constitués de l'épiderme et du derme, que le passage de l'uranium à travers

la peau intacte est faible. Dans leurs travaux, Tymen *et al.* (Tymen *et al.* 2000a) ont étudié la diffusion d'une solution de nitrate d'uranyle (composé transférable d'uranium) de pH = 1 contenant 1 µg d'uranium à travers des explants de peau dorsale de rat et à travers des explants de peau abdominale humaine. Les auteurs ont constaté après 2 heures de contamination que 0,04 % et 0,2 % de l'uranium déposé ont traversé respectivement la peau humaine et la peau de rat et sont retrouvés dans les milieux receveurs des cellules de diffusion. Le fait que le passage de l'uranium soit significativement plus important à travers les explants de peau de rat qu'à travers les explants de peau humaine indique que ce modèle de peau animale a tendance, en cellule de Franz, à surestimer l'absorption cutanée qui a lieu chez l'homme. Les travaux menés par Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2004) sur la cinétique du passage percutané d'une solution de nitrate d'uranyle de pH = 1 contenant 1,4 µg d'uranium à travers des explants de peau provenant de rats hairless ou d'oreilles de porc ont montré que des quantités significatives d'uranium sont retrouvées dans le milieu receveur des cellules de diffusion au bout de 3 à 4 heures. A l'issue de 24 heures d'exposition, 2,71 % de l'uranium déposé sont passés à travers la peau de rat contre 33,94 % à travers la peau d'oreille de porc. Selon F. Petitot (communication personnelle), le passage anormalement élevé de l'uranium à travers la peau d'oreille de porc serait dû à une altération de la fonction de barrière de la peau d'oreille de porc suite à l'ébouillantage des oreilles à l'abattoir.

D'après ces deux études menées ex vivo en cellule de diffusion, il apparaît que le passage de l'uranium sous forme transférable (nitrate d'uranyle) à travers la peau entière intacte est faible et relativement lent (de 2 à 4 heures).

La diffusion de l'uranium à travers la peau entière non lésée étant faible mais non nulle, des études ont été menées afin de déterminer les mécanismes et la cinétique de diffusion de l'uranium dans et à travers les structures cutanées.

Ainsi, De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983) ont montré dans une étude menée *in vivo* sur des rats que la diffusion de l'uranium à travers les différentes couches de l'épiderme a principalement lieu selon la voie intercellulaire et que ce radioélément franchit la couche cornée en quelques minutes. Au cours de ces travaux, divers composés d'uranium ont été testés : le nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$, soluble), l'uranyle tricarbonat d'ammonium ($(\text{NH}_4)_4\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3$, soluble), le diuranate d'ammonium (yellow cake, $\text{U}_2\text{O}_7(\text{NH}_4)_2$, moyennement soluble), l'acétate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$, moyennement soluble) et le dioxyde d'uranium (UO_2 , faiblement soluble). Entre 30 et 420 mg d'uranium, sous forme de ces divers composés véhiculés par une émulsion de type huile dans eau, ont été déposés sur le dos des rats après élimination des poils par rasage. Le choix d'une forme émulsionnée en tant que véhicule des composés d'uranium a certainement été réalisé dans l'objectif d'augmenter la solubilité des composés d'uranium peu solubles. Cependant, notons que l'emploi d'un tel véhicule peut modifier la pénétration cutanée de l'uranium

(cf. chapitre II § II.1.2.4). Après un temps d'exposition défini, les animaux ont été euthanasiés et l'uranium a été localisé dans les tissus cutanés par microscopie électronique et spectroscopie de rayons X. Ainsi, les auteurs ont pu observer que de l'uranium se trouve dans l'espace intercellulaire entre la couche cornée et la couche granuleuse seulement **15 minutes** après une contamination par du nitrate d'uranyle. Suite au franchissement de la couche cornée, barrière de la peau, l'uranium migre dans l'espace intercellulaire des couches épineuse et basale pour atteindre, 24 heures après la contamination, les vaisseaux sanguins du haut du derme. De faibles passages de l'uranium par les appendices cutanés et par la voie transcellulaire ont également été mis en évidence. Aucune pénétration cutanée des autres composés d'uranium n'a été observée avec les techniques employées, et ce, même après des contaminations répétées. Les travaux de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b) menés *in vivo* sur des rats hairless montrent quant à eux que de l'uranium est présent dans le derme **30 minutes** après le dépôt sur la peau des rats d'une solution de nitrate d'uranyle de pH = 1 contenant entre 238 et 476 µg d'uranium ou après dépôt de nitrate d'uranyle sous forme de poudre. Comme le derme est une structure cutanée vascularisée, l'uranium qui s'y trouve peut être résorbé par la circulation sanguine, ce qui signifie que la pénétration de l'uranium dans le sang débiterait bien avant le délai de 24 heures déterminé dans les travaux de De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983). Il est alors très fortement probable que l'entrée initiale de l'uranium dans le compartiment sanguin n'ait pas pu être mise en évidence dans l'étude de De Rey *et al.* à cause de la forte dilution du radioélément dans le volume sanguin qui rend sa détection difficile. Cependant, d'après les observations de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b), l'incorporation de l'uranium demeure faible puisque le radioélément n'est détecté de façon significative dans les urines qu'après 24 heures de contamination.

Ces études menées in vivo chez le rat montrent que l'uranium sous sa forme la plus transférable (nitrate d'uranyle en solution ou sous forme de poudre) est capable de franchir la couche cornée en 15 minutes et de diffuser dans l'épiderme par la voie intercellulaire pour atteindre la circulation sanguine environ 30 minutes après la contamination. En comparant ces données avec celles précédemment obtenues ex vivo en cellule de diffusion, il apparaît que le modèle d'étude ex vivo sur peau entière ne tient pas compte de la faible résorption sanguine de l'uranium qui a lieu dans les parties supérieures du derme.

Une partie de l'uranium déposé sur la peau est donc capable de diffuser à travers les différentes strates cutanées et d'atteindre la circulation sanguine en moins de 30 minutes. Même si d'après les travaux présentés ci-dessus le passage de l'uranium à travers la peau intacte est faible, des manifestations de la toxicité de l'uranium suite à ce type de contamination ont été observées au cours de plusieurs études.

De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983) ont observé au cours de travaux menés *in vivo* chez le rat que des dommages apparaissent au niveau des tissus cutanés 2 jours après l'application sur la peau de nitrate d'uranyle. Ces dommages se traduisent par un détachement de la couche cornée, la présence d'un exsudat purulent abondant sur la surface épidermique, la migration de cellules du système immunitaire à travers l'épiderme, le gonflement de cellules dans les couches basale et épineuse, l'élargissement de la zone intercellulaire et enfin une hypertrophie des follicules pileux et des glandes sébacées correspondantes. Quatre jours après l'application cutanée, tous les composants tissulaires sont atrophiés. Ubios *et al.* (Ubios *et al.* 1997) ont également constaté *in vivo* chez le rat des altérations de la peau suite à une contamination cutanée chronique par une forte quantité d'uranium. Dans ces travaux, 12 mg d'oxyde d'uranium (U_3O_8 , peu soluble) véhiculés par une émulsion de type huile dans eau, à l'image des études de De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983), ont été déposés quotidiennement durant une période de 30 jours sur la peau dorsale rasée de rats. A l'issue de ces 30 jours, une diminution significative de l'épaisseur de l'épiderme a été observée suite à la contamination cutanée quotidienne par l'uranium, passant de $41 \pm 14 \mu m$ pour la peau saine à $21 \pm 10 \mu m$, ainsi qu'une augmentation significative de la perméabilité cutanée. De plus, il a été constaté que ces altérations de structure et de perméabilité sont conservées 60 jours après l'arrêt des contaminations.

Au-delà de cette toxicité localisée au niveau cutané, De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983) ont constaté la mort de tous les rats suite à une importante toxicité rénale après une application quotidienne pendant 5 jours de nitrate d'uranyle. Ils ont également observé que l'uranyle tricarbonat d'ammonium ($(NH_4)_4UO_2(CO_3)_3$, soluble) s'est révélé être aussi toxique que le nitrate d'uranyle en entraînant la mort des rats contaminés après une application quotidienne du contaminant pendant 5 jours. Les contaminations par du diuranate d'ammonium (yellow cake, $U_2O_7(NH_4)_2$, moyennement soluble) et de l'acétate d'uranyle ($UO_2(CH_3COO)_2$, moyennement soluble) ont quant à elles provoqué une perte de poids transitoire disparaissant après l'arrêt de la contamination ainsi que la mort de certains rats. Enfin, ils ont remarqué que la contamination cutanée par du dioxyde d'uranium, composé d'uranium le moins soluble parmi tous ceux testés, n'a provoqué ni perte de poids, ni mort des rats. Le fait que les composés d'uranium moyennement transférables n'aient pas été détectés dans la peau et dans le sang par les techniques de détection employées dans cette étude (microscopie électronique et spectroscopie de rayons X) alors que leurs effets toxiques ont été observés soutient l'hypothèse formulée plus haut selon laquelle ces techniques ont des limites de détection trop élevées qui ne permettent pas de détecter de faibles quantités d'uranium. Lopez *et al.* (Lopez *et al.* 2000) ont également observé des manifestations de la toxicité de l'uranium suite à son passage à travers la peau. L'objectif de leur étude consistait à étudier *in vivo* chez le rat l'influence de l'aire de peau exposée et du temps de contamination sur l'absorption cutanée de l'uranium. Des rats ont donc été contaminés quotidiennement durant 4 jours

par dépôt sur la peau épilée de leur dos de 600 mg d'uranium sous forme de nitrate d'uranyle véhiculé par une émulsion de type huile dans eau. Les auteurs ont mis en évidence une toxicité rénale ainsi qu'une mortalité des rats d'autant plus importants que le temps et la surface d'exposition cutanée étaient élevés, la mortalité pouvant atteindre 100 % à 24 heures. Dans le cadre de l'étude de l'effet du temps d'exposition sur l'absorption cutanée de l'uranium, une altération osseuse a également été mise en évidence pour des temps d'exposition allant jusqu'à 8 heures, temps au-delà duquel aucun rat n'a survécu.

Il apparaît donc que, même si le passage de l'uranium à travers la peau intacte est faible et lent, l'incorporation de ce radioélément peut être suffisamment importante en cas de contact prolongé ou répété entre l'uranium et la surface cutanée pour conduire à l'apparition d'effets toxiques. La connaissance des paramètres étendue de la zone cutanée contaminée et temps de contact avec le contaminant a ainsi été identifiée comme étant cruciale dans la prise en charge des individus contaminés afin d'estimer la dose d'uranium incorporée par la voie cutanée.

Les travaux discutés dans cette partie dédiée à l'étude de l'absorption cutanée de l'uranium à travers la peau intacte et résumés dans le tableau 8 ont tendance à montrer que la peau constitue une bonne barrière contre l'entrée de l'uranium dans l'organisme. Ils soulignent cependant le fait que les accidents de contamination par l'uranium sur une peau intacte ne doivent pas être négligés car, s'ils ne sont pas pris en charge, ils peuvent conduire à une exposition interne non négligeable des individus. En effet, il a été constaté dans les études de De Rey *et al.* (De Rey *et al.* 1983) et de Lopez *et al.* (Lopez *et al.* 2000) que, lorsque la peau intacte est mise en contact durant plusieurs heures avec de l'uranium, le passage de ce radioélément à travers la peau devient suffisamment important pour induire une toxicité pouvant entraîner la mort des animaux de laboratoire. Lopez *et al.* (Lopez *et al.* 2000) ont également montré *in vivo* chez le rat que le rinçage de la peau intacte contaminée par de l'uranium à l'aide d'une eau savonneuse dans les 15 minutes suivant la contamination permet d'éviter la mort des rats mais n'empêche pas l'apparition d'une toxicité rénale. Il est donc nécessaire de traiter dans l'urgence les contaminations de la peau intacte par l'uranium et, pour cela, de nouveaux systèmes de décontamination plus efficaces que le simple lavage par de l'eau savonneuse doivent être développés.

Tableau 8. Absorption cutanée de l'uranium à travers la peau intacte.

Référence	Objectif de l'étude	Modèle d'étude	Contamination cutanée par l'uranium						Résultats
			Composé de U	Quantité de U	Volume déposé	Aire cutanée contaminée	Epaisseur de la peau	Durée	
De Rey et al. 1983	Localisation de U dans les structures cutanées	<i>In vivo</i> Rat Wistar Peau dorsale rasée	-UO ₂ (NO ₃) ₂ -(NH ₄) ₄ UO ₂ (CO ₃) ₃ -U ₂ O ₇ (NH ₄) ₂ -UO ₂ (CH ₃ CO ₂) ₂ -UO ₂ (émulsion huile/eau)	30 à 420 mg	1 ml	3 cm ²	X	1 fois/j 10 j	*UO ₂ (NO ₃) ₂ : -U traverse la couche cornée en 15 min par la voie intercellulaire -U retrouvé dans les capillaires sanguins du haut du derme après 24 h -Mort de tous les rats contaminés en 5 jours *Pas de pénétration significative des autres composés de U dans la peau mais toxicité parfois constatée
Tymen et al. 2000a	Comparaison de la cinétique de diffusion de U à travers la peau de rat et la peau humaine	<i>*In vivo</i> Peau dorsale de rat hairless ----- <i>*Ex vivo</i> - peau dorsale de rat hairless - peau abdominale humaine	Solution de UO ₂ (NO ₃) ₂ pH 1	1 µg (360 Bq en ²³³ U)	100 µl	1,4 cm ²	X ----- Peau entière	2 h	*Validation de l'emploi de cellules de Franz pour l'étude de l'absorption cutanée de U *Peau intacte = bonne barrière *Peau dorsale de rat = surestime le passage percutané de U qui a lieu à travers la peau humaine
Petitot et al. 2004	Etude de la cinétique de diffusion percutanée de U en cellule de Franz	<i>Ex vivo</i> -peau dorsale de rat hairless ----- - peau d'oreille de porc	Solution de UO ₂ (NO ₃) ₂ pH 1	1,4 µg (500 Bq en ²³³ U)	100 µl	1,77 cm ²	Peau entière 1,50 mm ----- 1,34 mm	24 h	*U traverse la peau entière en 3 à 4 h *Faible passage percutané de U (2,7 % à 24 h) *Majeure partie de l'uranium déposé retrouvée dans l'épiderme à 24 h (~15 %) *Peau intacte = bonne barrière
Ubios et al. 1997	Effets à long terme sur la peau de la contamination cutanée par U	<i>In vivo</i> Rat Wistar Peau dorsale rasée	U ₃ O ₈ (émulsion huile/eau)	12 mg (2,6.10 ⁻⁹ Bq)	0,25 ml	3 x 5 cm	X	1 fois/j 30 j	*Contamination à long terme : ↓ épaisseur épiderme ↓ perméabilité cutanée
Lopez et al. 2000	Etude de l'influence sur le passage percutané de U : - de l'aire de peau contaminée ----- - du temps de contamination	<i>In vivo</i> Rat Wistar Peau dorsale épilée	UO ₂ (NO ₃) ₂ (émulsion huile/eau)	600 mg	1 ml	0,5 à 16 cm ² ----- 8 cm ²	X	1 fois/j 4 j ----- 1 min à 24 h	*Mortalité ↑ quand la surface de peau contaminée ↑ et le temps de contamination ↑ *Rinçage de la peau contaminée avec de l'eau savonneuse 15 min après la contamination permet la survie de 100% des rats mais subsistance de problèmes rénaux
Petitot et al. 2007a et 2007b	Influence de la forme chimique sous laquelle se trouve U sur sa cinétique de diffusion percutanée	<i>In vivo</i> Rat Wistar Peau dorsale rasée Condition occlusive	Poudre de UO ₂ (NO ₃) ₂ ----- Solution pH 1 de UO ₂ (NO ₃) ₂ (U appauvri)	2,844 mg ----- 238 et 476 µg	X ----- 200 µl	1,77 cm ²	X	24 h	*U retrouvé dans le derme 30 min après la contamination quelle que soit la forme chimique de U

II.3.1.2. Passage percutané de l'uranium en cas de blessure

La nature des blessures pouvant être à l'origine d'une contamination interne lors de la manipulation par l'homme de divers composés d'uranium au cours des étapes de traitement du combustible nucléaire est très variée (coupure, piqûre, brûlure chimique...). Plusieurs travaux visant à étudier le comportement de l'uranium dans et à travers ces différents types de blessures ont été menés afin d'estimer l'exposition interne des individus faisant l'objet de blessures contaminées et d'adapter la prise en charge de ces blessés.

- **Blessure superficielle**

Les premiers travaux qui vont être présentés traitent du passage de l'uranium à travers une blessure considérée comme superficielle : la brûlure chimique provoquée par une solution acide ou basique. Ces études révéleront que l'incorporation de l'uranium varie en fonction du degré de brûlure.

En effet, dans leurs travaux, Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b) ont étudié *in vivo* sur des rats hairless le passage percutané de 238 à 476 µg d'uranium sous forme de solution de nitrate d'uranyle à travers une peau ayant subi des brûlures chimiques provoquées par des solutions d'acide nitrique (HNO₃ à 0,1 N, 2 N, 5 N et 14 N), d'acide fluorhydrique (HF à 10 N) et d'hydroxyde de sodium (NaOH à 10 N). Ces solutions ont été choisies car elles sont réellement employées au cours de certaines étapes du traitement du combustible nucléaire. Les auteurs ont démontré que, paradoxalement, la vitesse de l'absorption cutanée diminue lorsque la gravité de la brûlure augmente. Ceci s'explique par l'apparition d'œdèmes dont l'importance augmente avec la gravité de la brûlure, allant jusqu'à la nécrose des vaisseaux sanguins situés dans la zone contaminée pour les contaminations les plus acides, ce qui empêche la résorption sanguine. L'uranium est alors essentiellement retenu au niveau de la brûlure. En effet, au bout de 6 heures d'exposition, environ 99 % du contenu total de l'organisme en uranium y sont retenus en cas de brûlure par HNO₃ 14 N et 5 N, contre environ 70 % dans le cas d'une brûlure avec HNO₃ 2 N ainsi que pour la peau intacte. L'incorporation de l'uranium suite à une brûlure par une solution d'acide nitrique est alors retardée. Il a également été mis en évidence que la quantité d'uranium excrétée dans les urines durant les deux premières heures suivant une brûlure par une solution d'acide nitrique contaminée est inférieure à celle excrétée par les rats non contaminés. Ce phénomène serait expliqué par une acidification du milieu sanguin consécutive à la brûlure acide qui favoriserait la réabsorption tubulaire rénale de l'uranium (*cf.* chapitre I § I.4.1.3). L'excrétion de l'uranium par la voie urinaire ne devient alors significative que 6 heures après la contamination. Ceci pourrait avoir d'importantes conséquences dans le suivi radiotoxicologique des individus contaminés suite à ce

type de blessure puisque la quantification de l'uranium excrété dans les urines durant les premières heures suivant la contamination sous-estimerait la quantité d'uranium réellement incorporée.

L'étude *in vivo* chez le rat de l'influence du pH de la solution contaminée sur l'absorption cutanée de l'uranium dans le cas d'une peau lésée réalisée par Fukuda *et al.* (Fukuda *et al.* 2009a) vient confirmer les observations faites dans les travaux de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b). Dans cette étude, la blessure est simulée par une injection sous-cutanée de 4 et 16 mg d'uranium par kilogramme de rat sous forme de solution de nitrate d'uranyle de pH = 1 et pH = 7. Les résultats de ces travaux indiquent que, indépendamment de la quantité d'uranium injectée, la quantité d'uranium retenue au niveau du site d'injection 1 heure après la contamination est supérieure dans le cas de la contamination à pH acide. En effet, ~ 60 % de l'uranium injecté sont retenus dans la plaie suite à la contamination à pH = 1 contre ~ 35 % à pH = 7. Le fait que l'uranium ne se trouve pas initialement sous la même forme chimique en fonction du pH de la solution contaminée peut en partie expliquer ces résultats. De plus, l'altération des tissus cutanés entourant le site d'injection observée à pH = 1 peut également expliquer la plus forte rétention de l'uranium au niveau de la blessure dans le cas de la contamination la plus acide, ce qui est en accord avec les études de Petitot *et al.* précédemment décrites (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b). D'autre part, il a été observé que, 24 heures après l'injection sous cutanée, l'excrétion de l'uranium par la voie urinaire est plus importante suite à la contamination à 4 mg.kg⁻¹ avec l'élimination de 6 % de l'uranium injecté indépendamment du pH de la solution contaminée, contre ~ 3 % et 1,4 % pour la contamination à 16 mg.kg⁻¹ aux pH respectifs de 1 et 7. Parallèlement, la quantité d'uranium retrouvée dans les matières fécales à 24 heures est plus importante dans le cas de la contamination à pH = 7 (~ 24,5 % de l'uranium injecté quelle que soit la concentration déposée) que dans le cas de la contamination à pH = 1 (~ 4 % de l'uranium injecté pour la contamination à 4 mg.kg⁻¹ et ~ 8 % pour la contamination à 16 mg.kg⁻¹). Il semble donc que, suite à une contamination à pH = 7, la quantité d'uranium entrée dans le sérum dépasse la capacité de filtration des reins. L'excrétion par la voie fécale *via* le foie semble alors être plus efficace que l'excrétion urinaire. Enfin, quels que soient la concentration et le pH de la solution contaminée, la toxicité de l'uranium s'est manifestée chez les rats par des dommages rénaux sévères pouvant aller jusqu'à la nécrose des tissus.

L'incorporation de l'uranium suite à une contamination cutanée par brûlure chimique apparaît difficile à estimer car elle varie en fonction de la gravité de la brûlure, la rétention de l'uranium dans les tissus cutanés étant d'autant plus importante que le degré de brûlure est élevé. De plus, l'analyse radiotoxicologique des urines récoltées dans les premières heures suivant la contamination par une solution acide d'uranium peut sous-estimer l'incorporation de l'uranium.

D'autres modèles de blessure peu profonde ont également été étudiés afin de les comparer au modèle de brûlure chimique précédemment présenté.

Ainsi, Petitot *et al.* ont complété leur étude du passage de l'uranium à travers la peau lésée avec un autre modèle de blessure obtenu par excoriation, c'est-à-dire par élimination de la couche cornée par « tape stripping » (*cf.* chapitre II § II.2.1). Cette étude a été menée *ex vivo* en cellule de diffusion par dépôt de 1,4 µg d'uranium sous forme d'une solution de nitrate d'uranyle de pH = 1 sur des explants de peau excoriée provenant de rats hairless (Petitot *et al.* 2004) et *in vivo* par dépôt d'une solution de nitrate d'uranyle de pH = 1 contenant entre 238 et 476 µg d'uranium sur la peau dorsale de rats hairless excoriée (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b). Ces études *ex vivo* et *in vivo* ont mis en évidence un passage significatif de l'uranium à travers la peau excoriée au bout de **30 minutes**, alors que dans le cas de la peau saine le délai avait été estimé *in vivo* à 24 heures (De Rey *et al.* 1983) et *ex vivo* à environ 3,5 heures (Petitot *et al.* 2004). Il a été constaté qu'en plus de conduire à une diminution du délai de pénétration de l'uranium dans l'organisme, l'excoriation est à l'origine d'une forte augmentation de la quantité d'uranium traversant la peau. En effet, la fraction d'uranium diffusée à travers la peau au bout de 24 heures de contamination déterminée dans les études *ex vivo* passe de 2,71 % dans le cas de la peau intacte à 78,05 % dans le cas de la peau excoriée (Petitot *et al.* 2004) et elle passe dans les études *in vivo* de 0,4 % à travers la peau non lésée à 38 % à travers la peau excoriée (Petitot *et al.* 2007a).

En regroupant l'ensemble des données obtenues dans les études de Petitot *et al.* (Petitot *et al.* 2004, Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b), il devient possible de classer les différents types de blessures étudiés dans ces travaux en fonction de la vitesse de translocation de l'uranium du site de dépôt vers les organes cibles selon l'ordre croissant suivant : 14 N HNO₃ < 10 N NaOH < peau intacte < 5 N HNO₃ < 2 N HNO₃ < 10 N HF < peau excoriée.

D'autres équipes se sont plus particulièrement intéressées aux effets toxiques découlant d'une contamination par l'uranium sur une blessure superficielle consistant en une écorchure réalisée *in vivo* sur des souris avec une lame de rasoir (Xu *et al.* 2008). Une solution de nitrate d'uranyle contenant 150 mg d'uranium a été déposée sur les écorchures et le taux de survie des souris a ensuite été suivi au cours du temps. Les auteurs ont constaté que, 10 jours après la contamination, 58 % des souris contaminées n'ont pas survécu et que les souris vivantes ont quant à elles perdu environ 30 % de leur masse corporelle. La majorité de l'uranium déposé a été retrouvée dans les reins des souris avec une concentration moyenne de 0,58 mg d'uranium par gramme de rein.

Les travaux menés ex vivo et in vivo sur des modèles de blessure superficielle (excoriation, écorchure) qui sont regroupés dans le tableau 9 ont permis de mettre en évidence le rôle de barrière joué par la couche cornée face à la diffusion de l'uranium à travers la peau. En effet, en absence de couche cornée ou en cas de blessure permettant à la contamination de franchir cette

barrière, la diffusion de l'uranium est plus importante et plus rapide que dans le cas de la contamination d'une peau intacte. Il apparaît donc qu'en cas de contamination suite à une blessure superficielle, pouvant à priori paraître sans gravité, la rapidité du passage de l'uranium dans la circulation sanguine (moins de 30 minutes) nécessite une prise en charge rapide et adaptée.

- **Blessure profonde**

Les travaux qui vont à présent être discutés sont consacrés à l'étude du passage de l'uranium à travers des blessures profondes. Ces blessures résultent de la mauvaise manipulation d'objets contondants ou coupants et, comme il le sera démontré, elles sont à l'origine d'une rapide et forte exposition interne des individus.

En effet, Houpert *et al.* (Houpert *et al.* 2004) ont étudié *in vivo* chez le rat la diffusion de l'uranium à travers ces deux types de blessures profondes : la blessure réalisée par un objet coupant a été modélisée par un dépôt intramusculaire d'uranium et la blessure consécutive à la mauvaise manipulation d'un objet contondant a été représentée par un dépôt intermusculaire d'uranium. Les auteurs ont pour cela pratiqué une incision sur une patte de chaque rat et ont déposé en intramusculaire ou en intermusculaire une solution de nitrate d'uranyle de pH = 5 contenant environ 700 ng d'uranium. Après 10 minutes de contamination, il a été constaté qu'environ 70 % de l'uranium déposé sont retenus dans les espaces intra et intermusculaires et que la teneur en uranium dans le corps entier, soustraite du contenu du site de contamination, est de 30 % pour les deux modèles de blessure. Le transfert de l'uranium à la circulation sanguine est ensuite significativement plus important en cas de contamination intramusculaire. En effet, dès 15 minutes de contamination, ~ 25 % de l'uranium déposé se trouvent encore au niveau du site de contamination intramusculaire contre ~ 55 % en cas de contamination intermusculaire et, parallèlement, la teneur en uranium dans le corps entier, soustraite du contenu du site de contamination, passe à 75 % pour la contamination intramusculaire et à 45 % pour la contamination intermusculaire.

L'incorporation d'uranium sous forme soluble (nitrate d'uranyle) est donc plus importante et plus rapide (quelques minutes) en cas de coupure qu'en cas de contusion.

Plusieurs autres études du passage de l'uranium à travers une plaie profonde ont été menées, mais elles ne se focalisent cependant que sur le modèle de contamination intramusculaire. Le modèle de blessure employé dans ces travaux diffère de celui de Houpert *et al.* (Houpert *et al.* 2004) car la blessure est modélisée par une injection intramusculaire. Dans leurs travaux, Fukuda *et al.* (Fukuda *et al.* 2005, Fukuda *et al.* 2009b) ont injecté en intramusculaire à des rats

entre 1,5 et 23,9 mg d'uranium appauvri sous forme de solution de nitrate d'uranyle aux pH = 1 et 3,2 et ils ont étudié la survie des animaux en fonction du temps. Ils ont constaté que la mortalité suite à des dommages rénaux était d'autant plus importante et rapide que la dose administrée était élevée. Les auteurs ont également observé dans le cas de la contamination à pH = 1 une importante rétention de l'uranium au niveau du site d'injection, c'est-à-dire dans le muscle, allant jusqu'à 96 % de la quantité d'uranium injectée 6 jours après la contamination, ainsi qu'une lente diffusion de l'uranium du muscle vers la circulation sanguine. Par ailleurs, Houpert *et al.* (Houpert *et al.* 2001) ont étudié *in vivo* chez le rat l'influence du type de composé d'uranium sur l'incorporation de ce radioélément suite à la contamination par blessure profonde. Ils ont pour cela pratiqué des injections intramusculaires de solutions de pH = 5 contenant 0,66 µg d'uranium sous la forme nitrate d'uranyle (composé transférable) et 63 µg d'uranium sous forme de tétraoxyde d'uranium (UO₄, composé peu transférable). Les résultats de cette étude montrent que, un jour après l'injection, 2 % de l'uranium injecté sous forme de nitrate d'uranyle sont retenus au niveau du site d'injection, 52,3% sont excrétés dans les urines et 33,4% sont retenus dans le squelette. Concernant l'injection de tétraoxyde d'uranium, 31,5% de l'uranium sont retenus au niveau du site d'injection un jour après la contamination, 26,3% sont excrétés dans les urines alors que 21,2 % et 18,5% sont retenus respectivement dans le squelette et dans les reins. Au bout de 3 jours, une augmentation de l'excrétion urinaire de l'uranium injecté sous forme de tétraoxyde d'uranium est observée, avec une élimination de 41,1 % de l'uranium injecté, alors que la rétention dans le squelette (24,7%) et dans les reins (17,5%) ne varie pas de façon significative. Enfin, Hengé-Napoli *et al.* (Hengé-Napoli *et al.* 1999) ont constaté que, 24 heures après une injection intramusculaire chez des rats d'une solution de nitrate d'uranyle de pH = 4,2 contenant approximativement 930 ng d'uranium, environ 1,5 % de l'uranium injecté étaient retenus au niveau du site d'injection, environ 17 % et 37 % étaient retrouvés respectivement dans les reins et le squelette et en moyenne 40 % de l'uranium avaient été excrétés dans les urines. Globalement, un jour après la contamination, 55 % de l'uranium injecté étaient encore présents dans les organismes des rats, ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans l'étude de Houpert *et al.* (Houpert *et al.* 2001) précédemment décrite.

L'incorporation de l'uranium en cas de blessure profonde contaminée dépend donc du pH de la solution contaminée et du type de composé d'uranium en présence. En effet, la rétention de l'uranium au niveau des plaies profondes est plus importante en cas de contamination acide et pour les composés d'uranium les moins solubles. Ceci conduit à un retardement de la distribution du radioélément dans l'organisme. Ce phénomène avait été également observé dans le cas de la contamination d'une peau intacte (De Rey *et al.* 1983) et dans le cas de blessures superficielles contaminées par de l'uranium (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b).

Le dernier modèle de blessure profonde étudié correspond à l'insertion de fragments contaminés par de l'uranium sous la peau.

Cette étude menée par Pellmar *et al.* (Pellmar *et al.* 1999) a porté sur une blessure réalisée chez le rat par implantation intramusculaire de 4, 10 et 20 fragments d'uranium appauvri et a consisté à suivre durant 18 mois la diffusion de l'uranium dans les organismes. Des quantités significatives d'uranium ont ainsi été retrouvées dans les reins et les os dès le premier jour de l'étude chez les rats ayant été implantés avec les plus fortes doses d'uranium et dans un délai de 12 à 18 mois dans le cas des rats implantés avec la plus faible dose d'uranium. Il a parallèlement été remarqué une augmentation de la quantité d'uranium fixée dans les os avec le temps d'exposition pour les groupes les plus fortement contaminés. Des quantités significatives d'uranium ont également été retrouvées dans le foie et la rate 1 mois après l'implantation pour ces mêmes groupes de rats et après un délai de 6 mois pour les rats les moins exposés. Enfin, concernant le groupe de rats le plus fortement contaminé, il a été remarqué que le taux d'uranium dans le plasma sanguin ne devient significativement plus élevé que celui des rats non contaminés qu'au bout de 6 et 18 mois et que l'excrétion de ce radioélément par la voie urinaire croît durant 6 mois et se stabilise passé ce délai. Notons que de l'uranium a également été retrouvé en quantité d'autant plus importante que la contamination correspondante était forte dans le cerveau et les testicules des rats, respectivement 1 mois et 18 mois après l'insertion des fragments d'uranium appauvri.

La contamination suite à l'insertion de fragments contaminés par de l'uranium sous la peau est très préoccupante car ces fragments constituent des réservoirs à partir desquels le radioélément peut diffuser au cours du temps et conduire à l'apparition d'effets toxiques à long terme.

L'ensemble des travaux menés sur l'étude du passage de l'uranium à travers des blessures profondes est résumé dans le tableau 10.

Référence	Objectif de l'étude	Modèle d'étude	Contamination cutanée par l'uranium				Durée	Résultats
			Composé de U	Quantité de U	Volume déposé	Aire cutanée contaminée		
Petitot et al. 2004	Etude de la cinétique de passage de U à travers la peau excoriée en cellule de Franz	<i>Ex vivo</i> Peau dorsale de rat hairless et peau d'oreille de porc excoriées (tape stripping)	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ pH 1	1,4 µg (500 Bq en ^{233}U)	100 µl	1,77 cm ²	24 h	*U traverse la peau excoriée en 30 min *Passage percutané de U ↑ fortement en cas d'excoriation (comparaison avec la peau intacte) *Couche cornée = barrière de la peau
Petitot et al. 2007a et 2007b	Comparaison de la cinétique de diffusion de U à travers différents modèles de blessure : brûlures chimiques et excoriation (tape stripping)	<i>In vivo</i> Rat Wistar Peau dorsale rasée Condition occlusive	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ (U appauvri)	238 et 476 µg	200 µl	1,77 cm ²	24 h	*U retrouvé dans le derme à 30 min, quel que soit le type de blessure étudié *Rétention de U au niveau du site contaminé ↑ lorsque l'acidité de la solution contaminée et donc la gravité de la brûlure ↑ - Passage percutané de U retardé *L'analyse radiotoxicologique des premières urines sous-estime l'incorporation de U en cas de brûlure acide (rétention de U au niveau de la blessure contaminée) *Passage de U à travers la peau excoriée (30 min) + important qu'à travers la brûlure chimique et la peau intacte *Classement du type de blessure en fonction de la vitesse de translocation de U
Xu et al. 2008	Etude des effets toxiques découlant d'une contamination par U sur une peau écorchée	<i>In vivo</i> Souris Ecorchure réalisée sur la peau dorsale avec une lame de rasoir	Solution de $UO_2(NO_3)_2$	150 mg	3 gouttes	1 cm ²	10 j	*Contamination d'une peau excoriée entraîne : -mort de plus de la moitié des souris contaminées à 10 j -perte de masse corporelle significative des souris ayant survécu à 10 j *Uranium incorporé est concentré dans les reins
Fukuda et al. 2009a	Influence du pH de la solution contaminée et de la concentration en U sur l'incorporation de U	<i>In vivo</i> Rat Wistar Injection sous-cutanée	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ (U appauvri) pH 1 et 7	0,72 et 2,88 mg	0,27 ml	X	1, 3, 6 et 24 h	*Excrétion par voie fécale de U incorporé + efficace que l'excrétion par voie urinaire en cas de forte contamination *Rétention de U au niveau du site contaminé en cas de contamination acide *pH de la solution contaminée = facteur déterminant pour la rétention de U au niveau de blessure

Tableau 9. Passage de l'uranium à travers une blessure superficielle.

Référence	Objectif de l'étude	Modèle d'étude	Contamination cutanée par l'uranium				Résultats
			Composé de U	Quantité de U	Volume	Durée	
Hengé-Napoli et al. 1999	Etude de la distribution de U dans l'organisme en cas de contamination cutanée par plaie profonde	<i>In vivo</i> Rat Sprague Dawley Injection intramusculaire	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ pH 4,2	0,93 µg	X	1 à 4 j	*Faible rétention de U au niveau du site d'injection *~50 % de la quantité de U injectée est retenue dans les reins et le squelette et ~40 % sont éliminés par la voie urinaire à 24 h
Houpert et al. 2001	Influence du type de composé de U sur le passage de U à travers une blessure profonde	<i>In vivo</i> Rat Sprague Dawley Injection intramusculaire	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ et de UO_4 pH 5	0,66 µg ----- 63 µg	X	1 à 3 j	*Le composé le moins transférable (UO_4) est + retenu que le composé soluble ($UO_2(NO_3)_2$) au niveau du site d'injection *~1/3 de la quantité de U injectée est retenu dans les reins et le squelette et 1/3 à 1/2 de la quantité de U injectée est éliminé par la voie urinaire
Houpert et al. 2004	Comparaison de la cinétique de diffusion de U à travers 2 types de blessure profonde	<i>In vivo</i> Rat Sprague Dawley Dépôts intra et intermusculaire après incision	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ pH 5	0,7 µg (248 Bq)	50 µl	5, 1à, 15, 30, 60 min et 24 h	Transfert de U à la circulation sanguine + important et + rapide en cas de coupure (intramusculaire) qu'en cas de contusion (intermusculaire)
Fukuda et al. 2005 et 2009b	Etude de la toxicité de U en cas de contamination cutanée par plaie profonde	<i>In vivo</i> Rat Wistar Injection intramusculaire	Solution de $UO_2(NO_3)_2$ (U appauvri) pH 3,2 ----- pH 1	1,5 à 23,94 mg 1,5 mg	X 3,7 µl	7 j 6 j	*Rétention de U au niveau du site d'injection dans le cas de la contamination la plus acide *Apparition de dommages rénaux *Mortalité des rats ↑ quand quantité de U injectée ↑
Pellmar et al. 1989	Etude de la toxicité de U en cas de contamination par insertion de fragments contaminés par U sous la peau	<i>In vivo</i> Rat Sprague Dawley Insertion intramusculaire de débris solides de U appauvri	Fragments de U appauvri	4, 10 et 20 fragments	X	1 j à 18 mois	*Fragments contaminés sous peau = réservoir de U qui diffuse au cours du temps *Détection de U dans les reins, les os dès le 1 ^{er} jour pour les rats les plus fortement contaminés. Détection de U dans le cerveau et les testicules

Tableau 10. Passage de l'uranium à travers une blessure profonde.

Les travaux discutés dans cette partie dédiée à l'étude de l'absorption cutanée de l'uranium à travers des blessures montrent clairement que l'incorporation de l'uranium est plus rapide et plus importante en cas de blessure qu'en cas de contamination sur une peau non lésée. Il ressort également de ces travaux que, dans le cas d'une contamination par une solution acide, la rétention de l'uranium au niveau d'une blessure superficielle ou profonde conduit à un retardement de son passage dans la circulation sanguine et que l'analyse radiotoxicologique des premières urines des victimes contaminées sous-estimerait la dose d'uranium incorporée.

En conclusion, il apparaît que l'étude de la physiologie de la contamination cutanée par l'uranium est complexe. Elle dépend de nombreux facteurs tels que la quantité d'uranium déposée, la forme chimique de l'uranium, le pH en cas de contamination par une solution aqueuse, la durée d'exposition, l'étendue de la zone cutanée contaminée, la présence ou non de blessure et le type de blessure. Chaque contamination cutanée par l'uranium peut donc être considérée comme un cas particulier auquel correspond une cinétique particulière d'incorporation du radionucléide.

Cependant, certaines tendances peuvent être dégagées indépendamment de l'état dans lequel se trouve la peau (intacte ou lésée) :

- l'incorporation de l'uranium sous une forme transférable est plus rapide et plus importante que l'incorporation de composés d'uranium moins solubles,
- l'exposition interne des individus est d'autant plus forte que la quantité d'uranium déposée, la surface contaminée et le temps de contact entre le contaminant et la zone cutanée sont importants,
- la rétention de l'uranium au niveau de la zone contaminée est d'autant plus longue que le pH de la solution contaminée est acide, entraînant ainsi un retardement de la diffusion de l'uranium dans l'organisme.

Grâce aux diverses études menées sur l'absorption cutanée de l'uranium et d'autres éléments chimiques, un modèle biocinétique de plaie contaminée a pu être développé. Ce modèle, présenté dans le chapitre suivant, permet d'estimer le niveau d'exposition interne des individus ayant été contaminés par blessure.

II.3.2. Le modèle biocinétique de la contamination cutanée par l'uranium

Dans la publication 78 de la Commission Internationale de Protection Radiologique (ICRP-78 1997), la contamination cutanée est reconnue comme une voie potentielle d'entrée des radionucléides dans l'organisme. La peau intacte y est considérée comme une barrière suffisante contre l'entrée des radionucléides dans l'organisme. Ce texte souligne également l'absence d'un modèle biocinétique général de la contamination cutanée qui s'explique par la multiplicité des scénarios de contamination cutanée possibles.

Ce n'est que récemment qu'un modèle de biocinétique des radionucléides dans les blessures contaminées a été proposé par le National Council on Radiation Protection and Measurements aux Etats-Unis (NCRP), en collaboration avec la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) (NCRP 2007). Le nombre de données concernant les contaminations cutanées chez l'homme étant réduit, ce modèle a été établi d'après des données expérimentales obtenues sur des modèles animaux. Des injections intramusculaire et sous-cutanée ont été employées comme modèle de plaie pour les contaminations par des composés solubles. Les composés insolubles ont quant à eux été déposés dans les blessures.

Le modèle biocinétique de plaie contaminée représenté sur la figure 23 est composé de cinq compartiments représentant le site de blessure (compartiments ❶ à ❺) et de deux compartiments recevant le radionucléide éliminé de la plaie, qui sont le sang et les ganglions lymphatiques (compartiments ❻ et ❼).

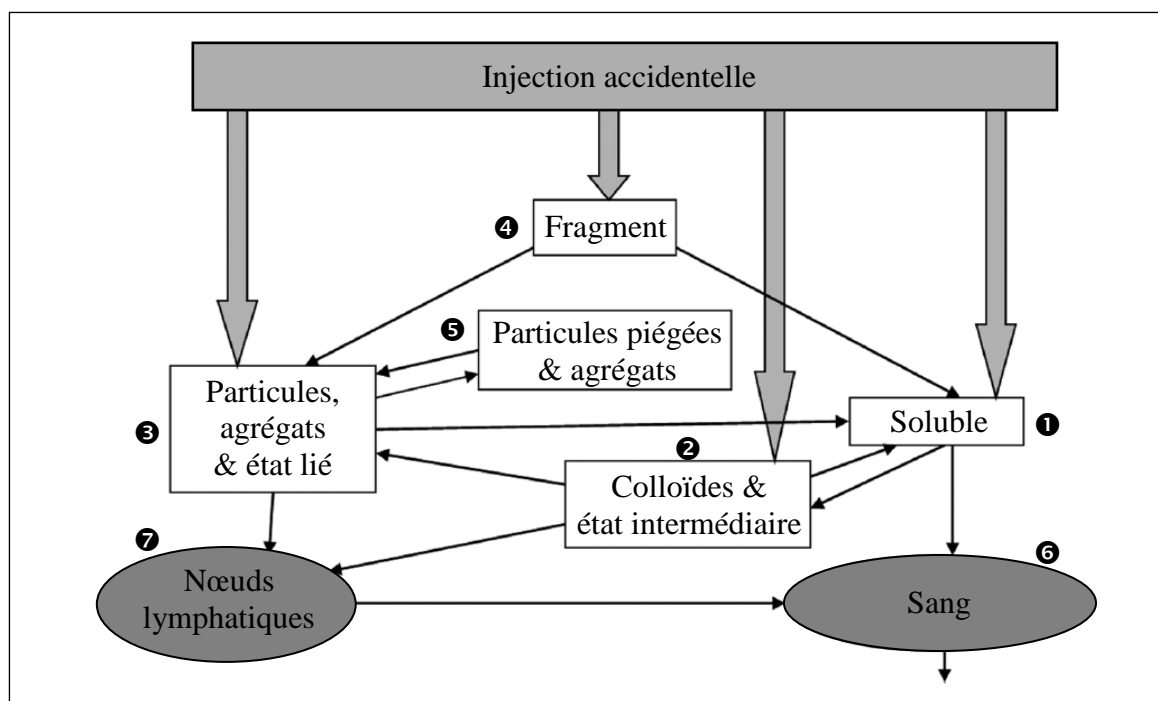


Figure 23. La modèle biocinétique de plaie contaminée par des radionucléides (NCRP 2007).

Ce modèle biocinétique compartimental va à présent être décrit.

Lorsque des radionucléides pénètrent dans la blessure sous forme soluble, ils entrent directement dans le compartiment ❶ « soluble ». Le comportement du radionucléide est alors fortement contrôlé par sa chimie en solution aqueuse et en particulier par sa tendance à l'hydrolyse au pH neutre régnant au niveau de la blessure (*cf.* chapitre I § I.1.2 pour la chimie de l'uranium en solution aqueuse). L'hydrolyse affecte non seulement la forme physique sous laquelle se trouve le radionucléide en le faisant passer de l'état solubilisé à l'état solide, mais également sa capacité à se lier à des ligands endogènes. Effectivement, l'hydrolyse conduisant à la disparition de la charge du radionucléide, ce dernier ne peut plus diffuser dans le compartiment sanguin ❷ sous forme ionisée ou liée à des ligands biologiques (Guilmette *et al.* 2003) ; il passe alors dans le compartiment ❷ « colloïdes et état intermédiaire ». Une partie du radionucléide présent dans ce compartiment peut retourner dans le compartiment ❶ « soluble », et une autre part est convertie en une forme plus insoluble et passe dans le compartiment ❸ « particules, agrégats et état lié ». Pour les composés solubles, la principale voie d'élimination depuis le site de blessure est la voie systémique ❸, l'élimination des particules issues de l'hydrolyse par la voie lymphatique ❹ dépendant de la tendance du radionucléide à l'hydrolyse.

Les compartiments directement atteints suite à une contamination par insertion de débris solides contaminés dans la plaie dépendent de la taille de ces débris. En effet, les « particules », débris de diamètre inférieur à 20 µm pouvant être phagocytés, entrent dans le compartiment ❸ « particules, agrégats et état lié ». Les fragments, débris de taille supérieure à 20 µm ne pouvant pas être phagocytés, passent dans le compartiment ❹ « fragments ». Enfin, les colloïdes entrent dans le compartiment ❷ « colloïdes et état intermédiaire ». Notons que les colloïdes ont principalement pour origine l'hydrolyse des composés solubles. Suite à leur dégradation *in situ*, les fragments peuvent donner des particules et des atomes dissouts qui passent respectivement dans les compartiments ❸ « particules, agrégats et état lié » et ❶ « soluble ». De même, les particules peuvent migrer dans et hors de la blessure sous la forme d'atomes dissouts (compartiment ❶ « soluble »). La principale différence de comportement entre les composés solubles et insolubles réside dans la voie d'élimination. En effet, les composés solides qui ont des vitesses de solubilisation lentes peuvent montrer une clairance significative de la blessure vers les nœuds lymphatiques. De plus, la présence de débris dans la blessure peut conduire à l'apparition d'une réaction inflammatoire de l'organisme dont l'objectif est d'isoler le corps étranger des tissus sains, ce qui a pour conséquence une séquestration des débris qui passent dans le compartiment ❸ « Particules piégées & agrégats » et qui ne peuvent alors plus être éliminés de la blessure.

En couplant ce modèle biocinétique de plaie au modèle systémique de l'uranium (*cf.* figure 9, chapitre I § I.4.1.4), il devient possible de connaître la biocinétique globale de ce radioélément suite à une contamination cutanée.

Il apparaît donc très clairement que la contamination cutanée, sur une peau saine ou lésée, constitue une voie d'entrée préoccupante de l'uranium dans l'organisme pouvant conduire à de graves conséquences sanitaires. Malgré cela, aucun traitement spécifique de décontamination des zones cutanées ou des plaies contaminées visant à limiter l'incorporation de l'uranium n'est disponible.

II.4. Innovations récentes dans le traitement d'urgence spécifique de la contamination cutanée par l'uranium

En cas de contamination par voie cutanée par des radionucléides, le seul traitement d'urgence disponible dans l'industrie nucléaire consiste en un lavage de la zone cutanée contaminée avec de l'eau, de l'eau savonneuse ou encore, comme recommandé par l'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN), avec une solution de Ca-DTPA (ASN 2008) (*cf.* chapitre I § I.5.2).

Cependant, des études portant sur la décontamination cutanée de toxiques chimiques tels que les pesticides ont montré que le lavage de la peau peut parfois conduire à une augmentation de l'absorption cutanée du toxique. Ce phénomène, appelé « wash-in effect », serait principalement expliqué par une élévation du taux d'hydratation cutanée suite au lavage ainsi que par une détérioration de la couche cornée provoquée par les agents tensioactifs constitutifs des savons (Wester *et al.* 1999a, Moody *et al.* 2006). De plus, les travaux menés *in vitro* sur de la poudre de couche cornée par Tymen (Tymen 2000) ont mis en évidence la faible capacité des lavages à l'eau pure ou savonneuse à désorber l'uranium adsorbé sur les particules de couche cornée. Quant au lavage d'une peau contaminée avec la solution de DTPA recommandé par l'ASN, il ne constitue pas un protocole de décontamination adapté au cas de la contamination cutanée par l'uranium, car, comme précédemment mentionné dans le paragraphe I.5.2 du chapitre I, le DTPA n'est pas un bon chélateur de l'uranium. Enfin, l'excision chirurgicale, ultime recours en cas de forte présence de radionucléides dans la plaie contaminée, est souvent pratiquée tardivement et ne permet pas toujours de retirer la totalité du radionucléide qui y est présent (Bailey *et al.* 2003). Il est donc nécessaire que de nouveaux traitements d'urgence des plaies contaminées soient mis à la disposition des travailleurs de l'industrie nucléaire.

Quelques équipes scientifiques ont alors cherché à développer des systèmes de décontamination cutanée différents des lavages. Le nombre restreint de travaux menés dans ce domaine permet de présenter ces derniers en détail dans cette partie du manuscrit de thèse.

Houpert *et al.* (Houpert *et al.* 2001) ont testé *in vivo* chez le rat l'efficacité de décontamination d'une injection intramusculaire d'une solution d'acide carballylique amido biphosphonique (CAPBP, figure 24) suite à une contamination par plaie profonde simulée par une injection intramusculaire de deux composés d'uranium en solution : le nitrate d'uranyle, composé soluble, et le tétraoxyde d'uranium (UO_4), composé peu soluble. La quantité de CAPBP injectée a été fixée de façon à assurer un excès molaire d'un facteur 3 000 par rapport à la quantité d'uranium injectée dans le cas de la contamination par le nitrate d'uranyle et un excès d'un facteur 30 dans le cas de la contamination par UO_4 . L'efficacité du traitement a été évaluée après sacrifice des animaux 24 heures après la contamination.

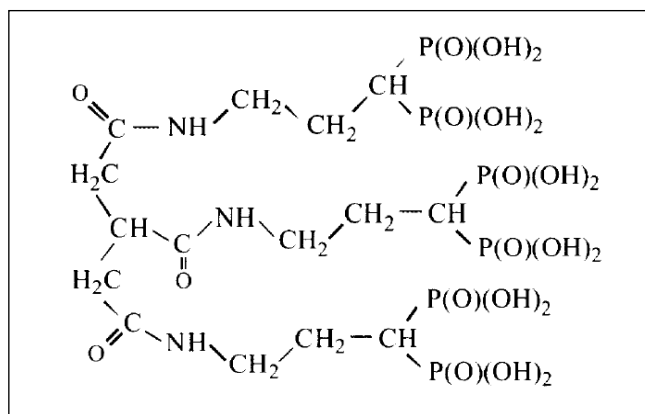


Figure 24. Molécule d'acide carballylique amido biphosphonique (CAPBP).

L'injection de CAPBP 2 minutes après la contamination permet, dans le cas de la contamination par du nitrate d'uranyle, d'augmenter la proportion d'uranium retenue au niveau de la blessure de 2,0 % à 32,8 % de la quantité d'uranium injectée. La rétention de l'uranium dans la blessure est également augmentée dans le cas d'une contamination par UO_4 : elle passe de 31,5 % sans traitement à 66,9 % suite à l'injection de CAPBP.

Les auteurs ont ici démontré que le traitement d'urgence d'une contamination par l'uranium suite à une plaie profonde de type piqûre par une injection intramusculaire de CAPBP permet de retenir une proportion importante de l'uranium au niveau du site d'injection. L'uranium retenu au niveau de la blessure pourrait alors ensuite être éliminé par excision chirurgicale de la zone contaminée, ce qui permettrait de réduire considérablement l'exposition interne de la victime.

Cependant, la mise en œuvre d'un tel traitement dans l'industrie nucléaire ne peut pas être réalisée immédiatement sur le lieu de la contamination puisque seul le personnel médical est habilité à réaliser des injections. Il serait alors intéressant que des études complémentaires soient menées afin d'évaluer l'influence du temps s'écoulant entre la contamination par piqûre et l'injection intramusculaire d'agents chélatants au service médical sur l'efficacité de ce type de traitement. Ceci permettrait en effet d'estimer le bénéfice apporté par l'injection intramusculaire d'agents chélatants au service médical avant l'excision chirurgicale par rapport à une excision chirurgicale de la plaie contaminée effectuée sans injection préalable de ces agents.

Les premières formes galéniques topiques de type pansement et gel contenant des chélateurs de l'uranium ont été développées par Houpert et al. (Houpert *et al.* 2004). Il a été proposé que ces formes soient appliquées en urgence sur le lieu de la contamination cutanée afin de limiter le passage des radionucléides à travers la peau. Les agents chélatant l'uranium employés dans cette étude appartiennent à la famille des biphosphonates : l'acide carballylique amido biphosphonique (CAPBP, figure 24) et l'éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP, figure 25). L'EHBP étant une molécule déjà cliniquement employée dans le traitement de certaines pathologies osseuses, elle présente l'avantage de posséder une autorisation de mise sur le marché. Ces agents ont été introduits, en quantité égale ou deux fois supérieure à la quantité d'uranium de la solution contaminée, dans des gels et pansements qui sont des hydrocolloïdes de méthylcellulose déjà commercialisés et connus pour leur forte capacité à absorber l'eau lorsqu'ils sont à son contact. L'efficacité de décontamination de ces formes galéniques a été évaluée *in vitro* sur des muscles bovins excisés et *in vivo* chez des rats après contamination par des solutions contenant des composés d'uranium peu solubles : UO_2 , U_3O_8 ou encore UO_4 .

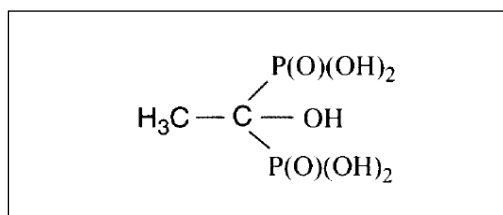


Figure 25. Molécule d'éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP).

Dans le modèle *in vitro*, une incision a donc été pratiquée sur un muscle bovin excisé et la contamination a été effectuée par dépôt d'une solution contenant de l'uranium sous les formes UO_2 , U_3O_8 et UO_4 . Le traitement a été appliqué sur l'incision 5 minutes après la contamination. Les résultats de cette étude montrent que l'application durant 1 heure du gel et du pansement tous deux dépourvus d'agent chélatant permet de retenir respectivement de $74,7 \pm 5,3 \%$ à $83,6 \pm 12 \%$ et de

89,2 ± 6 % à 96,8 ± 0,4 % de l'uranium dans ces formes galéniques, et ce, quel que soit le composé d'uranium. Il a été constaté que l'ajout des agents chélatants dans le gel et le pansement ne permet pas d'augmenter de façon significative la quantité d'uranium qui y est retenue. Une durée de dépôt de 15 minutes, correspondant à la durée moyenne du transport de la personne contaminée au service médical du site nucléaire, a également été testée dans le cas de la contamination par UO₄. Cette étude a montré une réduction significative de l'efficacité de ces formes galéniques. En effet, la quantité d'uranium retrouvée au bout de 15 minutes dans ces dernières est seulement d'environ 7 % pour le gel et 40 % pour le pansement, l'ajout d'agent chélatant dans ces formes ne permettant toujours pas d'augmenter la quantité d'uranium retenue.

Dans les travaux menés *in vivo*, une incision a été pratiquée sur une patte arrière de chaque rat et des dépôts de solution d'uranium sous la forme UO₄ ont été réalisés aux niveaux intermusculaire et intramusculaire. La contamination intermusculaire permet de simuler une blessure faite par un objet contondant alors que la contamination intramusculaire modélise une blessure faite par un objet coupant. Les formes topiques chargées ou non en chélateurs ont été appliquées sur la blessure contaminée 2 minutes après la contamination. Il a été démontré au cours de cette étude que, suite à une contamination intermusculaire, l'application du gel et du pansement dépourvus d'agent chélatant durant 1 heure permet de retenir respectivement 40,3 % et 62,8% de l'uranium dans ces formes galéniques. Le gel est donc dans ce cas moins efficace que le pansement. Il a de plus été constaté que l'ajout de chélateurs dans ce gel ne permet pas d'améliorer son efficacité et que cette forme galénique est difficilement éliminable de la zone cutanée contaminée. Suite à ces observations et aux résultats obtenus *in vitro*, seul le pansement non chargé en agent chélatant a été testé *in vivo* dans le cas de la contamination intramusculaire. Il a ainsi été démontré que, dans ce modèle de blessure, l'application du pansement permet de retenir environ 28 % de l'uranium, et ce, que le pansement soit appliqué durant 15 minutes, temps correspondant à la durée moyenne du transport du blessé au service médical du site nucléaire, ou pendant 1 heure.

Les résultats de cette étude montrent que le pansement testé permet l'absorption d'une partie de l'uranium déposé dans une blessure, l'efficacité de ce système variant en fonction du type de blessure. Le fait que l'incorporation d'agents chélatant l'uranium dans ce pansement n'ait pas conduit à une amélioration de son efficacité suggère que la décontamination n'est réalisée que par absorption physique de la solution contaminée par le système qui, pour rappel, est connu pour ses fortes propriétés absorbantes. L'uranium ainsi absorbé n'est pas retenu dans le pansement par complexation avec un chélateur et il peut alors être ultérieurement relargué par le système. Le traitement d'urgence des contaminations cutanées ici proposé n'est donc pas optimal, mais il permet tout de même de limiter l'entrée de l'uranium dans l'organisme par absorption d'une fraction de l'uranium présent au niveau de la blessure dans l'attente que les traitements classiques soient administrés au service médical du site nucléaire.

Un autre traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium a été développé par Yang *et al.* (Yang *et al.* 2005b). Il consiste en un hydrogel, ou gel aqueux, contenant un chélateur de l'uranium. La particularité de ce gel réside dans le fait qu'il est fabriqué par auto-assemblage en phase aqueuse de trois petites molécules dont deux sont des dérivés d'acide aminés connus pour leur activité anti-inflammatoire et la troisième est le 3-amino-1-hydroxypropylidène-1,1-biphosphonate (pamidronate, figure 26), chélateur de l'uranium de la famille des biphosphonates. Le pamidronate présente l'avantage de posséder une autorisation de mise sur le marché car cette molécule est cliniquement utilisée dans le traitement de certaines pathologies osseuses. La capacité du gel à piéger l'uranium a tout d'abord été évaluée *in vitro*. Une solution de nitrate d'uranyle (UO_2^{2+}) a été déposée sur une portion de gel et la quantité d'uranium présente dans cette solution a été suivie au cours du temps (Yang *et al.* 2005a). Ce test a permis de montrer que la quantité d'uranium présente dans la solution contaminée est réduite d'environ 35 % au bout de 6 heures. Le gel semble donc capable d'extraire de l'uranium depuis une solution contaminée. L'efficacité du gel auto-assemblé a ensuite été évaluée *in vivo* sur des souris. Il a été appliqué 20 minutes après la contamination par une solution de nitrate d'uranyle d'écorchures réalisées sur le dos des souris. Il a été observé que l'application du gel permet la survie de 100 % des souris contaminées 8 jours après la contamination alors que 70 % des sujets n'ont pas survécus en absence de traitement. De plus, aucune perte significative de poids n'a été observée chez les souris traitées.

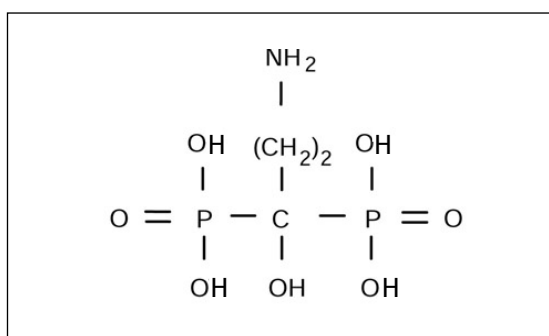


Figure 26. Molécule de 3-amino-1-hydroxypropylidène-1,1-biphosphonate (pamidronate).

Cette étude a été complétée par les travaux de Xu *et al.* (Xu *et al.* 2008) dans lesquels l'efficacité du gel auto-assemblé précédemment décrit (gel I) a été comparée à celle de trois autres gels : un gel auto-assemblé contenant du DTPA comme agent chélatant (gel II), un gel issu de la polymérisation du chélateur pamidronate (gel III) et un dernier gel issu d'une réaction d'hydrogélification impliquant le pamidronate (gel IV). La capacité de ces gels à piéger l'uranium d'une solution contaminée a été évaluée *in vitro* et *in vivo* sur des souris. Dans les tests *in vitro*, chaque gel a été mélangé avec une solution de nitrate d'uranyle et la quantité d'uranium restant dans la solution contaminée à l'issue du test a été quantifiée. Ceci a permis de classer les gels en fonction de leur efficacité selon l'ordre

décroissant suivant : gel I >> gel III > gel II > gel IV. Les gels ont ensuite été testés *in vivo* chez des souris contaminées par dépôt d'une solution de nitrate d'uranyle sur des écorchures réalisées sur leur dos. Chaque gel a été appliqué successivement trois fois durant 3 minutes sur la blessure et ce, 15 minutes après la contamination. La dernière application de gel a été laissée en place jusqu'à la fin de l'expérience. Cette étude a montré que le taux de survie des sujets 10 jours après la contamination varie en fonction du gel appliqué : 92 % pour le gel I, 100 % pour le gel II, 83 % pour le gel III et 58 % pour le gel IV, sachant que 42 % des souris non traitées ont survécu. Il a également été observé que le taux d'uranium contenu dans les reins des souris a significativement été réduit suite à l'application des gels, le gel I permettant la plus importante diminution. Enfin, 10 jours après la contamination, les souris ayant reçu les traitements montrent, après une perte de poids initiale, une élévation de leur masse corporelle alors que la masse corporelle des souris ayant survécu à la contamination sans application de traitement n'a fait que diminuer durant cette période. Le gel I semble donc constituer la forme la plus efficace de décontamination des plaies contaminées par de l'uranium.

Les gels développés dans ces travaux semblent constituer des systèmes efficaces de limitation de l'absorption cutanée de l'uranium. Cependant, tout comme dans l'étude précédente de Houpert et al. (Houpert et al. 2004), la complexation de l'uranium par l'agent chélatant n'a pas été démontrée et le mode d'action des gels n'a pas été étudié.

A l'issue de ce chapitre, il apparaît que malgré le risque de forte exposition interne des individus en cas de contamination cutanée par l'uranium, le développement de systèmes permettant la décontamination des plaies contaminées par ce radioélément dans l'urgence sur le lieu de la contamination n'a fait l'objet que d'un nombre très restreint de travaux. Par ailleurs, à notre connaissance, aucune de ces études n'a permis d'aboutir à la mise au point d'un système efficace de décontamination des plaies contaminées par chélation de l'uranium puisqu'il n'existe pas de traitement disponible à l'heure actuelle.

Dans ce contexte, il a donc été décidé de développer une nouvelle forme galénique véhiculant un chélateur de l'uranium afin de palier au manque de traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium.

Chapitre III. Le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène : un chélateur d'intérêt dans le secteur nucléaire

Constatant l'absence de traitement efficace des contaminations cutanées par les actinides, le Laboratoire de RadioChimie (LRC) de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), en collaboration avec l'UMR CNRS 8612, a décidé de lancer un programme de recherche visant à mettre au point un traitement des contaminations cutanées par l'uranium. Ce programme est basé sur l'exploitation des propriétés chélatantes d'une molécule de la famille des calixarènes développée au sein du LRC pour l'analyse radiotoxicologique dans le cadre de la surveillance des travailleurs de l'industrie nucléaire : le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène.

Ce troisième et dernier chapitre introductif du manuscrit de thèse débutera par la présentation du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène. Le mécanisme de chélation des ions uranyle par cette molécule sera ensuite décrit. Enfin, le choix de l'emploi de ce calixarène dans le traitement des contaminations cutanées par l'uranium sera justifié.

III.1. Présentation générale de la famille des calixarènes

III.1.1. Définitions et structure

Les calixarènes sont des molécules macrocycliques formées de *n* unités phénoliques reliées entre elles par des ponts méthylène situés en position ortho par rapport à la fonction hydroxyle (figure 27). La synthèse de telles molécules résulte de la condensation entre un phénol para-substitué et un formaldéhyde.

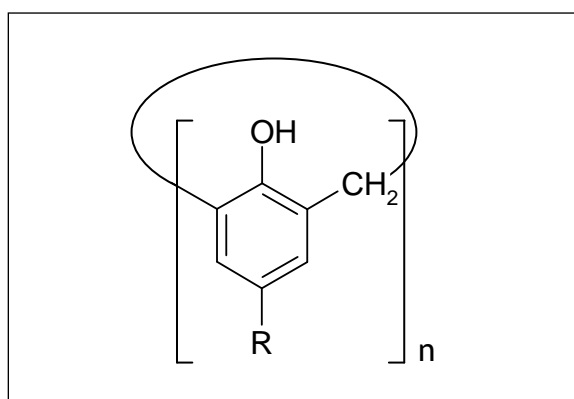


Figure 27. Structure générale des calix[n]arènes.

La nomenclature « calixarène » introduite en 1978 par Gutsche (Gutsche 1998) provient de l'analogie entre la forme adoptée par certaines de ces molécules lorsque tous les cycles aromatiques sont orientés dans la même direction et celle d'un vase grec nommé « calix crater », « calix »

signifiant vase, le suffixe « arène » indiquant quant à lui la présence de cycles aromatiques qui forment la paroi de ce vase (figure 28). Le nombre n d'unités phénoliques constituant la molécule est indiqué entre crochets et inséré entre les termes « calix » et « arène ». Les calixarènes les plus couramment étudiés comportent 4, 6 ou 8 unités phénoliques, mais le nombre d'unités peut aller jusqu'à 20 (Leverd *et al.* 2000).

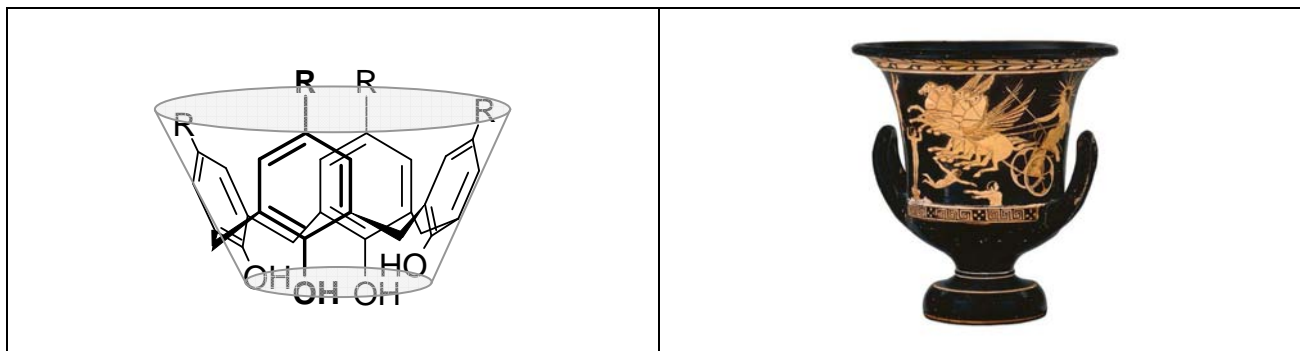


Figure 28. Origine de la nomenclature « calixarène » : analogie entre la structure de la molécule macrocyclique (à gauche) et le vase grec « calix crater » (à droite).

Les calixarènes présentent deux bords au niveau desquels divers groupements fonctionnels sont placés (figure 29). Les groupements R_1 présents sur le bord supérieur du calixarène déterminent le comportement hydrophile ou lipophile de la molécule alors que les groupements R_2 placés sur le bord inférieur sont choisis en fonction de leurs propriétés complexantes.

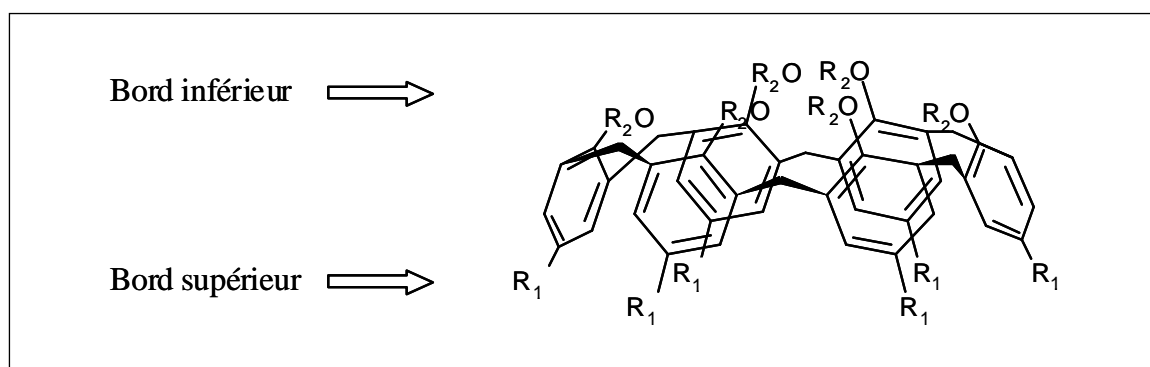


Figure 29. Structure d'un calix[6]arène.

III.1.2. Applications

La principale propriété des calixarènes réside dans leur capacité à inclure de petites molécules et des ions de façon réversible au sein de leur structure en forme de vase. Les calixarènes offrant la possibilité de jouer sur plusieurs paramètres, à savoir, la taille de la cavité, le greffage de fonctions chimiques sur les bords supérieurs et inférieurs de la molécule et les propriétés de solubilité de cette dernière, il est possible de construire la molécule adéquate vis-à-vis de l'élément à extraire qui peut aussi bien être un ion métallique, un cation organique ou encore une molécule neutre (Böhmer 1995).

Initialement employés dans la composition de plastiques synthétiques (Gutsche 1998), les calixarènes font aujourd'hui l'objet d'un intérêt grandissant dans des domaines très variés.

En effet, les calixarènes sont de nos jours développés pour des applications biopharmaceutiques : certains calixarènes sont des molécules bio-actives qui présentent une activité anti-tuberculinique, anti-virale ou encore anti-bactérienne et d'autres constituent des inhibiteurs d'enzyme (Dibama *et al.* 2009, Rodik *et al.* 2009). Les calixarènes amphiphiles peuvent également former des systèmes galéniques tels que des micelles, des liposomes ou encore des nanoparticules qui permettent le transport et la libération contrôlée de principes actifs dans l'organisme (Da Silva *et al.* 2004a). Les premières évaluations de la toxicité de tels calixarènes qui ont été menées *in vitro* et *in vivo* chez la souris montrent une faible toxicité, ce qui permet d'envisager une utilisation prometteuse des calixarènes dans le secteur pharmaceutique (Da Silva *et al.* 2004a, Da Silva *et al.* 2004b, Coleman *et al.* 2008).

Les calixarènes sont également abondamment utilisés dans des applications analytiques. Ces macrocycles sont par exemple employés comme phase stationnaire en Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) pour la séparation de solutés (Meyer *et al.* 2007). L'élaboration d'électrodes recouvertes de calixarène a conduit à la mise au point d'un système permettant la détermination du taux sanguin de sodium (Arnaud-Neu *et al.* 1997). Certains calixarènes sont également employés pour la détection de molécules d'intérêt pharmaceutique telles que les stéroïdes (Da Silva *et al.* 2004a).

Enfin, les calixarènes présentent un grand intérêt dans le secteur nucléaire pour le retraitement des déchets (Asfari *et al.* 1995, Arena *et al.* 1998, Birac *et al.* 2002), l'analyse d'éléments radioactifs dans les échantillons environnementaux (Ramkumar *et al.* 2002, Trivedi *et al.* 2002) et les excreta (Bouvier-Capely *et al.* 2009).

III.2. Le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène

III.2.1. Formule

La molécule d'intérêt du présent sujet d'étude est un calixarène tricarboxylique de formule 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène (figure 30).

De façon générale, la structure des calix[6]arènes est flexible en solution du fait de la possibilité des unités aromatiques de basculer vers l'intérieur ou l'extérieur de la cavité. Les calix[6]arènes peuvent ainsi adopter huit conformations appelées cône, cône partiel, 1,2-alternée, 1,3-alternée, 1,4-alternée, 1,2,3-alternée, 1,2,4-alternée et 1,3,5-alternée (Otsuka *et al.* 1996) (figure 31). Boulet *et al.* (Boulet *et al.* 2006) ont montré par modélisation moléculaire que la conformation la plus stable dans un solvant polaire d'un calix[6]arène similaire, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂CONHOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène, est la conformation cône. La stabilité de cette conformation étant essentiellement due à la présence des six groupements encombrants *tert*butyle sur le bord supérieur et de liaisons hydrogène entre les trois groupements hydroxamiques du bord inférieur (Boulet 2006), il est fortement probable que le calix[6]arène tricarboxylique de la présente étude se trouve également sous la conformation cône dans un solvant polaire

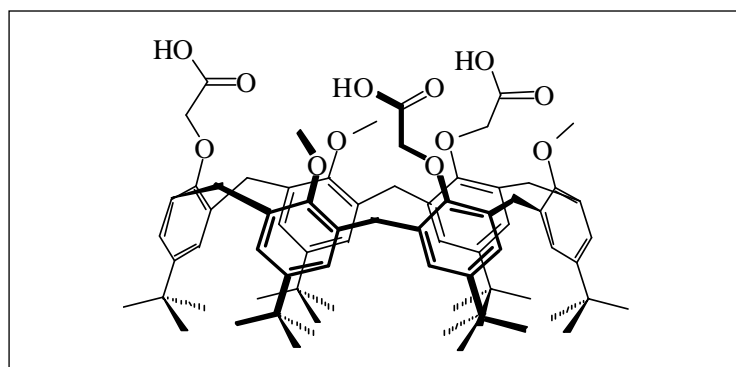


Figure 30. Structure du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène.

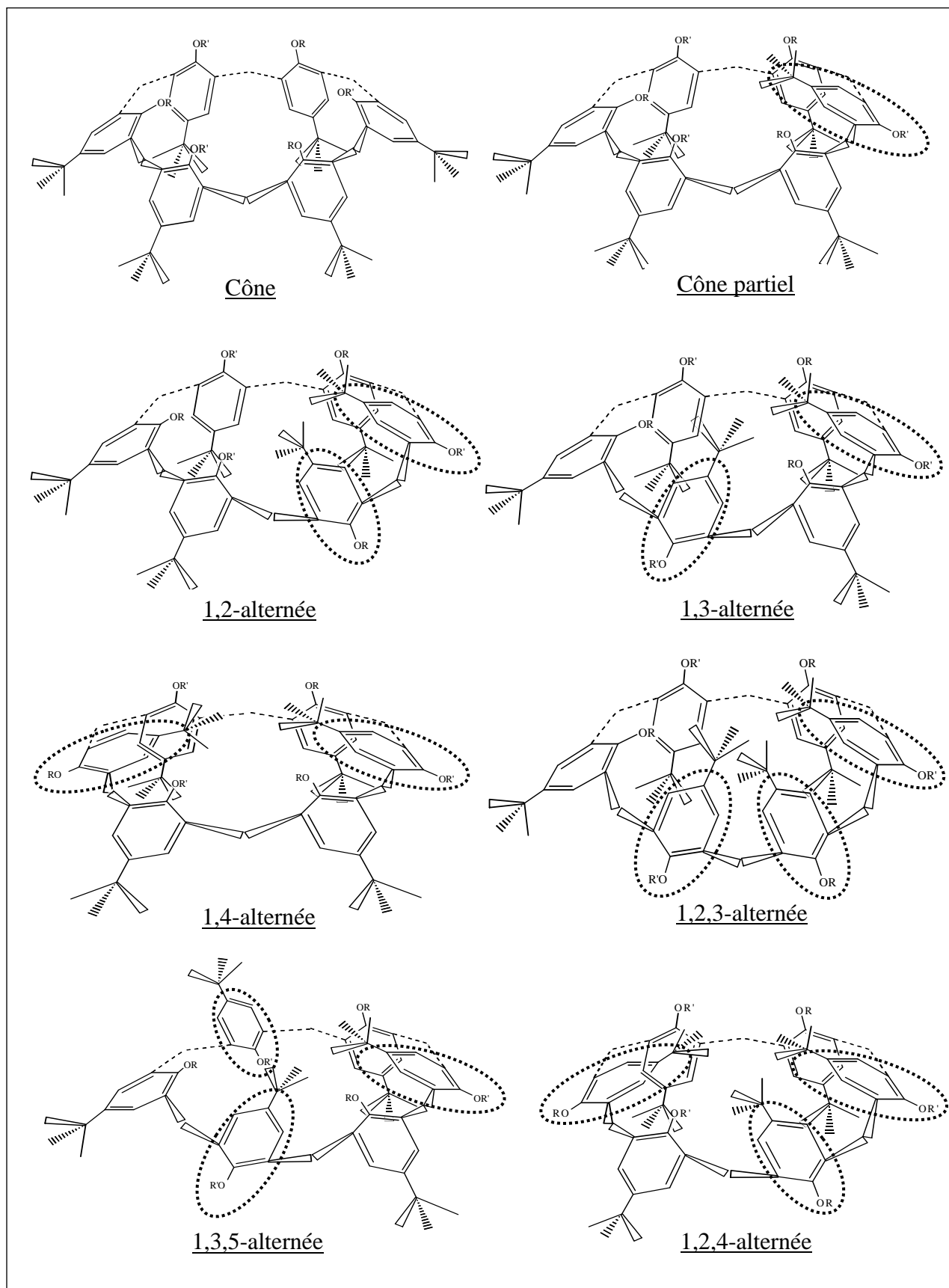


Figure 31. Conformations des calix[6]arènes (Gutsche 1998).

III.2.2. Chélation de l'uranium

Pour assurer une bonne complexation des ions uranyle (UO_2^{2+}), les complexes formés avec ces ions doivent se présenter sous forme de structures pseudoplanaires pentacoordinées ou hexacoordinées. Les macrocycles ayant un arrangement coplanaire de cinq ou six groupements fonctionnels, tels que les calix[5]arènes et les calix[6]arènes fonctionnalisés, peuvent donc constituer de bons ligands des ions uranyle (Shinkai *et al.* 1987, Araki *et al.* 1993). Le choix des fonctions complexantes à greffer sur le bord inférieur du *p-tert*butylcalix[6]arène de cette étude s'est arrêté sur les fonctions carboxyliques qui sont connues pour leur forte affinité envers les ions uranyle (Chin *et al.* 1980, Shinkai *et al.* 1986). Le greffage de trois fonctions chélatantes carboxyliques disposées en symétrie C_3 sur le bord inférieur du *p-tert*butylcalix[6]arène en conformation cône permet la formation d'un complexe pseudoplanaire hexacoordiné avec l'ion uranyle, configuration nécessaire à la chélation de cet ion (figure 32). De plus, la présence de seulement trois fonctions carboxyliques ainsi disposées au lieu de six groupements carboxyliques permet d'augmenter la sélectivité de la chélation de l'ion uranyle par le calixarène (Araki *et al.* 1993, Dinse *et al.* 1998).

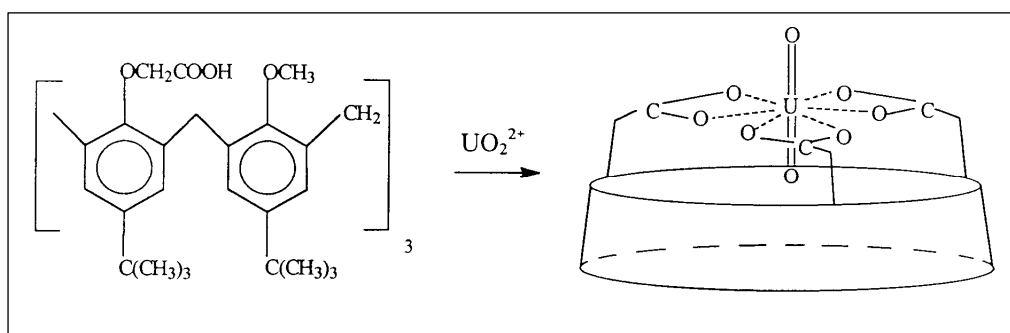


Figure 32. Structure du complexe calix[6]arène tricarboxylique - UO_2^{2+} (Dinse *et al.* 1998).

L'étude de la chélation par le 1,3,5- OCH_3 -2,4,6- OCH_2COOH -*p-tert*butylcalix[6]arène des ions uranyle présents dans une solution aqueuse contaminée a été évaluée en extraction liquide-liquide dans les travaux de Baglan *et al.* et de Dinse *et al.* (Baglan *et al.* 1997, Dinse *et al.* 1997). Ces études ont démontré que ce calixarène est adapté à la chélation de l'uranium et qu'il permet de surcroît, grâce à son caractère hydrophobe, d'extraire quantitativement les ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée vers une phase organique. Il a également été établi que la chélation d'un ion uranyle (UO_2^{2+}) est réalisée par échange de deux protons de deux fonctions carboxyliques d'une molécule de calixarène (LH_3) selon le mécanisme décrit dans l'équation 3 (Boulet *et al.* 2008).



La constante d'extraction de l'ion uranyle par le calixarène a été évaluée en extraction liquide-liquide à $4,68 \pm 0,92 \cdot 10^{-4}$, avec l'emploi comme phase organique d'un solvant industriel à base de composés aromatiques, le solvesso (Dinse 1999).

III.2.3. Utilisation en analyse radiotoxicologique

Le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène permettant l'extraction sélective et quantitative de l'uranium depuis un milieu aqueux complexe, il a été employé en analyse radiotoxicologique pour la séparation de l'uranium du milieu urinaire dans le cadre de la surveillance des travailleurs de l'industrie nucléaire soumis à des risques de contamination interne (Baglan *et al.* 1997, Dinse *et al.* 1997, Dinse *et al.* 2000). Les recherches menées au sein du Laboratoire de RadioChimie de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire ont aboutit à l'élaboration de colonnes contenant du calixarène qui permettent d'extraire des urines les actinides uranium, plutonium et américium et de les séparer les uns des autres en vue de leur dosage respectif, de façon significativement plus simple et plus rapide que les systèmes actuellement employés (Boulet 2006, Poriel *et al.* 2007). Cette application innovante des calixarènes a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Duval *et al.* 2006).

III.3. Intérêt du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène en décontamination cutanée

Le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène constituant un bon agent chélateur des ions uranyle, il a été décidé de mettre à profit l'affinité de cette molécule pour les actinides dans la prise en charge du personnel de l'industrie nucléaire ayant fait l'objet d'une contamination. Un programme de recherche visant à développer des formes pharmaceutiques pour le traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium a alors été initié par cette thèse afin de répondre au besoin de traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium dans l'industrie nucléaire (*cf.* chapitre II § II.4).

En effet, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène semble constituer une molécule particulièrement bien adaptée à la décontamination cutanée car, en plus de sa capacité à chélater l'uranium, ce calixarène présente des propriétés physico-chimiques rendant peu probable son passage à travers la peau : taille importante de 1189,71 Da, capacité de ses fonctions carboxyliques à établir de fortes et nombreuses liaisons hydrogène avec les constituants de la peau et hydrophobie (*cf.* chapitre II § II.1.2.4). Ceci laisse envisager une chélation et une rétention des ions uranyle d'une solution contaminée au niveau de la surface de la peau. Cependant, ce calixarène se présentant sous forme de poudre non soluble en phase aqueuse à l'issue de sa synthèse, il ne peut être employé directement sous cette forme pour la décontamination cutanée.

L'objectif de ce sujet de thèse est donc d'intégrer le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène dans une forme pharmaceutique destinée à l'usage cutané qui permette de rendre ce calixarène disponible pour la chélation des ions uranyle présents dans une solution aqueuse contaminée afin de limiter le transfert de ce radioélément à travers la peau et donc de limiter son incorporation et ses effets toxiques.

Le choix de la forme galénique devra se faire dans le respect des contraintes de formulation imposées par la chimie du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène. En effet, bien qu'il soit possible de modifier la structure de ce calixarène afin de préparer des systèmes galéniques tels que des supports greffés ou encore des polymères de calixarène, les rendements de synthèse de la molécule de calixarène modifiée sont beaucoup trop faibles pour envisager la formulation de tels systèmes (Souane 2005).

Conclusion

La contamination cutanée représente un mode de contamination très préoccupant dans l'industrie nucléaire puisqu'elle peut conduire à une forte exposition interne des individus. Les études menées sur la physiologie de la contamination cutanée par l'uranium ont montré que le passage de ce radioélément à travers la peau intacte ou lésée est rapide et que son entrée dans la circulation sanguine s'effectue en moins de 30 minutes. La toxicité de l'uranium ayant pénétré dans l'organisme se manifeste alors principalement par des dysfonctionnements rénaux dont la sévérité et la réversibilité sont fonction de la quantité d'uranium incorporée.

La prise en charge actuelle des contaminations cutanées débute sur le lieu de la contamination par un rinçage des plaies contaminées avec des solutions contenant des agents chélatants ayant pour but d'éliminer les radioéléments résiduels de la surface cutanée. Elle se poursuit après transfert de la victime au service médical du centre nucléaire par une administration par voie intraveineuse de chélateurs visant à accélérer l'élimination des radioéléments de l'organisme par les voies naturelles. Cependant, les agents chélatants employés ne permettant pas la complexation de l'uranium, les traitements précédemment décrits ne sont pas efficaces en cas de contamination cutanée par ce radionucléide. Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de traitement efficace des contaminations cutanées par l'uranium.

Dans l'optique de développer de nouvelles molécules plus affines de l'uranium, de nombreux travaux de synthèse chimique ont été entrepris. Parmi les molécules synthétisées se trouve la famille des calixarènes et plus particulièrement le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène. Cette molécule macrocyclique qui présente une forte affinité pour les ions uranyle a déjà été appliquée avec succès en analyse radiotoxicologique dans le cadre de la surveillance des travailleurs de l'industrie nucléaire pour extraire séparément les actinides uranium, plutonium et américium des urines et permettre leur dosage respectif.

Ainsi, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène constitue un candidat potentiel au traitement des contaminations par l'uranium et nous envisageons de mettre à profit ses propriétés de chélation pour le traitement d'urgence des plaies contaminées par de l'uranium. L'objectif de ce travail est de proposer une forme galénique adaptée à l'application cutanée et rendant disponible le calixarène pour piéger et confiner l'uranium au niveau du site de contamination afin de limiter son entrée dans l'organisme. Cette forme galénique innovante a été développée et évaluée dans la partie expérimentale de cette thèse.

Références bibliographiques

- Agache P. Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées. Editions Médicales Internationales; 2000.
- Aigueperse J, Bouvier C, Chambrette V, Chazel V, Cossonnet C, Donnadiou, Donnadiou-Claraz M, Franck D, Gourmelon P, Houpert P, Jourdain J-R, Lorthioir S, Paquet F, Rannou A, Telle Lambert M, Tirmarche M. Etat des connaissances sur les risques potentiels associés à l'uranium appauvri utilisé dans les armes. Rapport DPHD/2001-01; 2001.
- Anderson C, Anderson T, Boman A. Cutaneous microdialysis for human dermal absorption studies; In: MS Roberts, KA Walters. Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermal absorption and toxicity assessment, Vol. 91, 231-244. Marcel Dekker; 1998.
- Ansoborlo E, Moulin V, Cossonnet C, Bion L, Ménétrier F, Doizi D, Moulin C, Machuron-Mandard X, Henner P. La spéciation de l'uranium dans le domaine de la toxicologie nucléaire : milieux environnementaux et biologiques. GT 32 Spéciation. Note technique CEA/DEN/DRCP/CETAMA/2002/004: 53; 2002.
- Araki K, Hashimoto N, Otsuka H, Nagasaki T, Shinkai S. Molecular design of a calix[6]arene-based super-uranophile with C_3 symmetry. High UO_2^{2+} selectivity in solvent extraction. Chemistry Letters: 829-832; 1993.
- Arena G, Contino A, Magri A, Sciotto D, Lamb JD. Selective transport of cesium and strontium ions through polymer inclusion membranes containing calixarenes as carriers. Supramolecular Chemistry 10: 5-15; 1998.
- Arnaud-Neu F, Schwing-Weill MJ. Calixarenes, new selective molecular receptors. Synthetic Metals 90: 157-164; 1997.
- Asfari Z, Bressot C, Vicens J, Hill C, Dozol JF, Rouquette H, Eymard S, Lamare V, Tournois B. Doubly crowned calix[4]arenes in the 1,3-alternate conformation as cesium-selective carriers in supported liquid membranes. Analytical Chemistry 67: 3133-3139; 1995.
- ASN. La sûreté du cycle du combustible [online]. Available at: <http://www.asn.fr/dossiers/la-surete-du-cycle-du-combustible>.
- ASN. Guide national : Intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. V3.6; 2008.
- Baglan N, Dinse C, Cossonnet C, Abidi R, Asfari Z, Leroy M, Vicens J. Investigation of U(VI) extraction with calixarene: application to analysis of urine sample. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 226: 261-265; 1997.
- Bailey BR, Eckerman KF, Townsend LW. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. Radiat Prot Dosimetry 105: 509-512; 2003.

- Bailey MR, Beral V, Clayton DB, Darby SC, Goodhead DT, Hendry J, Marsh C, Murray V, Smith B, Spratt B, Stoneham M, Al-Bader S, Collins P, Green N, Scott M, Wilkins M. The health effects of depleted uranium munitions: A summary. *Journal of Radiological Protection* 22: 131-139; 2002.
- Banday AA, Priyamvada S, Farooq N, Yusufi ANK, Khan F. Effect of uranyl nitrate on enzymes of carbohydrate metabolism and brush border membrane in different kidney tissues. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2080-2088; 2008.
- Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: S31-S40; 2002.
- Bartek MJ, LaBudde JA, Maibach HI. Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man. *Journal of Investigative Dermatology* 58: 114-123; 1972.
- Bérard F, Marty JP, Nicolas JF. Allergen penetration through the skin. *European Journal of Dermatology* 13: 324-330; 2003.
- Bérard P, Quesne B, Auriol B, Chalabreysse J. Cutaneous contamination after a uranyl nitrate skin burn: Incident report. *Radiation Protection Dosimetry* 53: 269-272; 1994.
- Bhattacharyya MH, Breitenstein BD, Métivier H, Muggenburg BA, Stradling GN, Volf V. Traitement de la contamination accidentelle des travailleurs. Fontenay-aux-Roses: IPSN-Mission communication; 1995.
- Birac A-M, Bergeonneau P, Leconte P, Marvy A, Anzieu P, Atabek RM, Creusefond R, Lecomte M, Leray S, Leudet A, Ménager M-T, Simon A, Terrien Y. La recherche pour la gestion des déchets nucléaires - Les résultats d'aujourd'hui, les solutions de demain... . Clefs CEA 46; 2002.
- Blanchin N, Desloires S, Grappin L, Guillermin AM, Lafon P, Miele A. Protocoles de prise en charge des incidents d'expositions internes au plutonium dans un service médical d'installation nucléaire de base : élaboration - mise en place - évaluation - validation de 1996 à 2002. *Radioprotection* 39: 59-75; 2004.
- Bleise A, Danesi PR, Burkart W. Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* 64: 93-112; 2003.
- Böhmer V. Calixarenes, macrocycles with (almost) unlimited possibilities. *Angewandte Chemie (International Edition in English)* 34: 713-745; 1995.
- Bonin B, Blanc P-L. L'uranium dans le milieu naturel. L'uranium de l'environnement à l'Homme (H. Métivier); 2001.
- Bos JD, Meinardi MMHM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology* 9: 165-169; 2000.
- Boulet B. Extraction sélective des actinides par les calixarènes. Application à l'analyse radiotoxicologique. In: Université Paris VI; 2006.

- Boulet B, Joubert L, Cote G, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Adamo C. A combined experimental and theoretical study on the conformational behavior of a calix[6]arene. *Journal of Physical Chemistry A* 110: 5782-5791; 2006.
- Boulet B, Joubert L, Cote G, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Adamo C. Theoretical study of the uranyl complexation by hydroxamic and carboxylic acid groups. *Inorganic Chemistry* 47: 7983-7991; 2008.
- Bouvier-Capely C, Manoury A, Legrand A, Bonthonneau JP, Cuenot F, Rebière F. The use of calix[6]arene molecules for actinides analysis in urine and drinking water: an alternative to current procedures. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* (to be published); 2009.
- Brain KR, Walters KA, Watkinson AC. Investigation of skin permeation in vitro; In: MS Roberts, KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermal absorption and toxicity assessment*, Vol. 91, Marcel Dekker; 1998.
- Brain KR, Walters KA, Watkinson AC. Methods for studying percutaneous absorption; In: KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermatological and transdermal formulations*, Vol. 119, 197-270. Marcel Dekker; 2002.
- Bronaugh RL. Current issue in the in vitro measurement of percutaneous absorption; In: MS Roberts, KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermal absorption and toxicity assessment*, Vol. 91, 155-160. Marcel Dekker; 1998.
- Bronaugh RL, Hood HL, Kraeling MEK, Yourik J. Determination of percutaneous absorption by in vitro Techniques; In: RL Bronaugh, H Maibach. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Percutaneous absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Vol. 97, 229-234. Marcel Dekker; 1999.
- Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M. Methods for in vitro percutaneous absorption studies VII: Use of excised human skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75: 1094-1097; 1986.
- Bucks D, Maibach H. Occlusion does not uniformly enhance penetration in vivo; In: RL Bronaugh, H Maibach. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Percutaneous Absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Vol. 97, 81-106. Marcel Dekker; 1999.
- Burgada R, Bailly T. Mise au point de produits de décorporation, aspects chimiques. *Radiotoxicologie* 17: 44-50; 2000.
- Calmet D, Flüry-Hérard A, Jimonet C, Manaud N, Ménager M-T, Ménétrier F, Moulin V. Toxicologie radiologique et chimique. *Clefs CEA* 48; 2003.
- CEA1. Le cycle du combustible nucléaire - livret CEA jeunes [online]. Available at: http://www.cea.fr/jeunes/themes/l_energie_nucleaire/le_cycle_du_combustible.
- CEA2. L'homme et les rayonnements - livret CEA jeunes [online]. Available at: http://www.cea.fr/jeunes/themes/la_radioactivite/l_homme_et_les_rayonnements.

- CEA. Energy Handbook : Mémento sur l'énergie. 2008.
- Chevari S, Likhner D. Complex formation of natural uranium in blood. *Kompleksoobrazovanie estestvennogo urana v krovi*. 13: 53-57; 1968.
- Chin D-H, La Mar GN, Balch AL. Macrocyclic hexacarboxylic acid. A highly selective host for uranyl ion. *Journal of the American Chemical Society* 102: 5947-5948; 1980.
- Civatte J. *Histopathologie cutanée*. paris: Flammarion Médecine-Sciences; 1982.
- Clément P, Laugel C, Marty J-P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. *Journal of Controlled Release* 66: 243-254; 2000.
- Code-de-la-santé-publique. Article R1333-8 modifié par Décret n°2006-676 du 8 juin 2006 - art. 2 JORF 10 juin 2006. 2006.
- Code-du-travail. Code du travail, Article R4451-12, Créé par Décret n°2008-244 du 7 mars 2008 - art. (V). 2008.
- Coleman AW, Jebors S, Cecillon S, Perret P, Garin D, Marti-Battle D, Moulin M. Toxicity and biodistribution of para-sulfonato-calix[4]arene in mice. *New Journal of Chemistry* 32: 780-782; 2008.
- Cossonnet C, Agarande M, Bérard P, Franck D, Montégue A, Perrin M-L, Witschger O. *Métrieologie de l'uranium. L'uranium de l'environnement à l'Homme (H. Métivier)*; 2001.
- Craft ES, Abu-Qare AW, Flaherty MM, Garofolo MC, Rincavage HL, Abou-Donia MB. Depleted and natural uranium: Chemistry and toxicological effects. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews* 7: 297-317; 2004.
- Cronin MTD, Dearden JC, Moss GP, Murray-Dickson G. Investigation of the mechanism of flux across human skin in vitro by quantitative structure-permeability relationships. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 7: 325-330; 1999.
- Da Silva E, Lazar AN, Coleman AW. Biopharmaceutical applications of calixarenes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 14: 3-20; 2004a.
- Da Silva E, Shahgaldian P, Coleman AW. Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes. *International Journal of Pharmaceutics* 273: 57-62; 2004b.
- De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environmental Research* 30: 480-491; 1983.
- Delacroix D, Guerre J-P, Leblanc P. *Guide pratique Radionucléides et Radioprotection*. EDP Sciences & Commissariat à l'Energie Atomique ed.; 2006.
- Diamond GL, Morrow PE, Panner BJ, Gelein RM, Baggs RB. Reversible uranyl fluoride nephrotoxicity in the Long Evans rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 13: 65-78; 1989.
- Dias M, Farinha A, Faustino E, Hadgraft J, Pais J, Toscano C. Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 182: 41-47; 1999.

- Dibama HM, Clarot I, Fontanay S, Salem AB, Mourer M, Finance C, Duval RE, Regnouf-de-Vains JB. Towards calixarene-based prodrugs: Drug release and antibacterial behaviour of a water-soluble nalidixic acid/calix[4]arene ester adduct. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19: 2679-2682; 2009.
- Dinse C. Etude de l'extraction des actinides par les calixarènes : Application à l'analyse radiotoxicologique. In: Université Louis pasteur de Strasbourg; 1999.
- Dinse C, Baglan N, Cossonnet C, Bouvier C. New purification protocol for actinide measurement in excreta based on calixarene chemistry. *Applied Radiation and Isotopes* 53: 381-386; 2000.
- Dinse C, Baglan N, Cossonnet C, Le Du JF, Asfari Z, Vicens J. Solvent extraction of U(VI) from media containing competing anions and metal cations by a calix[6]arene bearing carboxy groups. *Journal of Alloys and Compounds* 271-273: 778-781; 1998.
- Dinse C, Cossonnet C, Asfari Z, Vicens J. Extraction sélective des actinides : application à l'analyse radiotoxicologique. *Radioprotection* 32: 659-671; 1997.
- Durakovic A. Medical effects of internal contamination with uranium. *Croatian Medical Journal* 40: 49-66; 1999.
- Durbin PW. Metabolic model for uranium. *Biokinetics and Analysis of Uranium in Man*; 1984.
- Durbin PW, Lauriston S. Taylor Lecture: the quest for therapeutic actinide chelators. *Health physics* 95: 465-492; 2008.
- Durbin PW, Kullgren B, Xu J, Raymond KN. Development of decorporation agents for the actinides. *Radiation Protection Dosimetry* 79: 433-443; 1998.
- Duval R, Cossonnet C, Bouvier-Capely C, Le Strat C, Boulet B. Para-tertio-butylcalix[6]arenes portant des fonctions triacides en positions 2, 4 et 6, membranes liquides supportées et matériaux supports les comportant et leurs utilisations. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire FR 2006 / 001105; 2006.
- ECETOC. European Centre for Ecotoxicology and toxicology of Chemicals - Absorption percutanée. 1993.
- EDF. [online]. Available at: http://www.edf.com/html/panorama/production/nucleaire/photo_assemblage.html.
- ESAC. ECVAM Scientific Advisory Committee: Statement on the scientific validity of in-vitro tests for skin irritation testing. 2007.
- ESAC. ECVAM Scientific Advisory Committee: Statement on the scientific validity of in-vitro tests for skin irritation testing. 2008.
- EURATOM. Communauté Européenne de l'Energie Atomique - Directive 96/29/Euratom fixant les normes de base relatives à la protection sanitaire de la population et des travailleurs contre les dangers résultant de rayonnements ionisants. Journal officiel n° L159 des Communautés Européennes; 1996.

- Franck D, de Carlan L, Fisher H, Pierrat N, Schlagbauer M, Wahl W. Potential of modern technologies for improvement of in vivo calibration. *Radiation Protection Dosimetry* 125 (1-4): 438-443; 2007.
- Franz TJ. Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology* 64: 190-195; 1975.
- Fukuda S, Iida H, Ikeda M, Yan X, Xie Y. Toxicity of uranium and the removal effects of CBMIDA and EHBP in simulated wounds of rats. *Health Phys* 89: 81-8; 2005.
- Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, Yan X, Xie Y. Acute toxicity of subcutaneously administered depleted uranium and the effects of CBMIDA in the simulated wounds of rats. *Health physics* 96: 483-492; 2009a.
- Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, Yan X, Xie Y. Efficacy of oral and intraperitoneal administration of CBMIDA for removing uranium in rats after parenteral injections of depleted uranium. *Radiation Protection Dosimetry* 133: 12-19; 2009b.
- Galle P. *Toxiques nucléaires*. 2 ed. Paris: Masson; 1997.
- Garnier-Laplace J, Colle C, Morello M. Fiche IRSN radionucléide : Uranium naturel et environnement. 2001.
- Geinoz S, Rey S, Boss G, Bunge AL, Guy RH, Carrupt P-A, Reist M, Testa B. Quantitative structure - Permeation relationships for solute transport across silicone membranes. *Pharmaceutical Research* 19: 1622-1629; 2002.
- Gerber GB, Thomas RG. Internal radionuclide contamination guidebook. *Radiation Protection Dosimetry* 41: 1-49; 1992.
- Gervelas C, Serandour AL, Geiger S, Grillon G, Fritsch P, Taulelle C, Le Gall B, Benech H, Deverre JR, Fattal E, Tsapis N. Direct lung delivery of a dry powder formulation of DTPA with improved aerosolization properties: Effect on lung and systemic decorporation of plutonium. *Journal of Controlled Release* 118: 78-86; 2007.
- Giraud J-M. Bilan de l'utilisation du DTPA au CEA et la COGEMA. Journée organisée par le service de radioprotection d'électricité de France - *Radiotoxicologie*: 39-40; 2000.
- Golda N, Koo J, Maibach HI. Effects and uses of occlusion on human skin: An overview. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 24: 91-104; 2005.
- Grams YY, Bouwstra JA. Penetration and distribution of three lipophilic probes in vitro in human skin focusing on the hair follicle. *Journal of Controlled Release* 83: 253-262; 2002.
- Grappin L, Bérard P, Ménétrier F, Carbone L, Courtay C, Castagnet X, Le Goff JP, Neron MO, Piechowski J. Treatment of actinide exposures: A review of Ca-DTPA injections inside CEA-COGEMA plants. *Radiation Protection Dosimetry* 127: 435-439; 2007.
- Grenthe IF, J, Konings RJM, Lemire RJ, Muller AB, Nguyen-Trung C, Wanner H. *Chemical Thermodynamics of uranium*. North-Holland Elsevier Science Publishers B. V.; 1992.

- Guilmette RA, Durbin PW. Scientific basis for the development of biokinetic models for radionuclides-contaminated wounds. *Radiat Prot Dosimetry* 105: 213-217; 2003.
- Gutsche D. *Calixarenes*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1998.
- Hadgraft J. Modulation of the barrier function of the skin. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 14: 72-81; 2001a.
- Hadgraft J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics* 224: 1-18; 2001b.
- Hadgraft J. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58: 291-299; 2004.
- Hadgraft J, Guy R. Feasibility assessment in topical and transdermal delivery: mathematical models and in vitro studies; In: J Hadgraft, R Guy. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Transdermal drug delivery*, Vol. 123, 1-23. Marcel Dekker; 2003.
- Hadgraft J, Valenta C. pH, pK(a) and dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 200: 243-247; 2000.
- Hengé-Napoli MH, Ansoborlo E, Chazel V, Houpert P, Paquet F, Gourmelon P. Efficacy of ethane-1-hydroxy-1,1-bisphosphonate (EHBP) for the decorporation of uranium after intramuscular contamination in rats. *International Journal of Radiation Biology* 75: 1473-1477; 1999.
- Hengé-Napoli MH, Ansoborlo E, Houpert P, Mirto H, Paquet F, Burgada R, Hodgson S, Stradling GN. Progress and trends in in vivo chelation of uranium. *Radiation Protection Dosimetry* 79: 449-452; 1998.
- Hengé-Napoli MH, L'azou B, Bérard P, Cambar J. *Toxicité de l'uranium. L'uranium de l'environnement à l'Homme* (H. Métivier); 2001.
- Hewitt J. Fonctions et structures de la peau; In: *La peau : ses fonctions, ses lésions, ses relations pathologiques*, Vol. 1, Editions Roger Dacosta; 1976.
- Houpert P, Chazel V, Paquet F. A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 73-8; 2004.
- Houpert P, Chazel V, Paquet F, Bailly T, Burgada R, Henge-Napoli MH. Reduction of uranium transfer by local chelation in simulated wounds in rats. *Hum Exp Toxicol* 20: 237-41; 2001.
- Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings J, Hoeck U, Kemper F, Maibach H, Marty JP, Merk H, Parra J, Rekkas D, Rondelli I, Schaefer H, Täuber U, Verbiere N. *Methods for Assessing Percutaneous Absorption the Report and Recommendations of ECVAM Workshop 13. ATLA Alternatives to Laboratory Animals* 24: 81-106; 1996.
- Hueber F, Schaefer H, Wepierre J. Role of transepidermal and transfollicular routes in percutaneous absorption of steroids: In vitro studies on human skin. *Skin Pharmacology* 7: 237-244; 1994.
- ICRP-2. *Permissible dose for Internal Radiation* (ICRP Publication 2). Pergamon; 1959.
- ICRP-59. *The biological basis for dose limitation in the skin* (ICRP publication 59). Pergamon; 1991.

- ICRP-66. Human respiratory tract model for radiological protection (ICRP publication 66). Pergamon; 1994.
- ICRP-69. Age dependent doses to members of the public from intake of radionuclides. Part 3: ingestion dose coefficients (ICRP publication 69). Pergamon; 1995.
- ICRP-78. Individual monitoring for internal exposure of workers (ICRP publication 78). Pergamon; 1997.
- Illel B, Schaefer H, Wepierre J, Doucet O. Follicles play an important role in percutaneous absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 80: 424-427; 1991.
- Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W, Lademann J. Porcine ear skin: An in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology* 13: 19-24; 2007.
- Kathren RL, Burklin RK. Acute chemical toxicity of uranium. *Health Physics* 94: 170-179; 2008a.
- Kathren RL, Burklin RK. Proposed standards for acute exposure to low enrichment uranium for compliance with 10 CFR 70.61. *The Radiation Safety Journal* 95: 122-127; 2008b.
- Knorr F, Lademann J, Patzelt A, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Follicular transport route - Research progress and future perspectives. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71: 173-180; 2009.
- Laboratoires-Dermatologiques-Eucerin. [online]. Available at: <http://www.eucerin.fr/la-peau/cellules.html>.
- Lalor CB, Flynn GL, Weiner N. Formulation factors affecting release of drug from topical formulations. 1. Effect of emulsion type upon in vitro delivery of ethyl p-aminobenzoate. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83: 1525-1528; 1994.
- Laroche P, Gerasimo P, Tréguier JY. Risques liés à l'uranium appauvri en isotope 235; In: *Encyclopédie médico-chirurgicale. Toxicologie, pathologie professionnelle* 16-008-U-20, Vol. Editions scientifiques et médicales Elsevier; 2003.
- Le Guen B, Bérard P. Toxicologie-Pathologie professionnelle; In: Elsevier. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, Vol. 1-6. Elsevier; 1998.
- Le Guen B, Bérard P, Auriol B, Gilbert B. Surveillance des travailleurs. L'uranium de l'environnement à l'Homme (H. Métivier); 2001.
- Leverd PC, Dumazet-Bonnamour I, Lamartine R, Nierlich M. Using a large calixarene as a polyalkoxide ligand: tert- Butylcalix[12]arene and its complex with the uranyl cation. *Chemical Communications*: 493-494; 2000.
- LNHB. Mini table de radionucléides. EDP Sciences ed.; 2007.
- Lopez R, Diaz Sylvester PL, Ubios AM, Cabrini RL. Percutaneous toxicity of uranyl nitrate: its effect in terms of exposure area and time. *Health Phys* 78: 434-7; 2000.
- Macfarlane M, Jones P, Goebel C, Dufour E, Rowland J, Araki D, Costabel-Farkas M, Hewitt NJ, Hibatallah J, Kirst A, McNamee P, Schellauf F, Scheel J. A tiered approach to the use of

- alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: Skin irritation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54: 188-196; 2009.
- Madic C, Genet M. Propriétés physiques et chimiques de l'uranium. *L'uranium de l'environnement à l'Homme* (H. Métivier); 2001.
- Martini M-C. Analyse biochimique des lipides épidermiques. *Pathologie Biologie* 51: 267-270; 2003.
- Martini M-C. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. Second ed. Lassay-les-Châteaux: EMD S.A.S; 2006.
- Marty J-P. Fixation des substances chimiques dans les structures superficielles de la peau : importance dans les problèmes de décontamination et de biodisponibilité. In: Université paris-sud; 1976.
- Meidan VM, Bonner MC, Michniak BB. Transfollicular drug delivery - Is it a reality? *International Journal of Pharmaceutics* 306: 1-14; 2005.
- Menon GK, Lee SH, Roberts MS. Ultrastructural effects of some solvents and vehicles on the Stratum Corneum and other Skin Components: "Evidence Mosaic-Partitioning Model of the Skin Barrier"; In: MS Roberts, KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermal absorption and toxicity assessment*, Vol. 91, 727-751. Marcel Dekker; 1998.
- Métivier H, Ansoborlo E, Chazel V, Gerasimo P. Biocinétique et dosimétrie des exposition à l'uranium. *L'uranium de l'environnement à l'Homme* (H. Métivier); 2001.
- Meyer R, Jira T. Calixarene HPLC phases - Applications. *Current Analytical Chemistry* 3: 161-170; 2007.
- Miller AC, Beltran D, Rivas R, Stewart M, Merlot RJ, Lison PB. Radiation- and depleted uranium-induced carcinogenesis studies: characterisation of the carcinogenic process and development of medical countermeasures. NATO Human Factor Medicine Panel Research Task Group 099 "Radiation Bioeffects and Countermeasures" meeting; 2005.
- Moghimi HR, Williams AC, Barry BW. A lamellar matrix model for stratum corneum intercellular lipids. I. Characterisation and comparison with stratum corneum intercellular structure. *International Journal of Pharmaceutics* 131: 103-115; 1996.
- Moody RP, Maibach HI. Skin decontamination: Importance of the wash-in effect. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1783-1788; 2006.
- Muller D, Houpert P, Hengé-Napoli MH, Métivier H, Paquet F. Synergie potentielle entre deux toxiques rénaux : le DTPA et l'uranium. *Radioprotection* 41: 413-420; 2006.
- Muller DS, Houpert P, Cambar J, Hengé-Napoli MH. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporters and absorptive endocytosis in the uptake of low concentrations of uranium and its toxicity at higher concentrations in LLC-PK1 cells. *Toxicological Sciences* 101: 254-262; 2008.

- NCRP. Development of a biokinetic model for radionuclide-contaminated wounds and procedures for their assessment, dosimetry and treatment. National Council on Radiation Protection and Measurements; 2007.
- Nielsen JB. Percutaneous penetration through slightly damaged skin. Archives of Dermatological Research 296: 560-567; 2005.
- OECD/OCDE-427. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°427- Absorption cutanée : méthode *in vivo*. 2004.
- OECD/OCDE-428. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°428- Absorption cutanée : méthode *in vitro*. 2004.
- Otsuka H, Shinkai S. Stereochemical control of calixarenes useful as rigid and conformationally diversiform platforms for molecular design. Supramolecular Science 3: 189-205; 1996.
- Pavlakakis N, Pollock CA, McLean G, Bartrop R. Deliberate overdose of uranium: Toxicity and treatment. Nephron 72: 313-317; 1996.
- Pellanda CL. Topical bioavailability of glucocorticosteroids - Dermatopharmacokinetic and dermatopharmacodynamic of topically applied triamcinolone acetonide in humans. In: Basel, Switzerland: Basel University; 2006.
- Pellmar TC, Fuciarelli AF, Ejniak JW, Hamilton M, Hogan J, Strocko S, Emond C, Mottaz HM, Landauer MR. Distribution of uranium in rats implanted with depleted uranium pellets. Toxicological Sciences 49: 29-39; 1999.
- Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, Turlonias E, Dhieux B, Maubert C, Paquet F. Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. Health Physics 92: 464-474; 2007a.
- Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. Radiation protection dosimetry 127: 125-130; 2007b.
- Petitot F, Moreels AM, Paquet F. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. Can J Physiol Pharmacol 82: 133-9; 2004.
- Piechowski J, Menoux B, Miele A, Grappin L, Guillermin AM, Fottorino R, Ruffin M. Implication du médecin du travail et de l'expert dans la gestion et la dosimétrie d'un incident de contamination : exemple d'une plaie contaminée par le plutonium. Radioprotection 38: 29-50; 2003.
- Poriel L, Boulet B, Cossonnet C, Bouvier-Capely C. Study of the U/Am separation with supported calix[6]arene in the aim of urinary actinides analysis. Radiation Protection Dosimetry 127: 273-276; 2007.
- Potts RO, Frangcoeur ML. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. Journal of Investigative Dermatology 96: 495-499; 1991.

- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology* 17: 1063-1072; 2008.
- Pugh WJ, Hadgraft J, Roberts MS. Physicochemical determinants of stratum corneum permeation; In: MS Roberts, KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermal absorption and toxicity assessment*, Vol. 91, Marcel Dekker; 1998.
- Ramkumar J, Nayak SK, Maiti B. Transport of uranyl ion across a bulk liquid membrane using calixarene and synergistic agents as carriers. *Journal of Membrane Science* 196: 203-210; 2002.
- Reddy MB, Guy RH, Bunge AL. Does epidermal turnover reduce percutaneous penetration? *Pharmaceutical Research* 17: 1414-1419; 2000.
- Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-334; 1975.
- Roberts MS, Cross SE, Pellett MA. Skin transport; In: KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermatological and transdermal formulations*, Vol. 119, 89-198. Marcel Dekker; 2002.
- Roberts MS, Walters KA. The relationship between structure and barrier function of skin; In: MS Roberts, KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermal absorption and toxicity assessment*, Vol. 91, 1-42. Marcel Dekker; 1998.
- Rodik RV, Boyko VI, Kalchenko VI. Calixarenes in bio-medical researches. *Current medicinal chemistry* 16: 1630-1655; 2009.
- Rolland A, Wagner N, Chatelus A, Shroot B, Schaefer H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharmaceutical Research* 10: 1738-1744; 1993.
- SCCNFP. The Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers. Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. 2003.
- Schaefer H, Redelmeier TE. Skin barrier-Principles of percutaneous absorption. Karger; 1996.
- Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W, Düsing HJ, Gamer A, Haltner-Ukomadu E, Hoffmann C, Kaca M, Kamp H, Kersen S, Kietzmann M, Korting HC, Krächter HU, Lehr CM, Liebsch M, Mehling A, Müller-Goymann C, Netzlaff F, Niedorf F, Rübhelke MK, Schäfer U, Schmidt E, Schreiber S, Spielmann H, Vuia A, Weimer M. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* 36: 161-187; 2008.
- Schmitt D. Biologie de la peau humaine Séminaire d'enseignement INSERM; 2000.

- Schmook FP, Meingassner JG, Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *International Journal of Pharmaceutics* 215: 51-56; 2001.
- Seiller M, Martini M-C. *Formes pharmaceutiques pour application locale*. Paris: Lavoisier; 1996.
- Sérandour AL, Tsapis N, Gervelas C, Grillon G, Fréchou M, Deverre JR, Bénech H, Fattal E, Fritsch P, Poncy JL. Decorporation of plutonium by pulmonary administration of Ca-DTPA dry powder: A study in rat after lung contamination with different plutonium forms. *Radiation Protection Dosimetry* 127: 472-476; 2007.
- Shah VP, Elkins J, Lam S-Y, Skelly JP. Determination of in vitro drug release from hydrocortisone creams. *International Journal of Pharmaceutics* 53: 53-59; 1989.
- Shim J, Kang HS, Park WS, Han SH, Kim J, Chang IS. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 97: 477-484; 2004.
- Shinkai S, Koreishi H, Ueda K, Arimura T, Manabe O. Molecular design of calixarene-based uranophiles which exhibit remarkably high stability and selectivity. *Journal of the American Chemical Society* 109: 6371-6376; 1987.
- Shinkai S, Koreishi H, Ueda K, Manabe O. A new hexacarboxylate uranophile derived from calix[6]arene. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*: 233-234; 1986.
- Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: Qualitative and quantitative observations - An overview. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 13: 229-234; 2000.
- Souane R. Synthèse et propriétés complexantes vis-à-vis de l'ion uranyle de dérivés carboxyliques du p-tert-butyl-calix[6]arène. In: Université Louis Pasteur, Strasbourg; 2005.
- Souidi M, Tissandié E, Racine R, Ben Soussan H, Rouas C, Grignard E, Dublineau I, Gourmelon P, Lestaevél P, Gueguen Y. Uranium: Propriétés et effets biologiques après contamination interne. *Annales de Biologie Clinique* 67: 23-38; 2009.
- Surber C, Davis AF. Bioavailability and bioequivalence of dermatological formulations; In: KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermatological and transdermal formulations*, Vol. 119, 401-498. Marcel Dekker; 2002.
- Toll R, Jacobi U, Richter H, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 123: 168-176; 2004.
- Trivedi UV, Menon SK, Agrawal YK. Polymer supported calix[6]arene hydroxamic acid, a novel chelating resin. *Reactive and Functional Polymers* 50: 205-216; 2002.
- Tymen H. Décontamination cutanée - Evaluation de l'efficacité de produits décontaminants. *Radiotoxicologie* 17: 56-62; 2000.

- Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D. Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol* 76: 1417-24; 2000a.
- Tymen H, Rateau G, Guillet K, Ramounet-Le Gall B, Gerasimo P, Fritsch P. Methods to measure transfer of radionuclides through intact or injured skin - Application to radiotoxicology. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80: 733-741; 2002.
- Tymen H, Schoulz D, Caire-Maurisier AM, Chevrier F, Curet PM. Traitement d'urgence des contaminations internes par les transuraniens. Une nouvelle forme galénique du Na₃CaDTPA micronisé. *Radioprotection* 35: 473-485; 2000b.
- Ubios AM, Marzorati M, Cabrini RL. Skin alterations induced by long-term exposure to uranium and their effect on permeability. *Health Physics* 72: 713-715; 1997.
- UNCKC. UNC kidney center [online]. Available at: <http://www.unckidneycenter.org/images/glomerulus.jpg>.
- Valenta C, Siman U, Kratzel M, Hadgraft J. The dermal delivery of lignocaine: Influence of ion pairing. *International Journal of Pharmaceutics* 197: 77-85; 2000.
- Viala M. Utilisation industrielle de l'uranium. L'uranium de l'environnement à l'Homme (H. Métivier); 2001.
- Vitorge P. Chimie des actinides. *Techniques de l'ingénieur*; 1999.
- Vogt A, Mandt N, Lademann J, Schaefer H, Blume-Peytavi U. Follicular targeting--a promising tool in selective dermatotherapy. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research*. 10: 252-255; 2005.
- Walters KA, Brain KR. Dermatological formulation and transdermal systems; In: KA Walters. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Dermatological and transdermal formulations*, Vol. 119, 319-400. Marcel Dekker; 2002.
- Wester RC, Maibach H. Dermal decontamination and percutaneous absorption; In: *Percutaneous absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Vol. 97, 241-254. Marcel Dekker; 1999a.
- Wester RC, Maibach H. In vivo methods for percutaneous absorption measurements; In: RL Bronaugh, HI Maibach. *Percutaneous absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Vol. 97, 215-228. Marcel Dekker; 1999b.
- Wester RC, Maibach HI. Regional variation in percutaneous absorption; In: RL Bronaugh, HI Maibach. *Percutaneous absorption. Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Vol. 97, 107-116. Marcel Dekker; 1999c.
- WHO. Depleted uranium - Sources, exposure and health effects. Geneva: World Health Organisation; 2001.

- Wiechers JW. The barrier function of the skin in relation to percutaneous absorption of drugs. *Pharmaceutisch Weekblad - Scientific Edition* 11: 185-198; 1989.
- Wood R, Sharp C, Gourmelon P, Le Guen B, Stradling GN, Taylor DM, Henge-Napoli MH. Decorporation treatment - Medical overview. *Radiation Protection Dosimetry* 87: 51-57; 2000.
- Xu K, Ge W, Liang G, Wang L, Yang Z, Wang Q, Hsing IM, Xu B. Bisphosphonate-containing supramolecular hydrogels for topical decorporation of uranium-contaminated wounds in mice. *International Journal of Radiation Biology* 84: 353-362; 2008.
- Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin relationship to the anatomical location an the body, age, sex and physical parameters. *Archives of Dermatological Research* 291: 555-559; 1999.
- Yang Z, Xu K, Wang L, Gu H, Wei H, Zhang M, Xu B. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. *Supplementary Material (ESI) for Chemical Communications*; 2005a.
- Yang Z, Xu K, Wang L, Gu H, Wei H, Zhang M, Xu B. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. *Chemical Communications*: 4414-4416; 2005b.
- Zatz J. *Skin permeation - Fundamentals and application*. Allured publishing corporation; 1993.
- Zhu G, Xiang X, Chen X, Wang L, Hu H, Weng S. Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Archives of Toxicology* 83: 37-46; 2009.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I

**Conception et caractérisation d'une forme galénique destinée à l'usage cutané
véhiculant le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène**

&

**Evaluation du potentiel de cette forme pour la décontamination d'une solution
chargée en uranium**

Comme il a précédemment été exposé, la contamination par l'uranium des travailleurs de l'industrie nucléaire par voie cutanée représente un mode de contamination préoccupant pour lequel aucun traitement spécifique n'est disponible à l'heure actuelle. Le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène présente une forte affinité pour les ions uranyle, ce qui suggère que ce calixarène pourrait être utilisé dans le traitement des contaminations cutanées par l'uranium pour piéger à la surface de la peau les ions uranyle d'une solution contaminée et ainsi limiter l'entrée de ce radioélément dans l'organisme. Cependant, ce calixarène se présentant sous la forme d'une poudre hydrophobe, il ne peut pas être appliqué directement sur une peau ou une plaie contaminée.

Les objectifs de ce chapitre sont : 1) de proposer une forme galénique adaptée à l'usage cutané capable de véhiculer le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène et 2) de vérifier que cette forme galénique rend disponible le calixarène pour la chélation des ions uranyle présents dans une solution aqueuse contaminée en vue d'une application au traitement des contaminations cutanées par l'uranium.

Le choix du système galénique présenté dans ce chapitre est basé sur le caractère amphiphile du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène. En effet, la tendance de cette molécule à se placer à l'interface entre une phase aqueuse et une phase organique a été exploitée dans la préparation d'un système émulsionné particulier : une nanoémulsion. Cette nanoémulsion de type huile dans eau consiste en une dispersion de gouttelettes d'huile de paraffine de diamètre moyen inférieur à 200 nm dans une phase aqueuse. La caractérisation physico-chimique de cette nanoémulsion a permis de mettre en évidence la présence de molécules de calixarène à la surface des gouttelettes huileuses dispersées, ce qui suggère que ces molécules sont potentiellement disponibles pour chélater les ions uranyle d'une solution aqueuse contaminée. Afin de vérifier cette hypothèse, la nanoémulsion de calixarène a été mise en contact avec une solution de nitrate d'uranyle et la quantité d'uranium demeurant en phase aqueuse à l'issue de ce contact a été évaluée. Les résultats montrent que plus de 80 % de l'uranium de la solution contaminée sont extraits par la nanoémulsion de calixarène, ce qui confirme que des molécules de calixarène sont présentes et disponibles pour la chélation des ions uranyle à la surface des globules huileux de la nanoémulsion.

Ainsi, la nanoémulsion de calixarène développée dans ce chapitre constitue un système galénique destiné à l'usage cutané qui permet d'extraire de façon quasiment quantitative les ions uranyle d'une solution aqueuse contaminée.

**Publication 1: Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium
extraction from contaminated solutions**

Journal of Pharmaceutical Sciences, sous presse

Aurélie Spagnol^{1,2,3}, Céline Bouvier-Capely³, Guillaume Phan³, François Rebière³, Elias Fattal^{1,2,*}

¹ Univ Paris Sud, UMR CNRS 8612, IFR 141-ITFM, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

² CNRS, UMR 8612, IFR 141-ITFM Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

³ IRSN, Laboratoire de Radiochimie, DRPH/SDI, BP 17 F-92262 Fontenay aux Roses, France

Key words: Nanoemulsion, Calixarene, Chelating agent, Uranium

Abstract

Accidental cutaneous contamination by actinides such as uranium occurring to nuclear power plant workers can lead to their dissemination in other tissues and induce severe damages. Until now, no specific emergency treatment for such contamination has been developed. The aim of the present work was to formulate a tricarboxylic calix[6]arene molecule, known to exhibit good affinity and selectivity for complexing uranium, within a topical delivery system for the treatment of skin contamination. Since calixarene was shown to reduce oil/water interfacial tension, we have designed an oil-in-water nanoemulsion, taking advantage of the small droplet size offering a high contact surface with the contaminated aqueous medium. Characterization of the calixarene nanoemulsion was performed by determination of the oily droplet size, zeta potential and pH, measured as a function of the calixarene concentration. The obtained results have confirmed the surface localisation of calixarene molecules being potentially available to extract uranyl ions from an aqueous contaminated solution. In a preliminary experiment, the calixarene nanoemulsion was used for the removal of free uranium from an aqueous contaminated solution. Results showed that the calixarene nanoemulsion extracted up to $80\pm 5\%$ of uranium, which demonstrates the potential interest of this delivery system for uranium skin decontamination.

Introduction

The nuclear industry requires every year the manipulation of tens of thousand tons of uranium during the diverse steps of nuclear fuel treatment. Despite the protection means implemented in the workplace, a few incidents might induce internal contamination of workers by actinides either by inhalation, ingestion or penetration through wounds or intact skin. Although the most current contamination pathway is inhalation¹, contamination through intact or wounded skins is still a big concern, since it may induce a high internal exposure after translocation of the radionuclides from the contamination site into the body²⁻⁶. Moreover, no specific emergency treatment of wound or cutaneous contamination exists. Indeed, the current medical care only occurs after transfer of the victim to the medical unit of the nuclear site and it only consists in local decontamination by rinsing the wound with soaped water or a 25% calcium salt of diethylene triamine pentaacetic acid (Ca-DTPA) solution. This procedure is often followed by a decorporation treatment through intravenous injection of 1 g of Ca-DTPA in 4 ml to reduce the risks of tissue damage and cancer induction⁷. A surgical excision of the contaminated tissues can be needed in order to remove residual radionuclides and prevent their penetration into the body⁸. Nevertheless, in case of uranium contamination that may be responsible for strong kidney toxicity^{6,9}, these procedures are ineffective. Indeed, Ca-DTPA exhibits a low selectivity and affinity for uranium in biological medium and can increase the risk of acute nephritis due to uranium precipitation in the kidney^{1,10-12}. Some more specific chelating agents have been developed in order to decorporate uranium from the body¹¹. Except the biphosphonate molecule series¹³⁻¹⁵, none of those chelating agents have been used for skin decontamination. In addition, specific uranium chelation by biphosphonate molecules has not been fully demonstrated.

In this context, we have developed a new topical formulation for the treatment of uranium skin contamination. In this order, we have taken advantage of the particular chelation properties of a calixarene molecule developed in our laboratories for radiotoxicological analyses purpose. Calixarene selectivity, affinity and extraction efficacy of uranium present in traces in biological media has been successfully shown in previous studies¹⁶. The goal of the present study is to formulate calixarene molecules in a topical delivery system for skin decontamination. Taking into account the interfacial properties of calixarene molecules, we have developed an oil-in-water (O/W) nanoemulsion. Nanoscale systems have already been developed for detoxification therapy^{17,18} and for actinides decorporation¹⁹, but they have never been applied to radionuclides skin decontamination. In this paper, the physicochemical properties of the calixarene nanoemulsion have been characterized and its efficiency for uranium extraction has been evaluated.

1. Materials and methods

1.1. Materials

Calixarene molecule (Fig. 1) was synthesized as described in the patent by Duval and coworkers²⁰. Other components used for formulation were paraffin oil ($d = 0.86$), (VWR, Fontenay sous Bois, France), non ionic surfactants sorbitan monooleate (Span® 80) and polyoxyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween® 80), purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Water used in all experiments was obtained from a Milli-Q® Synergy 185 water purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Acetonitrile, trifluoroacetic acid and tetrahydrofuran of HPLC grade used in HPLC studies were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Uranium-contaminated solutions were prepared by diluting an aqueous standard depleted uranium solution (1,000 mg/l in 2% HNO₃, SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France). The pH of the contaminated solutions was adjusted to 5 with 0.01 M acetate buffer. All reagents were used as received without further purification.

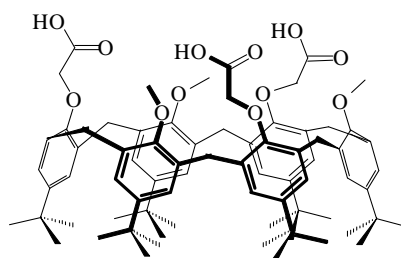


Figure 1: Structure of 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arene

1.2. Methods

1.2.1. Determination of calixarene solubility in paraffin oil

The solubility of calixarene in paraffin oil was determined using the following protocol. An excess amount of calixarene powder was added to the oil solution and kept under magnetic stirring for 24 h to reach equilibrium. The sample was centrifuged at 146,000 g for 1 h at 20°C. An aliquot of the supernatant was 10-fold diluted with tetrahydrofuran and then analysed by HPLC. The HPLC system used was an Agilent 1200 Series apparatus (Agilent Technologies, Massy, France.) equipped with an auto-sampler (1200 Series Standard Autosampler), a mobile phase delivery pump (1200 Series Quaternary Pump) associated with a degasser (1200 Series Vacuum Degasser), a UV-Visible detector (Multi-Wavelength Detector) and a data module (HPLC 2D ChemStation Software). The stationary phase was a Zorbax Eclipse XDB-C8 column (150 x 4.6 mm, 5 micron) and a mixture of acetonitrile and trifluoroacetic acid (0.05%) was used as mobile phase. The

injection volume was set at 20 μl and the absorbance measurement was performed at 210 nm, a wavelength that is suitable to detect calixarene. Calibration curves were performed from 10 to 75 $\mu\text{g/ml}$ by diluting appropriate amount of calixarene powder in a mixture of oil and tetrahydrofuran at a 1:9 ratio (v/v). The limit of detection was 0.05 $\mu\text{g/ml}$ and the limit of quantification was 0.15 $\mu\text{g/ml}$.

1.2.2. Interfacial tension measurement

The paraffin oil/water interfacial tension was measured with a Tracker oil drop tensiometer (I. T. Concept, Longessaigne, France). Pure oil droplets and calixarene saturated oil droplets of 15 μl were formed in pure water and 6.4 mg/l uranium contaminated water. The interfacial tension was recorded continuously during one hour at $25\pm 2^\circ\text{C}$.

1.2.3. Preparation of nanoemulsions

Nanoemulsions were prepared by the emulsion inversion point method²¹. Water was slowly added to a mixture of paraffin oil, non ionic surfactants and calixarene under slight stirring using a magnetic stirrer. The emulsification temperature was kept at 50°C . Samples were then cooled at room temperature under slight stirring. The amounts of surfactants, oil and water were 5%, 20% and 75% (w/w), respectively. The mixture ratio of Tween® 80 and Span® 80 was adjusted to reach the hydrophilic-lipophilic balance (HLB) value that ensures the optimum emulsification conditions. The optimum amount of drug content was determined by adding various quantity of calixarene to the oily phase. Unloaded formulations were also prepared. The nanoemulsions were stored at room temperature.

1.2.4. Characterization of calixarene nanoemulsions

All nanoemulsions were characterized with respect to droplet size, morphology, zeta potential and pH measurement. These analyses were repeated after four and six months.

1.2.4.1. Optical microscopy

Nanoemulsions were observed with an optical Leitz Diaplan microscope (Leica Microsystemes, Rueil-Malmaison, France) equipped with a Coolsnap ES camera (Roper scientific, Evry, France).

1.2.4.2. Droplet size measurement

The droplet size distribution was determined by quasi-elastic light scattering with a Nanosizer/Zetasizer® ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.). Samples were prepared by appropriate dilution in ultra-filtered (0.22 μm) Milli-Q water and analyses were done at 25°C in triplicate to determine the mean droplet size and the polydispersity index.

1.2.4.3. pH measurement

The pH of nanoemulsions was determined at 20°C with a MeterLab/pH M240 pH-meter equipped with combined pH electrodes suited for emulsion pH measurement (Radiometer Copenhagen, Denmark).

1.2.4.4. Zeta potential

The zeta potential of the nanoemulsion was determined using a Nanosizer/Zetasizer® ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K). Each sample was properly diluted in ultra-filtered (0.22 µm) 1 mM NaCl. Analyses were performed in triplicate at 25°C.

1.2.4.5. *In vitro* extraction study

The extraction of uranium by calixarene nanoemulsion was determined by measuring the amount of free uranium remaining in the aqueous phase after ultrafiltration-ultracentrifugation of a mixture of calixarene nanoemulsion and uranium solution using Microcon® centrifugal filter devices (3,000 Da, Millipore, France). Nanoemulsion and contaminated solution were mixed together in equal volumes and the mixture was either shaken or kept under static condition during one hour. Aliquots were then introduced into Microcon® filters and centrifuged at 3,800 g for 30 minutes at 20°C. Free uranium present in the filtrate was measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, X Series II, Thermo Electron, Courtaboeuf, France). Experiments were performed with nanoemulsions that do not contain calixarene molecules (unloaded nanoemulsion) and with calixarene molecules (loaded nanoemulsion), in order to evaluate the contribution of the constituents of the formulation on the extraction of uranium.

2. Results and discussion

2.1. *Solubility of calixarene in paraffin oil*

Cutaneous application of calixarene-containing nanoemulsion requires quick skin decontamination after contact with uranium. Therefore, the nanoemulsion has to display a superficial and efficient action with a least penetration into the skin. As a consequence, a mineral oil was chosen as the oily phase of the nanoemulsions because of its low skin penetration and good stability²²⁻²⁴.

In preliminary tests, the solubility of calixarene powder in two mineral oils, silicon and liquid paraffin, was tested macroscopically. The observations revealed that calixarene is less soluble in silicon than in paraffin oil so this latest was chosen as the oily phase of nanoemulsion. Calixarene solubility in paraffin oil was determined by HPLC and displayed a value of 12 µg/ml.

2.2. Calixarene surface tension properties

The behaviour of calixarene molecules at the paraffin oil/water interface was studied by interfacial tension measurement. As observed in figure 2, the addition of calixarene in oil strongly reduced the oil/water interfacial tension from 45 to 17 mN/m at 24 h. This effect means that calixarene molecules tend to localize at the oil/water interface exhibiting interfacial properties (figure 2c compared to a). Calix[n]arene molecules, n representing the number of phenolic units, are known to be mostly water-insoluble and to form stable Langmuir films at the air/water interface. It has been shown that *p-tert*butylcalix[6]arene molecules similar to the one of the present study tend to localize at the water/air interface in a parallel orientation, *i.e.* the polar groups of the molecules into the water phase and their average plane parallel to the interface, and that this parallel orientation can gradually be lost after compression of the monolayer film²⁵⁻²⁷. The 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arene molecules may thus present a parallel orientation at the oil/water interface, with their three carboxylic groups into the water phase available for uranium chelation. The addition of a 1,000-fold uranium excess quantity in the aqueous medium did not change the calixarene loaded oil/water interfacial tension, meaning that calixarene-uranium complexes mainly stay at the oil/water interface (figure 2d compared to b). This hypothesis was confirmed by liquid-liquid extraction experiments in which 88.1±3.4% of the uranium fraction that had been extracted from the aqueous phase were recovered at the oil/water interface. It was therefore interesting to use this particular interfacial property of the calixarene to prepare an emulsified system which should make calixarene more available to the uranium present in the external aqueous phase.

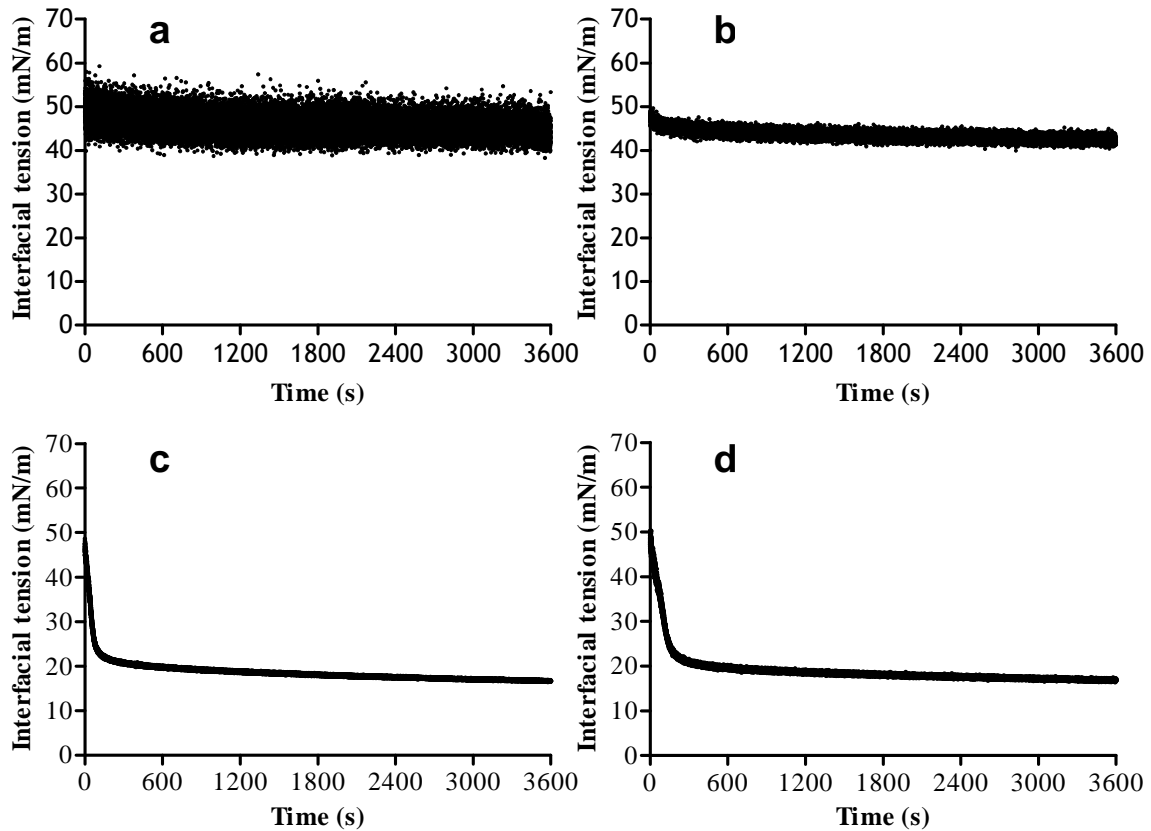


Figure 2: Evolution of the oil/water interfacial tension according to time as a function of the presence or not of calixarene in oil and uranium in water. 2a: oil/water interfacial tension; 2b: oil/water interfacial tension in presence of 6.4 mg/l of uranyl nitrate in water; 2c: oil/water interfacial tension in presence of 12 $\mu\text{g/ml}$ of calixarene in paraffin oil; 2d: oil/water interfacial tension in presence of 12 $\mu\text{g/ml}$ of calixarene in paraffin oil and 6.4 mg/l of uranyl nitrate in water.

2.3. Preparation of calixarene nanoemulsion

The optimal hydrophilic-lipophilic balance (HLB_{opt}) which corresponds to the adequate surfactant ratio ensuring the best emulsion stability has been determined on unloaded nanoemulsion. In order to obtain the HLB_{opt} value, nanoemulsions were prepared with various surfactant ratios and their relative dispersed oil droplets size and size distribution homogeneity were determined. The smallest droplet size and the most homogeneous size distribution have been observed for an optimal HLB value of 11. Increasing amounts of calixarene were then introduced in the oily phase of the nanoemulsion at this optimal HLB. During the emulsification process, an increase in viscosity was observed after adding the first drops of water in the oily phase. This phenomenon which corresponds to the transition from water in oil to oil in water emulsion²¹ was clearly delayed with the presence of calixarene. Indeed, when the incorporated quantity of calixarene increased, the addition of a higher volume of water was necessary to obtain the phase

inversion. According to the results of surface tension measurements, the calixarene molecule shows a strong surfactant character that can explain the stabilization of the initial dispersion of water droplets in oil and the difficulties to obtain the phase inversion in its presence. After preparation, all nanoemulsions presented a milky aspect with apparently a low viscosity.

2.4. Characterization of calixarene nanoemulsion

As can be seen in figure 3, the mean dispersed oil droplet size is nearly 175 nm and decreases significantly ($p < 0.05$) to 150 nm from a calixarene concentration in the nanoemulsion of 2 mg/g. This size decrease is coupled to a significant increase ($p < 0.05$) in the polydispersity index (PDI) from 0.140 to 0.250. The presence of calixarene in nanoemulsions modifies the size distribution profile of dispersed oil droplets, however, the PDI remains weak enough ($PDI < 0.250$) to assert that the size distribution is homogeneous.

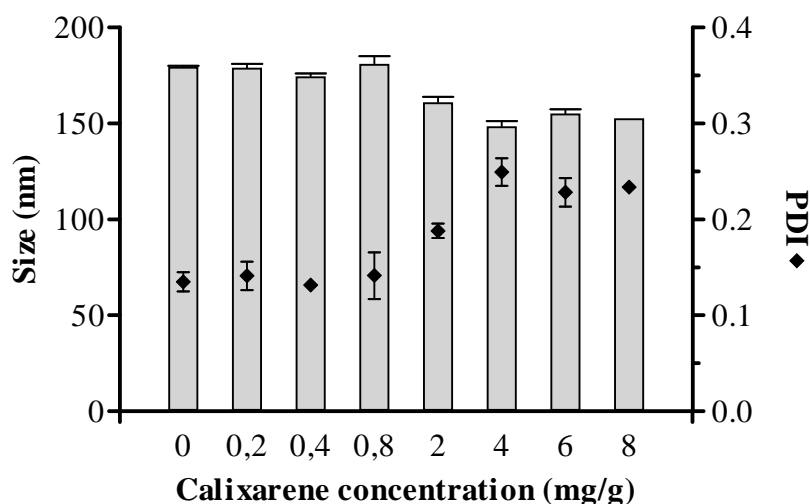


Figure 3: Evolution of oily droplets size and polydispersity index (PDI) according to calixarene concentration in the nanoemulsion.

pH measurement of the continuous water phase of calixarene nanoemulsion shows that the addition of calixarene to the nanoemulsion leads to a significant reduction of pH of more than one unit (Fig. 4). This pH decrease is probably due to the deprotonation of carboxylic functions of calixarene and tends to show that it is mainly due to the presence of calixarene molecules at the oil droplets surface.

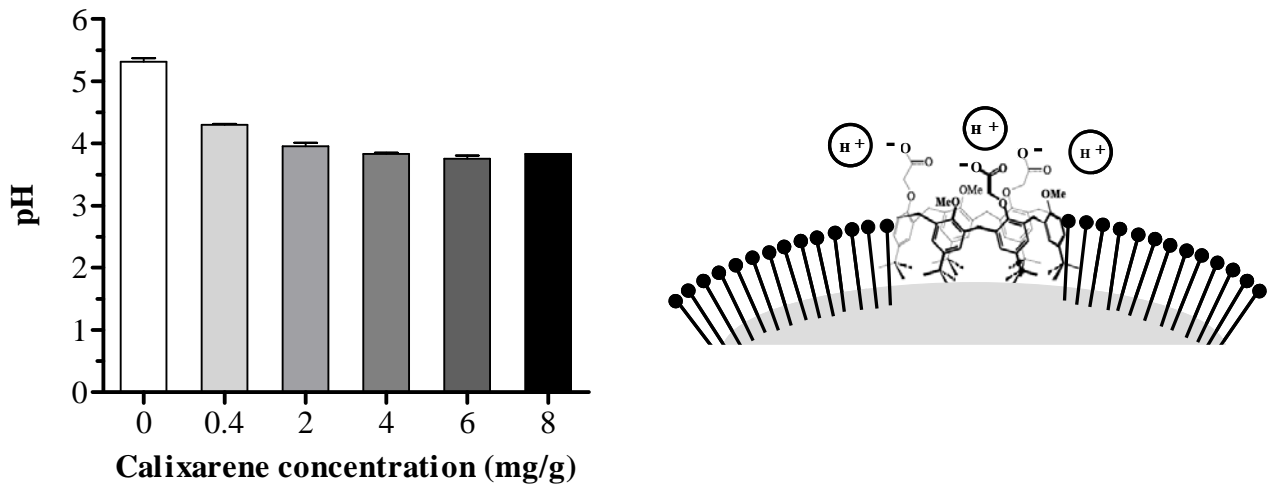


Figure 4: Evolution of O/W nanoemulsion pH as a function of calixarene concentration in nanoemulsion (on the left). Schematic illustration of calixarene localisation in the nanoemulsion (on the right).

The presence of calixarene molecules at the oil/water interface was also confirmed by zeta potential measurements (Fig. 5). Zeta potential measurement of unloaded nanoemulsions indicates a negative value of -13 mV despite the use of non ionic surfactants. This can be due to interactions between hydroxyl ions and ethoxy groups protruding at the oil/water interface²¹ or to the presence of surfactants hydrolysed products. Increasing calixarene concentration in nanoemulsion leads to a decrease of zeta potential from -13 mV to -50 mV until a calixarene concentration of 4 mg/g in the nanoemulsion, concentration at which the zeta potential does not change significantly from this minimal value. This observation can be correlated with the pH changes that suggest that calixarene molecules present at the oil droplets surface are partially deprotonated at the pH of the water phase of nanoemulsions, leading to the emergence of negative charges. The high zeta potential reduction should be an advantage since it is going to ensure a better calixarene nanoemulsion stability by increasing electrostatic repulsive forces between oily droplets²⁸.

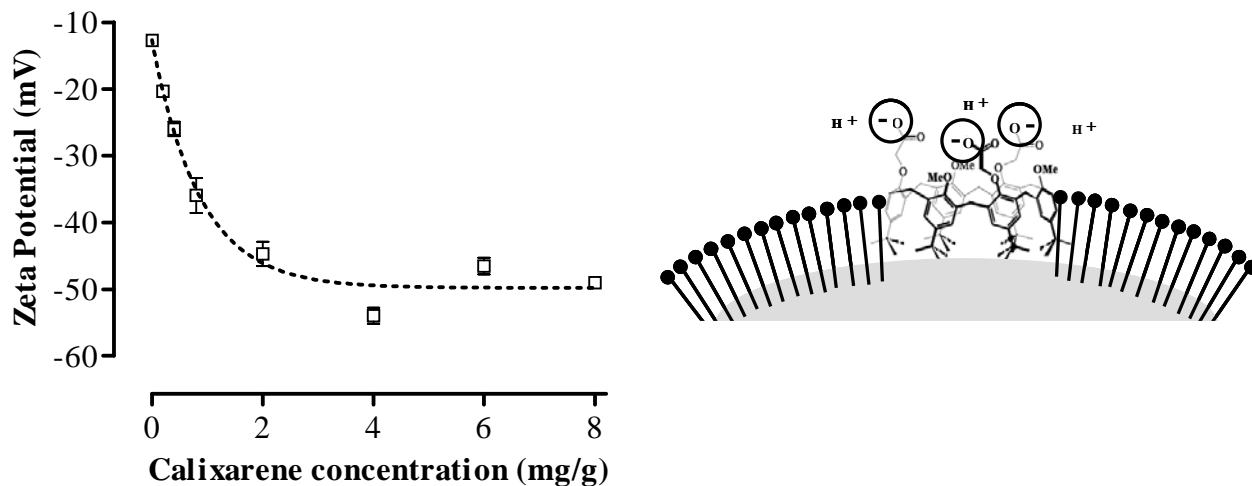


Figure 5: Evolution of zeta potential according to calixarene concentration in the nanoemulsion (on the left). Schematic illustration of calixarene localisation in the nanoemulsion (on the right).

Microscopic observation of unloaded and calixarene loaded nanoemulsions shows the formation of calixarene crystals in the aqueous phase of the nanoemulsions starting from a calixarene concentration of 6 mg/g (Table 1). However, the monitoring of calixarene nanoemulsion stability in terms of size, zeta potential and pH indicates that the presence of these crystals does not destabilize the nanoemulsions during at least 6 months.

Table 1: Formation of calixarene crystals in the aqueous phase of the nanoemulsion as a function of calixarene concentration in nanoemulsion.

Calixarene concentration (mg.g ⁻¹)	0	2	4	6	8
Microscopic observation (scale: 20 μm)					
Presence of calixarene crystals	-	-	-	+	++

The nanoemulsion characterization confirms that calixarene molecules are likely to stand at the surface of the oily droplets rather than being trapped in the inner phase of the nanoemulsion. These calixarene molecules are therefore potentially available to trap uranium molecules present in an aqueous contaminated solution.

2.5. *In vitro* evaluation of the extraction efficiency of calixarene nanoemulsion

The potential of calixarene for topical decontamination versus uranium was tested in an *in vitro* setup. In this setup, a calixarene concentration of 2 mg/g within the nanoemulsion was used and the contaminated solution was prepared in acetate buffer at pH 5 to optimise the extraction conditions¹⁶. In a preliminary experiment, it was verified by HPLC measurements that the ultrafiltration technique used to separate the complexed uranium species from free uranium does not allow the transport of oil, surfactants and calixarene molecule. It was thus possible to quantify free uranium present in the filtrate by ICP-MS measurements after ultrafiltration of the mixture of calixarene nanoemulsion and uranium contaminated solution. However, constant retention of uranium on the ultrafiltration device itself has been observed as also shown by others²⁹. Retention was due to the interaction between uranium and the Microcon® filter. When adsorption onto the filter was tested according to the pH of the contaminated solution, the percentage of retained uranium decreases from 47% at pH 5 to 8% at pH 2, suggesting that the uranyl ions probably interact with the filter in an electrostatic way. In our experimental conditions, with a contaminated solution of pH 5, retention has been estimated at 47% independently of the uranium concentration ranging from 10 to 10,000 µg/l and was taken into account in the evaluation of the efficacy of calixarene nanoemulsion. After ultrafiltration of uranium solution, the uranium quantification in the retentate, the filter and the filtrate showed that no uranium concentration occurred in the retentate (Table 2).

Table 2: Uranium material balance in Microcon® centrifugal filter device.

% of deposited uranium in Microcon® centrifugal filter unit			
Retentate	Filter	Filtrate	Total
64.6±3.4	23.5±2.4	17.0±0.7	106.3±4.2

After this step of ultrafiltration method validation, a test of uranium extraction by the calixarene nanoemulsion has been carried out. A 2 mg/g calixarene nanoemulsion (ensuring the absence of calixarene crystals) was mixed with a 40 µg/l nitrate uranyl solution at pH 5 to obtain a 10,000-fold excess of calixarene. This excess guarantees good uranium extraction conditions in liquid-liquid extraction³⁰. The efficacies of the calixarene nanoemulsion and of a solution of calixarene in

paraffin oil treated in the same conditions have been compared. The uptake of uranium by the nanoemulsion was quick, a few minutes (data not shown) and the results in figure 6 indicate that calixarene nanoemulsion extracts about $87.0\pm 6.0\%$ of uranium of the contaminated solution under dynamic condition and that the calixarene nanoemulsion is still efficient under static condition (i.e. the mixture is not shaken during incubation) with an uranium extraction of $79.8\pm 5.1\%$. The static conditions used in this experiment should be close to topical application of the formulation in case of uranium cutaneous contamination. The calixarene in paraffin oil solution is not efficient under static condition (uranium extraction of $8.3\pm 0.2\%$), which demonstrates clearly the relevance of the choice of our emulsified system that exhibits a larger surface of contact between the oily calixarene loaded phase and the contaminated aqueous phase. Comparing the unloaded and loaded nanoemulsions, we can see that the efficiency increases from $31.9\pm 2.2\%$ to $87.0\pm 6.0\%$ under dynamic condition and from $16.7\pm 4.9\%$ to $79.8\pm 5.1\%$ under static condition. These increases are due to uranium chelation by calixarene molecules in the loaded nanoemulsion.

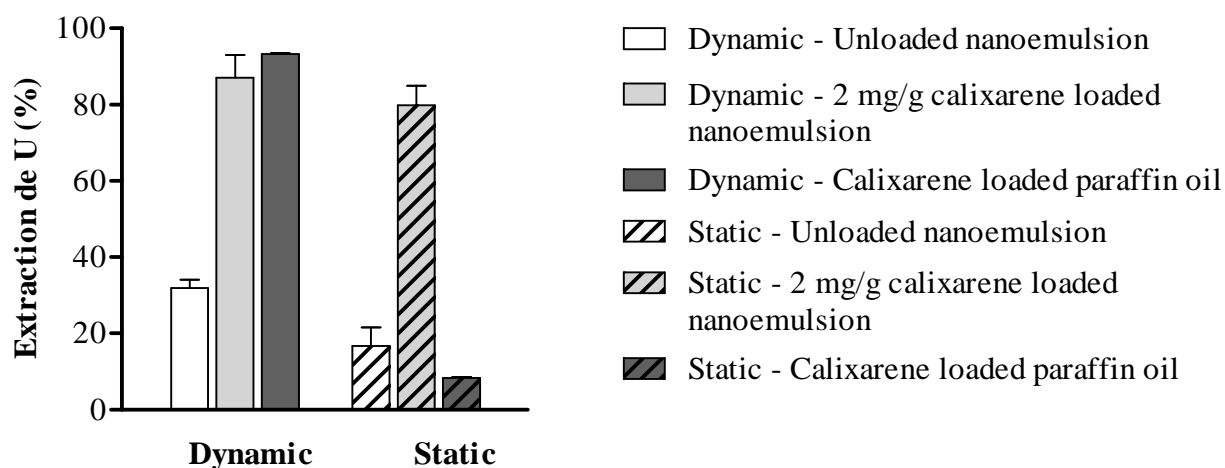


Figure 6: Percentage of uranium extraction by unloaded nanoemulsion, 2 mg/g calixarene loaded nanoemulsion and calixarene loaded paraffin oil under dynamic and static contact with an uranium contaminated solution.

It is important to stress that unloaded nanoemulsion extracts a small part of uranium, so the action of each nanoemulsion component on the uranium extraction was studied. Indeed, unloaded paraffin oil and surfactants mixture (in the same relative proportion than in the nanoemulsion) have been put in contact with contaminated aqueous solution at pH 5 under dynamic condition during one hour (Fig. 7). As expected, paraffin oil does not trap uranyl ions ($3.6\pm 0.5\%$) but the surfactants mixture extracts $88.1\pm 4.1\%$ of uranium from the contaminated solution. The surfactants that are organized under micellar forms in aqueous medium seem to be able to trap uranyl ions due to

electrostatic interaction between uranyl ions and surfactants ethoxy groups. We hypothesize that the difference in the surfactants organisation between the non loaded calixarene nanoemulsion and the micellar solution (*i.e.* aggregates size and number, interfacial area and sterical hindrance) could explain the lesser uranium extraction rate by the non loaded calixarene nanoemulsion ($31.9\pm 2.2\%$, figure 6). Indeed, the surfactants seem to be less able to trap uranyl ions when they are organized into the nanoemulsion.

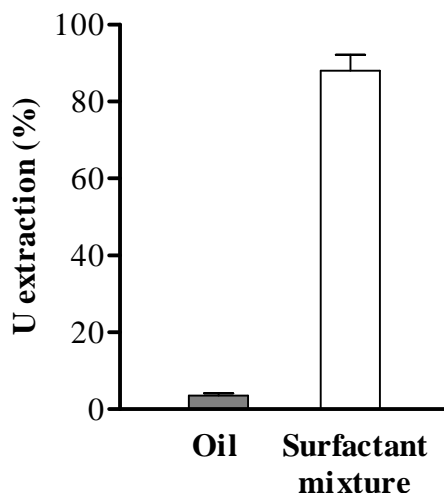


Figure 7: Percentage of uranium extraction by each component of the nanoemulsion, *i.e.* the pure paraffin oil on one side and the surfactants mixture on the other side, after one hour of dynamic contact with an uranium contaminated solution.

The extracted uranyl ions have then be de-extracted from the calixarene nanoemulsion by acidifying the retentate obtained after ultrafiltration of the mixture calixarene nanoemulsion and uranium contaminated solution with a 4 M HNO_3 solution in order to break the calixarene-uranium complex¹⁶. The acidified retentate has been shaken during two hours and then ultrafiltered, knowing that at this pH uranium is not retained by the cellulose filter. As we can see in figure 8, $103.2\pm 9.7\%$ of extracted uranium is recovered. So, the part of uranium trapped by surfactants and the part of uranium extracted by calixarene molecules present at the surface of the dispersed oil droplets have both been recovered.

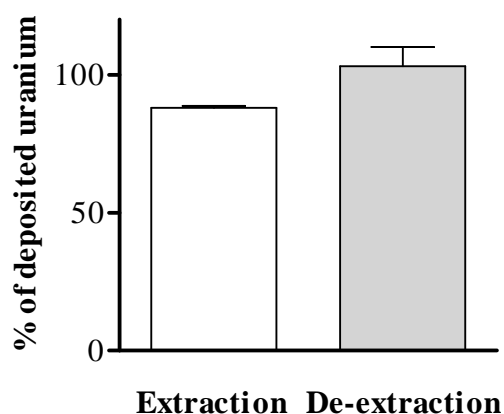


Figure 8: Percentage of uranium recovered after extraction and de-extraction processes during *in vitro* studies of the efficiency of calixarene nanoemulsion.

3. Conclusion and perspectives

In this study, we have taken advantage of calixarene interfacial properties demonstrated by interfacial tension measurements to incorporate this molecule in an oil in water nanoemulsion designed for topical application. The presence of calixarene molecules at the surface of the dispersed oily droplets was demonstrated by measurements of oily droplets size, zeta potential and pH. Then, it has been established by the mean of an adapted ultrafiltration method that calixarene location within the nanoemulsion induced the extraction and retention of about 80% of uranium from an aqueous contaminated solution. These interesting results were obtained under static conditions that are close to the expected use conditions. The calixarene nanoemulsion appears to be a very promising system for uranium skin decontamination. Efficiency of this nanoemulsion should be in the future assessed *ex vivo* on skin biopsies and *in vivo* on animal models.

Acknowledgements

Research funds were granted by the Délégation Générale pour l'Armement (DGA) and the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN).

References

1. Gerber GB, Thomas RG 1992. Internal radionuclide contamination guidebook. *Radiation Protection Dosimetry* 41(1):1-49.
2. De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL 1983. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environmental Research* 30(2):480-491.
3. Petitot F, Moreels AM, Paquet F 2004. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol* 82(2):133-139.
4. Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F 2007. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiation protection dosimetry* 127(1-4):125-130.
5. Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, Tournalonias E, Dhieux B, Maubert C, Paquet F 2007. Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health Phys* 92(5):464-474.
6. Lopez R, Diaz Sylvester PL, Ubios AM, Cabrini RL 2000. Percutaneous toxicity of uranyl nitrate: its effect in terms of exposure area and time. *Health Phys* 78(4):434-437.
7. ASN 2008. Guide national : Intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. V3.6.
8. Bailey BR, Eckerman KF, Townsend LW 2003. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. *Radiat Prot Dosimetry* 105(1-4):509-512.
9. Métivier H. 2001. L'uranium de l'environnement à l'Homme. ed., Les Ulis: EDP Sciences.
10. Muller D, Houpert P, Hengé-Napoli MH, Métivier H, Paquet F 2006. Synergie potentielle entre deux toxiques rénaux : le DTPA et l'uranium. *Radioprotection* 41(4):413-420.
11. Durbin PW 2008. Lauriston S. Taylor Lecture: the quest for therapeutic actinide chelators. *Health Phys* 95(5):465-492.
12. Pavlakis N, Pollock CA, McLean G, Bartrop R 1996. Deliberate overdose of uranium: Toxicity and treatment. *Nephron* 72(2):313-317.
13. Houpert P, Chazel V, Paquet F 2004. A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 82(2):73-78.
14. Yang Z, Xu K, Wang L, Gu H, Wei H, Zhang M, Xu B 2005. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. *Chemical Communications* (35):4414-4416.
15. Xu K, Ge W, Liang G, Wang L, Yang Z, Wang Q, Hsing IM, Xu B 2008. Bisphosphonate-containing supramolecular hydrogels for topical decorporation of uranium-contaminated wounds in mice. *International Journal of Radiation Biology* 84(5):353-362.

16. Boulet B, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Cote G 2006. Solvent extraction of U(VI) by calix[6]arenes. *Solvent Extraction and Ion Exchange* 24(3):319-330.
17. Leroux JC 2007. Injectable nanocarriers for biodegradation. *Nature Nanotechnology* 2(11):679-684.
18. Babu Dhanikula A, Mohamed Khalid N, Lee SD, Yeung R, Risovic V, Wasan KM, Leroux JC 2007. Long circulating lipid nanocapsules for drug detoxification. *Biomaterials* 28(6):1248-1257.
19. Phan G, Le Gall B, Grillon G, Rouit E, Fouillit M, Benech H, Fattal E, Deverre JR 2006. Enhanced decorporation of plutonium by DTPA encapsulated in small PEG-coated liposomes. *Biochimie* 88(11):1843-1849.
20. Duval R, Cossonnet C, Bouvier-Capely C, Le Strat C, Boulet B. 2006. Para-tert-butylcalix[6]arenes portant des fonctions triacides en positions 2, 4 et 6, membranes liquides supportées et matériaux supports les comportant et leurs utilisations. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, ed., France.
21. Liu W, Sun D, Li C, Liu Q, Xu J 2006. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *Journal of Colloid and Interface Science* 303(2):557-563.
22. Stamatas GN, de Sterke J, Hauser M, von Stetten O, van der Pol A 2008. Lipid uptake and skin occlusion following topical application of oils on adult and infant skin. *Journal of Dermatological Science* 50(2):135-142.
23. Ghadially R, Halkier-Sorensen L, Elias PM 1992. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. *Journal of the American Academy of Dermatology* 26(3):387-396.
24. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. 2003. *Handbook of pharmaceutical Excipients*. Fourth ed., London: Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association.
25. Lo Nostro P, Casnati A, Bossoletti L, Dei L, Baglioni P 1996. Complexation properties of calixarenes in Langmuir films at the water-air interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 116(1-2):203-209.
26. Lo Nostro P, Capuzzi G, Fratini E, Dei L, Baglioni P. 2001. Modulation of interfacial properties of functionalized calixarenes. *Progress in Colloid and Polymer Science*, ed. p 238-242.
27. Dei L, Casnati A, Lo Nostro P, Baglioni P 1995. Selective complexation by p-tert-butylcalix[6]arene in monolayers at the water-air interface. *Langmuir* 11(4):1268-1272.
28. Capek I 2004. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 107(2-3):125-155.
29. Guo L, Warnken KW, Santschi PH 2007. Retention behavior of dissolved uranium during ultrafiltration: Implications for colloidal U in surface waters. *Marine Chemistry* 107(2):156-166.

30. Boulet B. 2006. Extraction sélective des actinides par les calixarènes. Application à l'analyse radiotoxicologique., ed.: Université Paris VI.

CHAPITRE II

**Evaluation *in vitro* de l'efficacité de la nanoémulsion de calixarène pour
l'extraction de l'uranium depuis une solution contaminée**

&

Etude des paramètres influençant cette efficacité

Dans le chapitre I, la forme galénique que nous avons développée pour véhiculer le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène a été présentée. Nous avons également démontré que cette forme, qui consiste en une nanoémulsion de type huile dans eau, est capable de rendre le calixarène disponible pour la chélation des ions uranyle présents dans une solution aqueuse contaminée. D'après ces résultats, la nanoémulsion de calixarène semble constituer un candidat potentiel pour le traitement des contaminations cutanées par l'uranium.

L'objectif des travaux présentés dans le chapitre II est d'étudier *in vitro* l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène et de déterminer les paramètres influençant cette efficacité. En effet, en vue d'appliquer cette nanoémulsion de calixarène comme traitement d'urgence des contaminations cutanées, il nous a paru indispensable de déterminer les conditions dans lesquelles la nanoémulsion de calixarène présente une action optimale. Cette étude a été réalisée *in vitro* par mise en contact de la nanoémulsion de calixarène avec une solution d'uranium.

Dans ce second chapitre, les divers facteurs susceptibles d'exercer une influence sur l'action de décontamination de la nanoémulsion de calixarène ont été étudiés. En premier lieu, le délai d'action de la nanoémulsion de calixarène a été évalué *in vitro*. L'étude de la cinétique d'extraction par la nanoémulsion de calixarène des ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée a confirmé que cette forme galénique présente une réelle action de décontamination puisqu'elle permet d'extraire plus de 80 % de l'uranium de la solution aqueuse contaminée. De plus, son action est très rapide car l'optimum d'extraction est atteint dès 5 minutes de contact statique avec la solution contaminée. Ce résultat suggère que la nanoémulsion de calixarène est adaptée au traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium. D'après l'étude de l'influence du pH, du volume et de la concentration en uranium de la solution contaminée, il apparaît que le pH de la solution contaminée constitue le paramètre affectant le plus l'action de la nanoémulsion en entraînant une diminution importante du rendement d'extraction de l'uranium par la nanoémulsion de calixarène en cas d'acidification de la solution contaminée. Cependant, nous avons démontré que l'influence de ce paramètre peut être minimisée en préparant une nanoémulsion de calixarène tamponnée à pH = 5. Enfin, ces travaux ont permis de déterminer la quantité optimale de calixarène à incorporer dans la nanoémulsion afin d'assurer une action de décontamination optimale.

L'ensemble des résultats obtenus dans ces travaux menés *in vitro* démontre que la nanoémulsion de calixarène semble constituer un système adapté au traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium de par son action rapide. Par ailleurs, cette étude a permis de définir les conditions requises pour une efficacité optimale de la nanoémulsion de calixarène.

**Publication 2: Quick and efficient extraction of uranium
from a contaminated solution by a calixarene nanoemulsion**

Radiation Research, soumise

Aurélie Spagnol^{1,2}, Céline Bouvier-Capely^{2,*}, Marc Adam², Guillaume Phan², François Rebière²,
Elias Fattal¹

¹ Univ Paris-Sud, CNRS UMR 8612, Physico-chimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie, 5 rue JB
Clément, Châtenay-Malabry, F-92296, France

² IRSN/DRPH/SDI/LRC, BP 17, F-92262 Fontenay aux Roses, France

Abstract

This work aims to evaluate the efficiency of a calixarene emulsion for uranium extraction from a contaminated solution prior to apply such a delivery system to uranium skin decontamination. For this purpose, various experimental parameters that can influence the efficiency of the calixarene emulsion on uranium extraction were determined. The results show that the calixarene nanoemulsion effect can be observed after a very short time of contact with an uranium contaminated solution (5 minutes) and that it is still efficient in case of small volumes of contaminated solution. The pH of the contaminated solution was found to be the most important parameter affecting the calixarene nanoemulsion efficiency with a dramatic reduction of the uranium extraction rate in case of acidification of the contaminated medium. This lack of efficiency can be overcome by buffering the nanoemulsion continuous phase. The obtained results reveal that the calixarene nanoemulsion could represent a promising system for the emergency treatment of uranium cutaneous contamination.

1. Introduction

Despite protection means have been implemented in the nuclear industry, contamination of workers by actinides such as uranium is still occurring through inhalation, ingestion or penetration across wounds or intact skin. The wound or cutaneous pathways represent very critical modes of contamination in terms of frequency and health consequences (1). Particularly, contamination with uranium can induce renal chemical toxicity and bone tumor formation (2-5). However, no effective and specific pharmaceutical dosage form is so far known to decontaminate skin in emergency cases (6). Indeed, the current medical treatment only consists in local decontamination by rinsing the wound with soaped water or a calcium salt of diethylene triamine pentaacetic acid (Ca-DTPA) solution which exhibits a poor efficiency towards uranium (7, 8). Moreover, in order to avoid deep penetration of uranium and transport across the skin to the systemic compartment, decontamination should be highly efficient and quick. This is the reason why, in a previous study, we developed a topical formulation consisting of an oil in water calixarene nanoemulsion in order to treat uranium contaminated intact or wounded skin (9). The physico-chemical properties of this nanoemulsion have been characterized demonstrating that calixarene molecules were mainly located at the surface of the dispersed oily droplets of the nanoemulsion, making them highly available for uranium chelation. The present work aims then to determine the optimal conditions of use of the calixarene nanoemulsion to obtain enhanced decontamination efficiency. In particular, we have studied the kinetics of uranium extraction by this topical form and the influence of various parameters such as pH and uranium concentration of the contaminated solution on the efficiency of the calixarene nanoemulsion.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Calixarene molecule (Fig. 1) was synthesized as described in the patent by Duval and coworkers (10). Other components used for formulation were paraffin oil ($d = 0.86$), (VWR, Fontenay sous Bois, France), non ionic surfactants sorbitan monooleate (Span® 80) and polyoxyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween® 80), purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Water used in all experiments was obtained from a Milli-Q® Synergy 185 water purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Acetonitrile, trifluoroacetic acid and tetrahydrofuran of HPLC grade used in HPLC studies were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Uranium-contaminated solutions were prepared by diluting a depleted uranium standard solution ($1,000 \text{ mg.l}^{-1}$ in 2% HNO_3 , SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France).

For uranium measurement by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), a bismuth stock solution at $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ (from a 10 mg.l^{-1} single element internal standard, SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France) and a multielemental stock solution containing depleted uranium at $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (from a 10 mg.l^{-1} tuning solution SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France) were prepared in 2% HNO_3 (from a 67% HNO_3 solution, Normatom, VWR, Fontenay sous Bois, France). All reagents were used as received without further purification.

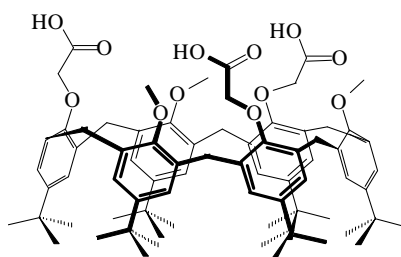


Figure 1: Structure of 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arene

2.2. Preparation of nanoemulsions

Nanoemulsions were prepared by the emulsion inversion point method as described previously (9). Briefly, water was slowly added to a mixture of paraffin oil, non ionic surfactants and calixarene under slight stirring using a magnetic stirrer. The emulsification temperature was kept at 50°C . Samples were then cooled at room temperature under slight stirring. The amounts of surfactants, oil and water were 5%, 20% and 75% (w/w), respectively.

2.3. In vitro evaluation of the calixarene nanoemulsion efficiency

The contaminated solution was added to the nanoemulsion and the mixture was either shaken or kept under static condition during definite times. The extraction of uranium by the calixarene nanoemulsion was then determined by estimating the quantity of free uranium present in the aqueous phase recovered by ultrafiltration-ultracentrifugation of the mixture using Microcon[®] centrifugal filter devices (3,000 Da, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Aliquots of the mixture were introduced into the Microcon[®] devices and centrifuged at 3,800 g for 30 minutes at 20°C . These Microcon[®] devices, that infer the passage of oil, surfactant and calixarene through their filters (9), allow recovering the water phase of the mixture in the filtrate. Free ^{238}U present in this filtrate was then quantified by ICP-MS using optimized protocols originally designed for human urine samples (11-13). Filtrate aliquots were then properly diluted in 2% HNO_3 and ^{209}Bi was added as internal standard at $1 \mu\text{g.l}^{-1}$. As diluted solutions were prepared by weighing, the related

uncertainties can be neglected compared to the statistical ones. The combination of the statistical errors was made using the conventional law of error propagation. A multielemental standard solution was used before each ICP-MS measurement series to optimize the ^{238}U signal and get the best instrumental conditions.

The calixarene nanoemulsion efficiency was studied as a function of various experimental conditions such as the contact time between the nanoemulsion and the uranium contaminated solution, the calixarene nanoemulsion to uranium volume ratio and the pH of the contaminated solution.

Uranium extraction kinetic

To assess uranium extraction kinetics by the calixarene nanoemulsion, contact time between non loaded or 2 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsions and the contaminated solution was varied from 5 minutes to 4 hours. Experiments were conducted under static and dynamic conditions. Other conditions were the following: the volume ratio of the nanoemulsion over the contaminated solution was equal to 1; the molar ratio of calixarene over uranium was equal to 10,000; the contaminated solution pH was of 5.0 ± 0.1 .

Calixarene nanoemulsion to uranium volume ratio

The influence of the 2 mg.g^{-1} calixarene nanoemulsion to uranium solution volume ratio was studied by varying this volume ratio between 1 and 10. This study was conducted under static and dynamic conditions during 1 hour. The molar ratio and pH were similar to the values previously mentioned.

Contaminated solution pH

To estimate the uranium extraction by the 2 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsion as a function of the contaminated medium acidity, the pH of the uranium solution was varied from 5 to 2 by acidifying with 67% nitric acid. This study was conducted under static and dynamic conditions during 1 hour. The volume ratio of the nanoemulsion over the contaminated solution was fixed to 1 and the molar ratio of calixarene over uranium was equal to 10,000.

Influence of uranium concentration

Uranium concentrations ranging from 40 to $400,000 \mu\text{g.l}^{-1}$ were used to study the influence of the calixarene:uranium molar ratio after 1 hour of static contact. The calixarene concentration in the nanoemulsion was fixed to 2 mg.g^{-1} , the ratio between the volume of the nanoemulsion over the volume of the contaminated solution was fixed to 1 and the contaminated solution pH was of 5.0 ± 0.1 .

Influence of calixarene concentration in the nanoemulsion.

The optimal calixarene amount in the nanoemulsion in terms of uranium extraction efficiency was evaluated by testing different calixarene load (2, 4 and 8 mg.g⁻¹) during 1 hour of static contact. All other experimental conditions were the following: the volume ratio of the nanoemulsion over the contaminated solution was equal to 1; the molar ratio of calixarene over uranium was equal to 10,000; the contaminated solution pH was of 5.0±0.1.

The various parameters that were investigated in this study are summed up in Table 1. The second column indicates the value of the parameters when kept constant in the study and the third column indicates the range in which each parameter was successively varied.

Table 1. List of parameters studied in this work

Studied parameters	Constant parameters	Variation range
[calix] mg.g ⁻¹ in the nanoemulsion	2	2-8
pH of the U solution	5	2-5
Nano/U volume ratio	1	1-10
Calix/U molar ratio	10,000	1-10,000
Contact time	1 hour	5 min-4 hours
Contact conditions	static/dynamic	

3. Results and discussion

3.1. Study of the uranium extraction kinetics by the calixarene nanoemulsion

In a previous report (9), we designed a calixarene nanoemulsion for the extraction of uranium from an aqueous contaminated solution. Calixarene was shown to be present at the surface of the nanoemulsion dispersed oily droplets being thus able to interact with uranyl ions of a contaminated solution under dynamic or static conditions. As a quick extraction is necessary for an emergency treatment of uranium skin contamination, the extraction kinetics by the calixarene nanoemulsion was evaluated by varying the contact time between the calixarene nanoemulsion and the uranium contaminated solution from 5 minutes to 4 hours. The extraction kinetics represented in figure 2 show that after 5 minutes of contact, the calixarene nanoemulsion reaches an optimal extraction yield of 83.4±0.6% and 90.6±0.3% respectively under static contact (figure 2, curve 4) and under dynamic (shaking) contact (figure 2, curve 1). The addition of calixarene to the nanoemulsion

allows an uranium extraction increase from $49.3 \pm 2.2\%$ to $90.6 \pm 0.3\%$ after 4 hours of dynamic contact with the uranium contaminated solution (figure 2, curves 1 and 2) and from $25.3 \pm 8.8\%$ to $80.0 \pm 4.0\%$ under static condition (figure 2, curves 4 and 5). Therefore, it is clearly observed that the calixarene non loaded nanoemulsion can extract uranium from the contaminated solution. This phenomenon may be explained by the presence within the nanoemulsion of non ionic surfactants micelles which could be able to trap uranyl ions (14, 15). Indeed, it is also shown that a simple oily solution extracts only about 7% of the uranium from the contaminated solution (figure 2, curve 6) and that the addition of calixarene into this oily solution does not allow to enhance the extraction rate under static condition (figure 2, curve 7). As expected, when the oil/aqueous phases contact surface is increased by shaking (figure 2, curve 3), the uranium extraction rate is significantly improved ($91.7 \pm 2.5\%$). Hence, the advantage of the emulsified system ensuring a larger oil/water interfacial contact which enhances the uranium extraction yield and allows a quick elimination of the radionuclide is clearly demonstrated.

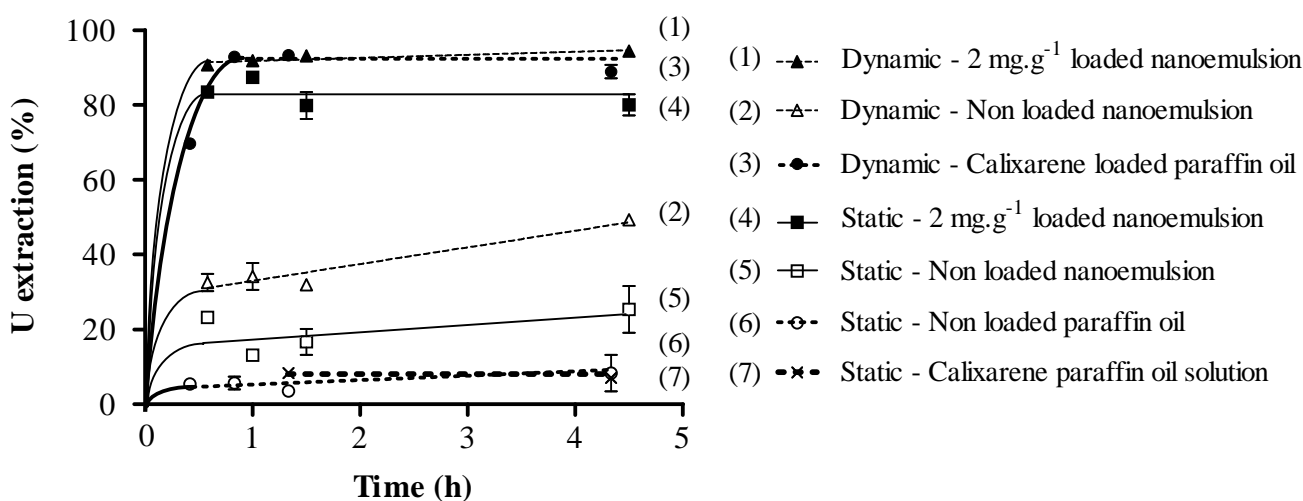


Figure 2: Uranium extraction kinetics by paraffin oil and nanoemulsion against the presence of calixarene (percentage of uranium extracted from a contaminated solution as a function of time). Each plot corresponds to the contact time between the tested form and the uranium contaminated solution; the duration of the nanoemulsion ultrafiltration (30 minutes) and the oil centrifugation (15 minutes) are included. Experimentations were conducted under static and dynamic conditions, with equal volumes of nanoemulsion and uranium contaminated solution, a 10,000-fold calixarene molar excess and a pH 5 contaminated solution.

3.2. Effect of various parameters on calixarene nanoemulsion efficiency

3.2.1. Calixarene nanoemulsion to uranium volume ratio

In case of skin contamination, the volume of the uranium contaminated solution is expected to be smaller than the volume of the calixarene nanoemulsion. To determine whether the calixarene nanoemulsion is still efficient on a smaller uranium solution volume, we have compared calixarene nanoemulsion efficiency for the same volume of nanoemulsion and contaminated solution and also for a ten-fold smaller contaminated solution volume. The contact time was 1 hour (in static and dynamic conditions) and the calixarene:uranium molar ratio was kept at 10,000. The reduction of the contaminated solution volume led to a slight decrease of the nanoemulsion efficiency with an extraction yield dropping from $87.0 \pm 6.0\%$ to $76.3 \pm 4.5\%$ under dynamic conditions and from $79.8 \pm 5.1\%$ to $62.3 \pm 6.0\%$ under static conditions (figure 3). This phenomenon may be explained by the fact that the mixture of calixarene nanoemulsion and uranium contaminated solution is less well homogenized under static condition in case of small contaminated solution volume. Hence, the calixarene nanoemulsion becomes slightly less efficient in case of small contaminated volume, but its efficacy could still be high enough to prevent uranium diffusion through contaminated skin, in particular if the calixarene nanoemulsion application is repeated.

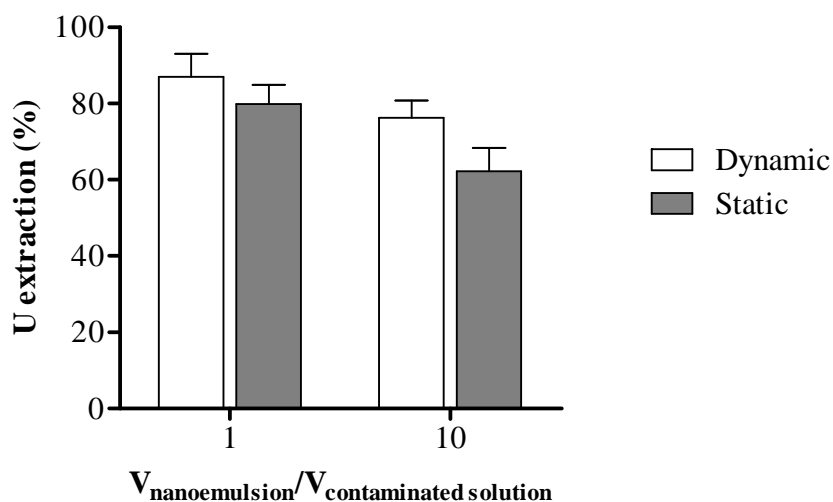


Figure 3: Percentage of uranium extracted from a contaminated solution by a 2 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsion as a function of the volume ratio of calixarene nanoemulsion over uranium contaminated solution (under 1 hour dynamic and static conditions with a 10,000-fold calixarene molar excess at pH 5).

3.2.2. Contaminated solution pH

Since most of the contaminated injuries occurring to nuclear workers happens with acidic solutions, it was necessary to study the influence of the uranium contaminated solution pH on the calixarene

nanoemulsion efficiency. Boulet *et al.* in their previous liquid-liquid extraction experiments (16) showed a decrease of the uranium extraction by calixarene from 100% at pH 5 to 0% at pH 2.5 due to the protonation of the carboxylic functions of the calix[6]arene molecules. In the present work, the influence of the contaminated solution pH on uranium extraction by the calixarene nanoemulsion was investigated by reducing this pH from 5 to 2. A preliminary study was carried out to determine the uranium retention yield at each uranium solution pH by the Microcon® filters used for the ultrafiltration step. Uranium retention by the filters decreased from 50% to 10% between pH 5 and 3 and was relatively constant between pH 3 and 2. The fact that uranium retention is influenced by the pH of the ultrafiltered solution may be explained by an interaction between the uranyl ions and the hydroxyl groups of the cellulose filters (17). The protonation of these hydroxyl groups seems to be significant enough for pH values lower than 3 to limit uranium retention. The influence of the contaminated solution pH on the uranium extraction by the calixarene nanoemulsion was then studied. The percentage of extracted uranium by the calixarene nanoemulsion decreased from $93.2 \pm 0.4\%$ to $11.4 \pm 0.7\%$ under dynamic condition and from $79.8 \pm 5.1\%$ to $10.0 \pm 1.3\%$ under static condition when the contamination pH was reduced from 5 to 2 (figure 4). To improve calixarene nanoemulsion efficiency for uranium extraction at an acidic pH, a 2 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsion was prepared with a pH 5 acetate buffered water phase (named afterwards the buffered nanoemulsion). The efficacy of the buffered nanoemulsion was then compared to the one of the non-buffered calixarene nanoemulsion under static condition (figure 5). In the case of an uranium contaminated solution at pH 5, the buffered calixarene nanoemulsion was found to be as efficient as the non-buffered one with an uranium extraction yield of about 87%. In the case of a contaminated solution at pH 2, the uranium extraction yield by the non-buffered nanoemulsion decreased to about 10% while the pH 5 buffered calixarene nanoemulsion extracted $65.8 \pm 2.3\%$ of the uranium from the acidic contaminated solution. The calixarene nanoemulsion efficacy can thus be significantly improved in case of acidic contaminated solution by buffering the aqueous phase of the nanoemulsion.

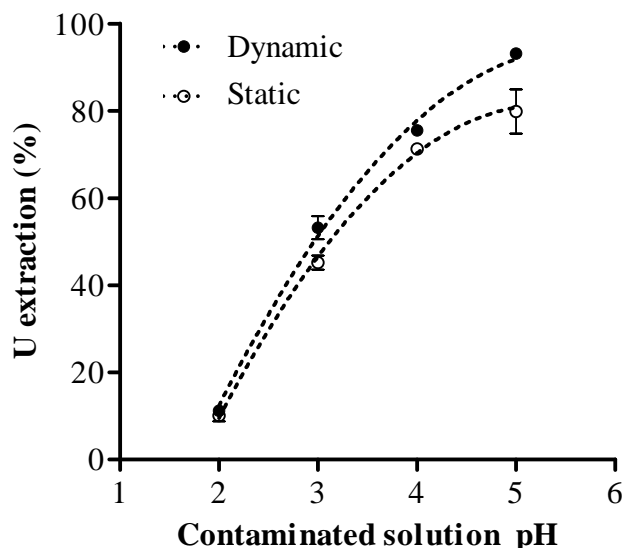


Figure 4: Percentage of uranium extracted from a contaminated solution by a 2 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsion as a function of the uranium contaminated solution pH. Experimentations were conducted during 1 hour under dynamic and static contact with equal volumes of nanoemulsion and contaminated solution and a 10,000-fold calixarene molar excess.

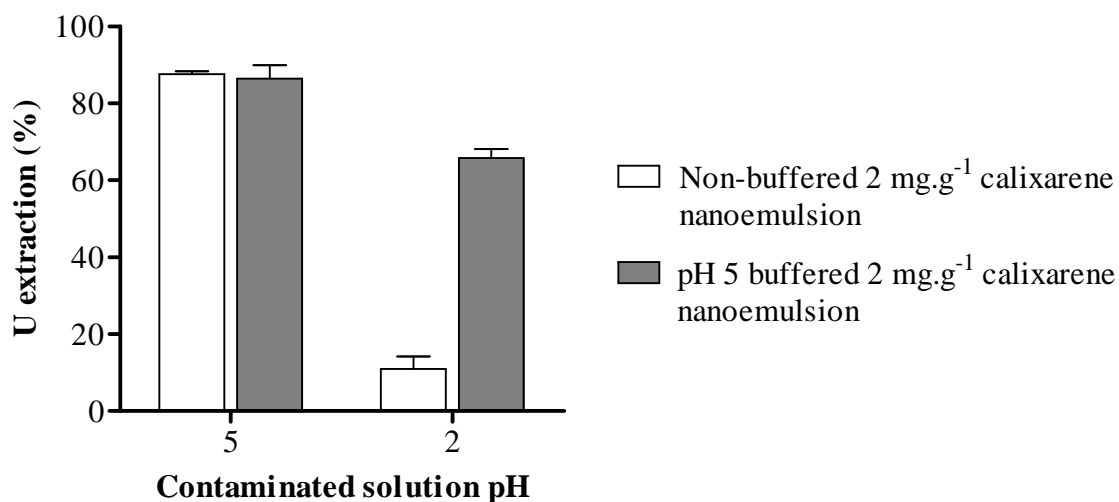


Figure 5: Percentage of uranium extracted from pH 2 and pH 5 contaminated solutions by pH 5 buffered and non-buffered 2 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsions. Experimentations were conducted during 1 hour under static contact with a calixarene nanoemulsion volume three times higher than the contaminated solution one and a 10,000-fold calixarene molar excess.

3.2.3. Calixarene:uranium quantitative ratio

All experiments were conducted with a calixarene:uranium molar ratio of 10,000 representing a sufficient calixarene excess to ensure good uranium extraction by calixarene molecules (16). The

present experiment consists in determining the minimal calixarene:uranium molar ratio which is required to reach the optimal efficiency of the 2 mg.g⁻¹ calixarene loaded nanoemulsion under 1 hour static contact with an uranium contaminated solution. For this purpose, different calixarene:uranium ratios have been tested, keeping the nanoemulsion:contaminated solution volumes ratio equal to one (Table 2).

As it can be observed in figure 6, the 2 mg.g⁻¹ calixarene loaded nanoemulsion shows an optimal uranium extraction yield of approximately 80% until a calixarene:uranium molar ratio value of 32, which corresponds to an uranium contaminated solution of 12.5 mg.l⁻¹. At a calixarene:uranium molar ratio of 16 (*i.e.*, an uranium concentration of the contaminated solution of 25 mg.l⁻¹), the calixarene nanoemulsion efficiency is divided by two and becomes nil for smaller calixarene:uranium molar ratios. To obtain a quantitative uranium extraction rate in liquid-liquid extraction experiments under similar conditions, the molar ratio was shown to be much higher than 10,000 (16, 18), which shows the interest of our emulsified system.

Table 2. Uranium concentrations of contamination solutions ($\mu\text{g.l}^{-1}$) and corresponding $Q_{\text{calixarene}}/Q_{\text{uranium}}$ ratios used for studying the influence of the calixarene:uranium molar ratio on the uranium extraction efficiency of the 2 mg.g⁻¹ calixarene loaded nanoemulsion

$Q_{\text{calixarene}}/Q_{\text{uranium}}$	Uranium concentration ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
10,000	40
2,000	200
40	10,000
32	12,500
16	25,000
8	50,000
4	100,000
1	400,000

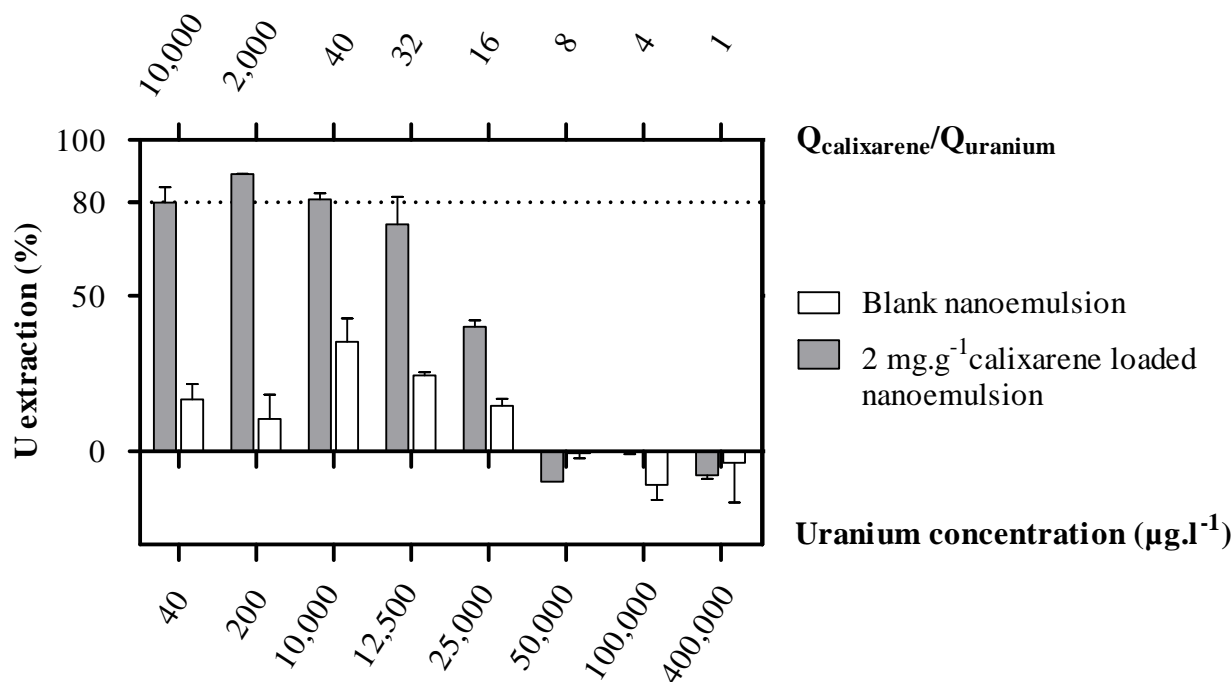


Figure 6: Percentage of uranium extracted from a contaminated solution by non loaded and 2 mg.g⁻¹ calixarene loaded nanoemulsions as a function of the uranium concentration in the contaminated solution (µg.l⁻¹). Experimentations were conducted during 1 hour under static condition with equal volumes of nanoemulsion and pH 5 contaminated solution. $Q_{\text{calixarene}}/Q_{\text{uranium}}$ is the calixarene:uranium molar ratio.

3.2.4. Optimal calixarene concentration in the nanoemulsion

In this part of the study, the calixarene:uranium molar ratio was also varied but with an uranium concentration of the contaminated solution kept at 25 mg.l⁻¹. The calixarene concentration of the nanoemulsion was increased from 2 to 8 mg.g⁻¹ in order to determine the optimal calixarene concentration that ensures the best uranium extraction rate. The percentage of extracted uranium was almost doubled for a calixarene concentration increase from 2 to 4 mg.g⁻¹ (figure 7). However, the use of a 8 mg.g⁻¹ calixarene loaded nanoemulsion does not allow to improve the nanoemulsion efficiency. This suggests that the additional quantity of calixarene in this nanoemulsion is not available for the chelation of uranium, which is in agreement with the characterization of the nanoemulsion that showed, using optical microscopy, the presence of calixarene crystals in the nanoemulsion aqueous phase from a calixarene concentration of 6 mg.g⁻¹ (9). Therefore, it appears that the 4 mg.g⁻¹ calixarene concentration seems to be close to the optimal nanoemulsion calixarene concentration in terms of uranium extraction capacity.

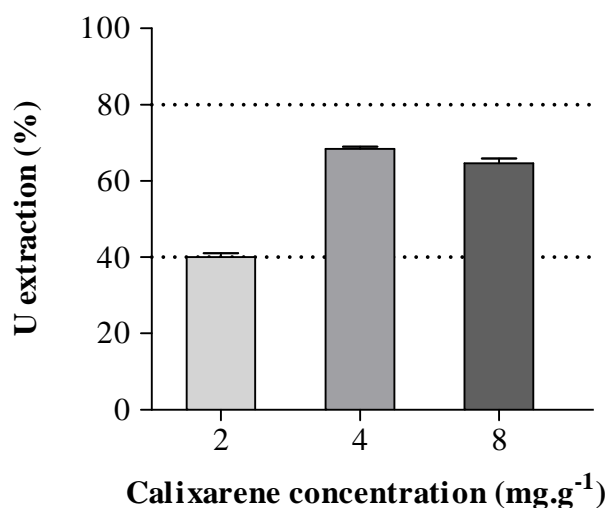


Figure 7: Percentage of uranium extracted from a contaminated solution by calixarene loaded nanoemulsions as a function of the calixarene concentration in the nanoemulsion. Experimentations were conducted during 1 hour under static condition with a 25 mg.l⁻¹ contaminated solution of pH 5, equal volumes of nanoemulsion and contaminated solution and a 10,000-fold calixarene molar excess.

Conclusions and perspectives

The aim of this work was to study the ability of a calixarene nanoemulsion to extract uranyl ions from an aqueous contaminated solution. For this purpose, the influence of various experimental parameters on uranium extraction by calixarene nanoemulsion was determined. The *in vitro* experiments based on the use of an adapted ultrafiltration method showed that the action of the calixarene nanoemulsion is very fast and that the effect is maintained in case of small contaminated volumes. Moreover, contaminated solution pH was found to be the most important parameter affecting the calixarene nanoemulsion efficiency. However, the use of a buffered aqueous phase in the calixarene nanoemulsion improves its efficiency in acidic conditions. Lastly, the optimal calixarene concentration in the nanoemulsion was found to be around 4 mg.g⁻¹. This study has then demonstrated that the calixarene nanoemulsion is suitable for uranium extraction in static condition, which is promising for our purpose of topical application. The next step of our work will consist in evaluating the calixarene nanoemulsion efficiency in terms of uranium skin decontamination in *ex vivo* experiments on skin samples using Franz diffusion cells.

Acknowledgements

Research funds were granted by the Délégation Générale pour l'Armement (DGA) and the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN).

References

1. N. Blanchin, S. Desloires, L. Grappin, A. M. Guillermin, P. Lafon and A. Miele, Protocols in an occupational medical facility for the management of internal plutonium exposure incidents in a nuclear plant: development – application – analysis – validation from 1996 to 2002. *Radioprotection* **39**, 59-75 (2004).
2. M. R. Bailey, V. Beral, D. B. Clayton, S. C. Darby, D. T. Goodhead, J. Hendry, C. Marsh, V. Murray, B. Smith, et al., The health effects of depleted uranium munitions: A summary. *J. Radiol. Prot.* **22**, 131-139 (2002).
3. G. Zhu, X. Xiang, X. Chen, L. Wang, H. Hu and S. Weng, Renal dysfunction induced by long-term exposure to depleted uranium in rats. *Archives of Toxicology* **83**, 37-46 (2009).
4. A. Bleise, P. R. Danesi and W. Burkart, Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* **64**, 93-112 (2003).
5. A. C. Miller, D. Beltran, R. Rivas, M. Stewart, R. J. Merlot and P. B. Lison, Radiation and depleted uranium-induced carcinogenesis studies: characterisation of the carcinogenic process and development of medical countermeasures. In *NATO Human Factor Medicine Panel Research Task Group 099 "Radiation Bioeffects and Countermeasures" meeting*, Bethesda, Maryland, USA, 2005.
6. ASN, Guide national : Intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. 2008. Available at: <http://www.asn.fr/lasn-publie-la-version-2008-du-guide-intervention-medicale-en-cas-devenement-nucleaire-ou-radiologiq>.
7. P. W. Durbin, Lauriston S. Taylor Lecture: the quest for therapeutic actinide chelators. *Health Phys.* **95**, 465-492 (2008).
8. P. W. Durbin, B. Kullgren, J. Xu and K. N. Raymond, Development of decorporation agents for the actinides. *Radiation Protection Dosimetry* **79**, 433-443 (1998).
9. A. Spagnul, C. Bouvier-Capely, G. Phan, F. Rebière and E. Fattal, Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium extraction from contaminated solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (In Press, DOI 10.1002/jps.21932).
10. R. Duval, C. Cossonnet, C. Bouvier-Capely, C. Le Strat and B. Boulet, Para-tertio-butylcalix[6]arenes portant des fonctions triacides en positions 2, 4 et 6, membranes liquides supportées et matériaux supports les comportant et leurs utilisations. In *Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire*, France, 2006.
11. N. Baglan, C. Cossonnet, F. Trompier, J. Ritt and P. Bérard, Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Phys.* **77**, 455-461 (1999).
12. C. Bouvier-Capely, N. Baglan, A. Montegue, J. Ritt and C. Cossonnet, Validation of uranium determination in urine by ICP-MS. *Health Phys.* **85**, 216-219 (2003).

13. C. Bouvier-Capely, J. Ritt, N. Baglan and C. Cossonnet, Potentialities of mass spectrometry (ICP-MS) for actinides determination in urine. *Applied Radiation and Isotopes* **60**, 629-633 (2004).
14. C. Moulin, P. Reiller, C. Beaucaire and D. Lemordant, Time-Resolved Laser-Induced Spectrofluorometry for the Study of Uranium-Anionic Surfactant Micelle Interactions. *Journal of Colloid And Interface Science* **157**, 411-417 (1993).
15. S. Kumar Das and B. Nandi Ganguly, Study of Triton X-100 surfactant-UO₂+2 aqueous system by positron annihilation technique. *Radiation Physics and Chemistry* **47**, 257-262 (1996).
16. B. Boulet, C. Bouvier-Capely, C. Cossonnet and G. Cote, Solvent extraction of U(VI) by calix[6]arenes. *Solvent Extraction and Ion Exchange* **24**, 319-330 (2006).
17. L. Guo, K. W. Warnken and P. H. Santschi, Retention behavior of dissolved uranium during ultrafiltration: Implications for colloidal U in surface waters. *Marine Chemistry* **107**, 156-166 (2007).
18. N. Baglan, C. Dinse, C. Cossonnet, R. Abidi, Z. Asfari, M. Leroy and J. Vicens, Investigation of U(VI) extraction with calixarene: application to analysis of urine sample. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* **226**, 261-265 (1997).

CHAPITRE III

**Evaluation de l'efficacité de la nanoémulsion de calixarène comme traitement de
la contamination cutanée :**

**Etude *ex vivo* sur des explants de peau d'oreille de porc intacte ou lésée
contaminés par de l'uranium**

Nous avons démontré dans les chapitres précédents le potentiel de la nanoémulsion de calixarène développée pour le traitement des contaminations cutanées par l'uranium. En effet, les études *in vitro* ont montré que cette formulation est capable d'extraire plus de 80 % des ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée, et ce, dès les premiers instants de contact entre la nanoémulsion de calixarène et la solution contaminée.

L'objectif du chapitre III est d'étudier l'action de la nanoémulsion de calixarène sur la contamination cutanée par l'uranium. Des expérimentations ont alors été menées *ex vivo* en cellule de Franz durant 24 heures sur des explants de peau d'oreille de porc intacte et sur un modèle de peau lésée obtenu par excoriation, c'est-à-dire par élimination de la couche cornée, strate la plus externe de la peau qui constitue la barrière à la pénétration d'éléments exogènes. L'action de décontamination de la nanoémulsion de calixarène a été déterminée à partir des cinétiques de diffusion percutanée de l'uranium obtenues suite à l'application ou non de la nanoémulsion de calixarène sur les explants de peau contaminés par une solution d'uranium sous forme transférable. A l'issue de ces expérimentations de diffusion percutanée, la distribution de l'uranium dans les tissus cutanés a été déterminée par microscopie ionique.

L'étude présentée dans ce chapitre a tout d'abord permis de confirmer le fait que la peau intacte constitue une bonne barrière contre l'entrée de l'uranium. L'évaluation du passage de l'uranium à travers la peau excoriée a quant à elle montré que le passage de l'uranium à travers ce type de blessure superficielle est rapide et important. Les études d'efficacité de la nanoémulsion de calixarène menées en cellule de Franz ont démontré que, lorsque la formulation est appliquée immédiatement après une contamination cutanée, le passage de l'uranium à travers la peau intacte et la peau lésée est réduit respectivement de 94 % et 98 % 24 heures après l'exposition. Il a également été mis en évidence que la nanoémulsion de calixarène demeure efficace lorsque son application est retardée jusqu'à 30 minutes, permettant une réduction de 71 % de la quantité d'uranium diffusée à travers la peau lésée 24 heures après la contamination. Enfin, les images obtenues par microscopie ionique indiquent que la nanoémulsion de calixarène extrait et retient les ions uranyle de la solution contaminée à la surface de la peau.

Cette étude *ex vivo* menée sur la peau montre que l'application de la nanoémulsion de calixarène sur une peau intacte ou sur une blessure superficielle contaminée par une solution d'uranium permet de limiter voir d'empêcher le passage de ce radioélément à travers la peau. Les résultats obtenus dans ces travaux confirment le fait que la nanoémulsion de calixarène constitue un système prometteur adapté au traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium.

Publication 3: *Ex vivo* reduction of uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene nanoemulsion

à soumettre

Aurélie Spagnol^{1,2,3}, Céline Bouvier-Capely³, Guillaume Phan³, Christine Tessier³, David Suhard³, François Rebière³, Elias Fattal^{1,2}

¹ Univ Paris Sud, UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

² CNRS, UMR 8612, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

³ IRSN/DRPH/SDI/LRC, BP 17, F-92262 Fontenay aux Roses, France

Abstract

Cutaneous contamination by radionuclides is a major concern in the nuclear industry. In the case of skin exposure to uranium, no efficient emergency treatment is available to remove the amount of uranium contaminating the skin. For this purpose, we developed a nanoemulsion containing calixarene molecules known for their good chelating properties towards uranium. In this paper, we describe the ability of this formulation to trap uranium at the cutaneous contaminated site in order to limit its transfer into the blood. Uranium percutaneous diffusion kinetics was then assessed with Franz cells over 24 hours through intact and excoriated pig ear skin biopsies, as a function of the application or not of the nanoemulsion. Uranium distribution in the skin layers was analysed by SIMS microscopy. The results showed that prompt application of the calixarene nanoemulsion allows a 94% and 98% reduction of the amount of uranium diffused respectively through intact and excoriated skin. The formulation is still efficient in case of delayed application up to 30 minutes since the 24 hour-uranium transfer through excoriated skin is reduced by 71%. Moreover, no accumulation of uranium or uranium-calixarene chelate was observed in the different cutaneous layers. In conclusion, this study demonstrated the efficiency of the calixarene nanoemulsion, which constitutes a promising treatment for uranium cutaneous contamination.

1. Introduction

Accidental cutaneous contamination by radionuclides represents, after inhalation, the second cause of internal contamination of nuclear workers (Blanchin *et al.*, 2004). Cutaneous contamination by uranium, the nuclear fuel in most of fission reactors for electrical energy production, may induce a high internal exposure after translocation of the radioelement through intact or excoriating skin (De Rey *et al.*, 1983; Lopez *et al.*, 2000; Petitot *et al.*, 2004). Indeed, in case of contamination of superficial injuries by soluble uranium compounds, the radionuclide can be transferred from the wound site to the bloodstream in less than 30 minutes (Petitot *et al.*, 2007a; Petitot *et al.*, 2007b). Subsequently, uranium is partly excreted in urines and distributed in its main retention organs, *i.e.* kidneys and bones, where respectively chemical and radiological toxicities may occur (Bleise *et al.*, 2003; Kathren and Burklin, 2008a, b; Miller *et al.*, 2005). To our knowledge, no effective and specific dosage form is available to treat in emergency skin uranium contamination (ASN, 2008; Rojas-Palma *et al.*, 2009). Indeed, the common medical care of victims only consists in a local rinsing of the contaminated wound with soaped water or 25% calcium salt of diethylene triamine pentaacetic acid (Ca-DTPA), afterwards Ca-DTPA decorporation treatments are intravenously administered at the medical unit of the nuclear site in order to enhance urinary excretion of radionuclides. Unfortunately, Ca-DTPA exhibits a poor efficiency towards uranium which means that these procedures are ineffective (Durbin, 2008; Durbin *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 2006; Pavlakis *et al.*, 1996). To improve the treatment of skin contamination by radionuclides, some research groups have developed topical formulations containing biphosphonates as uranium chelating agents in order to limit the translocation of uranium from the wound site (Houpert *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2005). However, no biphosphonate chelating effect was actually demonstrated in these studies. In this context, we have developed a new dosage form (Spagnul *et al.*, In Press) consisting of an oil in water nanoemulsion containing a calixarene molecule (Figure 1) developed in our laboratories for radiotoxicological analyses purpose and known for its particular uranium chelation properties (Boulet *et al.*, 2006; Bouvier-Capely *et al.*, 2009). Previous *in vitro* experiments demonstrated that this calixarene nanoemulsion was able to extract more than 80% of uranyl ions from an aqueous contaminated solution (Spagnul *et al.*, Submitted).

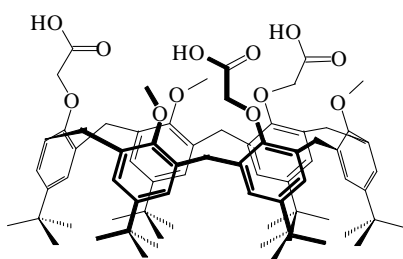


Figure 1: Structure of 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arene

The aim of the present work is to estimate the ability of this formulation to limit the diffusion of uranium through intact and wounded skin after contamination by a solution containing uranyl ions, which is a highly transferable uranium form. Franz diffusion cells, an *ex vivo* technique commonly used in skin pharmacology and validated for radiotoxicological studies (Tymen *et al.*, 2000), was employed to study the percutaneous uranium diffusion after or without application of the calixarene nanoemulsion. Ionic microscopy technique was used in complement to localise uranium in the skin layers for each condition.

2. Materials and methods

2.1. Skin sampling and measurements

2.1.1. Pig ear skin samples preparation

Pig ears were purchased from slaughterhouse with the veterinary department authorisation (Direction Départementale des Services Vétérinaires de Hauts de Seine, France). Pig ears were stored at -20°C until use. Before each experiment, they were warmed to room temperature. Full thickness skin pieces were then removed from the external face of the ears (Meyer *et al.*, 2007) and prepared to fit to Franz diffusion cells for diffusion assays.

2.1.2. Wound generation by excoriation

The *stratum corneum* of whole pig ear skin was removed by tape stripping using standard D-Squame® adhesives (Ø 28 mm, Monaderm®, Monaco) pressed onto the skin using a D-Squame® applicator providing a constant 150 g.cm⁻² pressure. Tapes were removed with one quick movement. To determine the number of adhesive application required to remove the *stratum corneum*, 0, 20, 40 and 60 tapes were applied. Skin samples were embedded in OCT compound (Optimal Cutting Temperature compound, Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Villeneuve d'Ascq, France) and frozen. Ten micrometers cryostat skin sections were fixed and stained with Mayer's hemalun. Stained skin sections were then observed with an optical Leitz Diaplan microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) equipped with a Coolsnap ES camera (Roper scientific, Evry, France). A minimum of 12 cryosections coming from different pig ear skin biopsies were analysed for each test (2 pig ears and 3 skin pieces per pig ear for each tape number tested).

2.1.3. Thickness measurement of skin pieces

The thickness of whole pig ear skin samples was measured before diffusion assay using a thickness gage (Mitutoyo Corporation, Roissy, France). The mean thickness of intact and excoriated skin samples was respectively 1.07±0.10 mm and 0.92±0.05 mm (mean of 12 assays ± standard deviation).

2.1.4. Transepidermal Water Loss measurements

The Transepidermal Water Loss (TEWL) of intact and excoriated skin samples was determined before each diffusion assay by using a Tewameter TM 300® (Monaderm®, Monaco) equipped with an adapted probe. Room temperature and relative humidity were checked to meet the optimal use conditions of the apparatus.

2.2. *Ex vivo* procedures

2.2.1. Franz diffusion cells

The Franz diffusion cells system used was a MicroettePlus™ apparatus (Fig. 2, Hanson Research Corp., Chatsworth, California, USA). Transcutaneous diffusion was assessed according to OECD guidelines (OECD, 2004). Franz cell receptor compartment was filled with 7 ml of 0.25M carbonate-bicarbonate pH 9.8 buffer (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) homogenised by magnetic stirring (400 rpm) and maintained at 33.5°C to ensure a surface skin temperature of 32°C (OECD, 2004). The dermal face of the skin biopsy was placed on the donor compartment in contact with the receptor medium and the epidermal face was covered with the donor compartment. The whole device was then fixed with a clamp. The contaminated solution was deposited on 1.76 cm² of the skin epidermal face in the donor compartment. Skin surface temperature was measured with a thermometer (Testo 925, Testo, France) equipped with an adapted probe (Testo, France). All Franz diffusion cell experiments were conducted under occlusive condition. The uranium diffusion kinetics was evaluated by automatically sampling 1 ml aliquots of receptor fluid at the following predetermined times: 0, 0.5, 2, 4, 6, 12, 18 and 24 hours. Franz cell blank experiments were conducted with skin biopsies that were not contaminated by uranium in order to evaluate the release of uranium that is naturally contained into the skin samples as a function of time. The diffusion kinetics of uranium from the contaminated solution deposited onto the skin was then determined by subtracting for each time the cumulative quantity of natural uranium recovered in the receptor fluid for blank experiments to the cumulative quantity of uranium obtained after skin contamination. Uranium diffusion kinetics was represented by plotting the percentage of cumulative quantity of uranium that diffused through skin as compared with the initial quantity of deposited uranium as a function of time. The uranium diffusion steady state flux (ng.cm⁻².h⁻¹) was determined from the plot of the cumulative diffused uranium mass per unit skin area versus time. It was estimated from the slope of this plot when the rate of diffusion was constant over time.

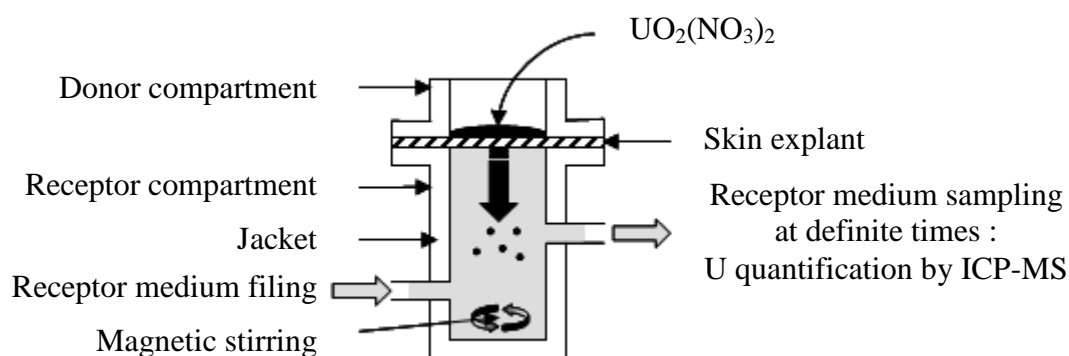


Figure 2: Schematic representation of a Franz diffusion cell.

2.2.2. Radiocontamination of skin

The contamination was made by depositing 600 μl of 10 mg.l^{-1} uranyl nitrate solution buffered at $\text{pH} = 5$ with a 0.01 M acetate solution on the skin biopsies in the Franz cells donor compartment. This contaminated solution volume corresponds to the minimal one required to cover uniformly the skin surface, which ensures optimal transcutaneous diffusion conditions by avoiding lateral diffusion phenomenon. Uranium contaminated solution was prepared by diluting a standard depleted uranium solution (1,000 mg.l^{-1} in 2% HNO_3 , SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France). The contaminated solution pH was adjusted to 5 with 0.01 M acetate buffer (Normapur, VWR, Fontenay sous Bois, France) (Spagnul *et al.*, Submitted). The contaminated solution was kept in contact with the skin samples during the 24 hours of diffusion kinetics study.

2.2.3. Skin decontamination by calixarene nanoemulsion

To assess the calixarene nanoemulsion decontamination efficiency, a 600 μl volume of 4 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsion was deposited on intact and excoriated contaminated skin biopsies in the donor compartment of the Franz cells by the mean of a syringe. The dosage form was first applied immediately after the contamination step. It was also applied 5, 15 and 30 minutes after the skin contamination step on excoriated contaminated skin samples.

2.2.4. Sample analysis

The ^{238}U content of receptor fluid samples was measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS, X Series II, Thermo Electron, Courtaboeuf, France) using optimised protocols originally designed for human urine samples (Baglan *et al.*, 1999; Bouvier-Capely *et al.*, 2003; Bouvier-Capely *et al.*, 2004). Aliquots were properly diluted in 2% HNO_3 (67% HNO_3 solution, Normatom, VWR, Fontenay sous Bois, France) and ^{209}Bi (10 mg.l^{-1} single element internal standard, SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France) was added as internal standard at 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$. As diluted solutions were prepared by weighing, the related uncertainties can be neglected compared to the statistical ones. The combination of the statistical

errors was made using the conventional law of error propagation. In all experiments, standard deviations of ICP-MS measurements (< 2%) were negligible as compared to the variation of the uranium percutaneous diffusion through the skin biopsies. A multielemental standard stock solution containing depleted uranium at $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (from a 10 mg.l^{-1} tuning solution SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France) prepared in 2% HNO_3 solutions (from a 67% HNO_3 solution, Normatom, VWR, Fontenay sous Bois, France) was used before each ICP-MS measurement series to optimise the ^{238}U signal and get the best instrumental conditions. Comparison between means of cumulative quantities of diffused ^{238}U obtained during the kinetics studies were done by using t-test nonparametric statistical test with $\alpha = 0.05$.

The calixarene content in receptor medium aliquots was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The HPLC system used was an Agilent 1200 Series apparatus (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with an auto-sampler (1200 Series Standard Autosampler), a mobile phase delivery pump (1200 Series Quaternary Pump) associated with a degasser (1200 Series Vacuum Degasser), a UV-Visible detector (Multi-Wavelength Detector) and a data module (HPLC 2D ChemStation Software). The stationary phase was a Zorbax Eclipse XDB-C8 column (150 x 4.6 mm., 5 micron) and a mixture of acetonitrile and 0.05% trifluoroacetic acid (HPLC grade, Sigma-Aldrich Saint-Quentin-Fallavier, France) was employed as mobile phase. Samples were diluted in tetrahydrofuran (HPLC grade, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) in ratio 1:1 (v/v). The injection volume was set at $20 \mu\text{l}$ and the absorbance measurement was performed at 210 nm, a wavelength that is suitable to detect the calixarene. Calibration curves were performed from $0.05 \mu\text{g.ml}^{-1}$ to $0.5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ by diluting appropriate amount of calixarene powder in a mixture of carbonate-bicarbonate buffer and tetrahydrofuran in ratio 1:1 (v/v). The detection limit of the analytical method was $0.02 \mu\text{g.ml}^{-1}$ and the quantification limit was $0.05 \mu\text{g.ml}^{-1}$.

2.2.5. Localisation of uranium in skin biopsies by SIMS microscopy

At the end of the 24 hours Franz cell diffusion experiments, skin biopsies were thoroughly rinsed with water and fixed in a solution containing 6% glutaraldehyde in a sodium cacodylate buffer at 4°C during one day. Skin samples were then dehydrated in various propylene oxide and ethanol baths, permeated with a propylene oxide/Epon mixture and then embedded in pure EPON-type resin. Skin sections ($0.9 \mu\text{m}$) of embedded samples were cut and laid on silicium or gold holders for SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) analysis. The SIMS microscopy, which allows the elemental and isotopic analysis of a solid surface, is based on the sputtering of a few atomic layers from the surface of a sample by O^{2+} primary ions beam bombardment. The ejected secondary ions are collected and analysed by mass spectrometry. Then, compositional images of the surface are formed from the secondary ions spectra. A more detailed description of the physical phenomenon is provided in the literature (Castaing and Slodzian, 1962; Tessier *et al.*, 2009). For each skin area

analysed, $^{40}\text{Ca}^+$ or $^{23}\text{Na}^+$ images gave the histological structure of the skin and $^{238}\text{U}^+$ images showed uranium localisation within the cutaneous structures. The SIMS analyses were performed with a CAMECA IMS 4F-E7 instrument (Gennevilliers, France).

3. Results

3.1. Wound generation by tape stripping (excoriation)

The number of tapes required to remove the *stratum corneum* was determined by a histological study. After successive application of 0, 20, 40 or 60 tapes, pig ear skin sections (10 μm -thick) were observed with an optical microscope (Fig. 3). The results showed that the successive application of 60 tapes per skin biopsy was necessary to remove the whole *stratum corneum* from the skin explants.

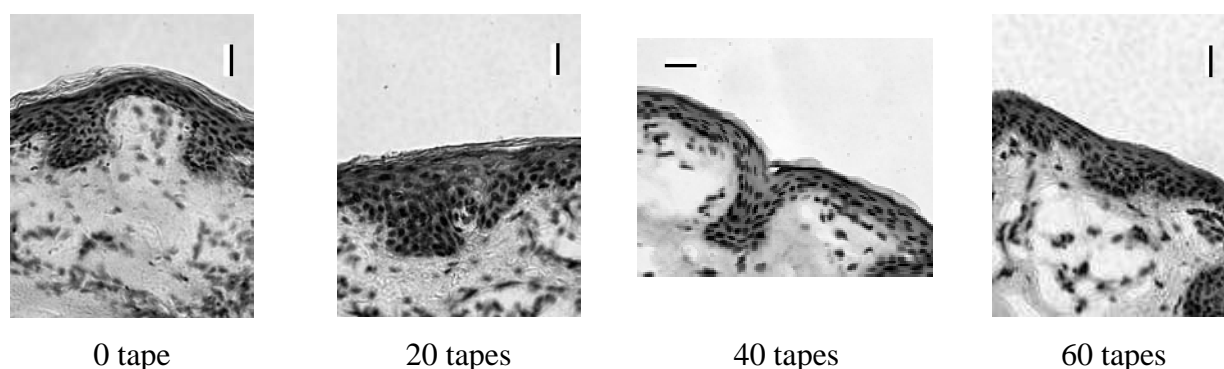


Figure 3: Microscopic observations of 10 μm -thick stained pig ear skin cryosections after the application of 0 to 60 tapes (scale: 20 μm).

3.2. Comparison of the uranium percutaneous diffusion kinetics through intact and excoriated skin

The integrity of intact pig ear skin explants in Franz diffusion cells was preliminary checked by TEWL measurement on 6 intact skin explants during 24 hours. The TEWL values were stable during the 24 hours experiment (mean TEWL value: $5.2 \pm 1.1 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$), which indicated that the skin biopsies integrity was maintained under our experimental conditions. The uranyl diffusion kinetics through intact and excoriated skin is represented in figure 4. After 24 hours of exposure, $0.07 \pm 0.03\%$ and $39.49 \pm 13.44\%$ of the initially deposited uranium has diffused respectively through intact (figure 4 (A)) and excoriated (figure 4 (B)) skin samples. Uranium was significantly ($p < 0.05$) detected in the Franz diffusion cells receptor medium from 30 min after the contamination of intact and excoriated skin. The steady-state flux of uranium was 644 times higher across excoriated skin ($77.24 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) than across intact skin ($0.12 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$). Thus, the elimination of the *stratum corneum* greatly enhanced the uranyl diffusion and the quantity of uranium that diffused across the pig ear skin samples.

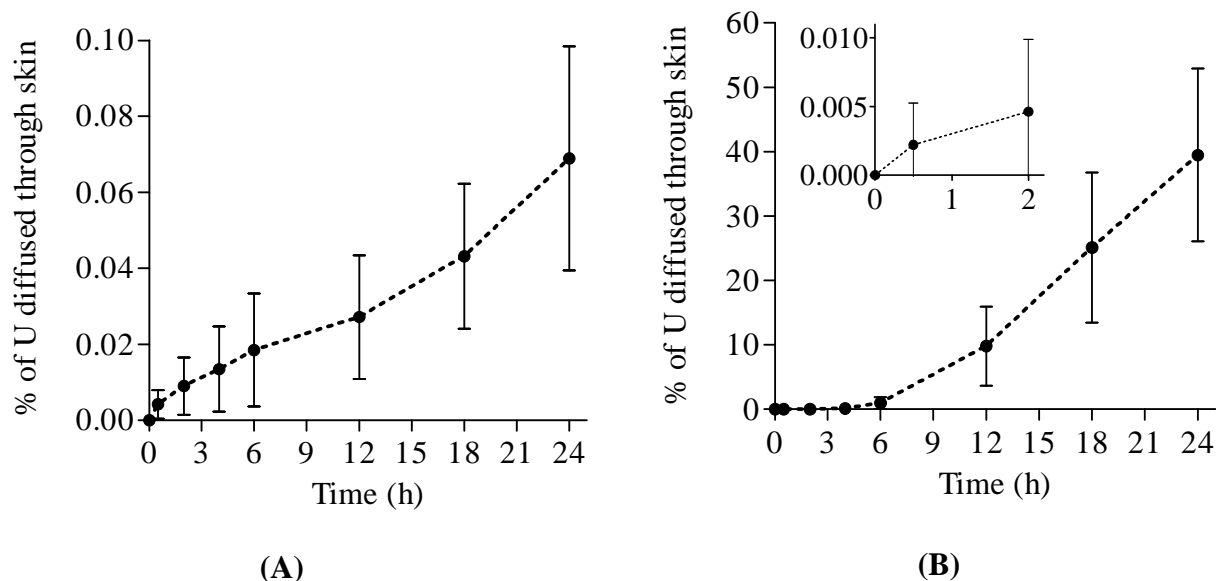


Figure 4: Uranium percutaneous diffusion kinetics in Franz diffusion cells: percentage of initially deposited uranium that diffused through intact (A) or excoriated (B) skin biopsies during the 24 hours of exposure. Each point corresponds to the mean of 10 assays \pm standard deviation.

3.3. Visualisation of uranium distribution in the skin structures after 24 hours of exposure by SIMS microscopy: comparison between intact and excoriated skin

To verify the absence of interference in SIMS analysis, the mass spectra of intact skin biopsies that were not exposed to uranium were recorded around the mass of the ^{238}U isotope (Fig. 5). No significant peak at the 238 mass was observed. Similar mass spectra have been obtained for excoriated skin biopsies. These results showed that natural uranium contained in skin biopsies was not detected by SIMS and that there was no superposition of polyatomic ions on the mass of the element of interest.

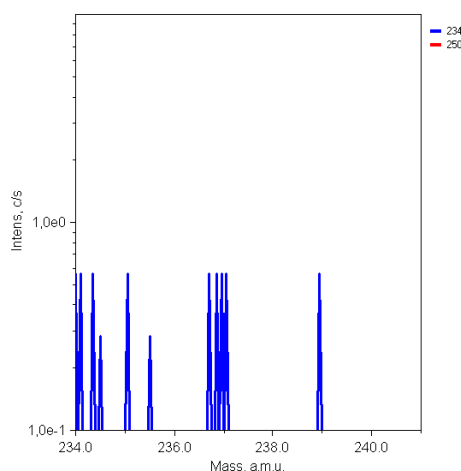
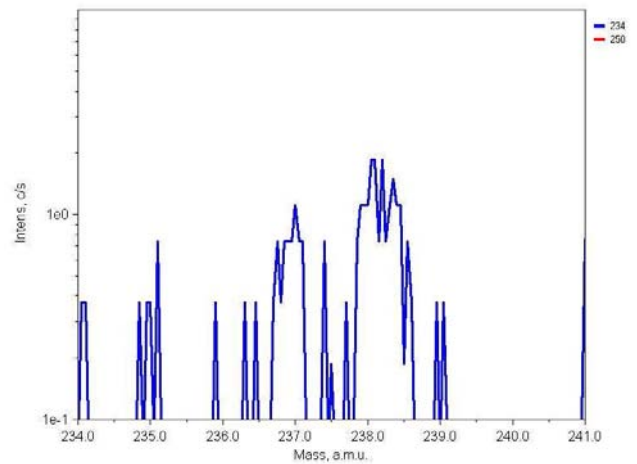
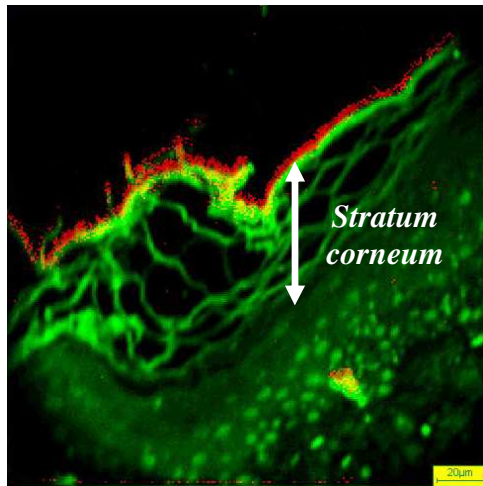
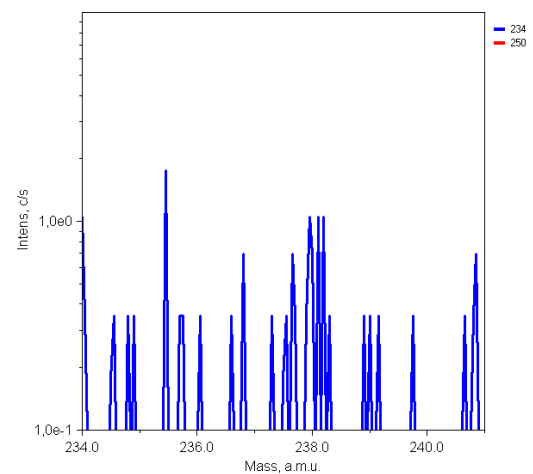
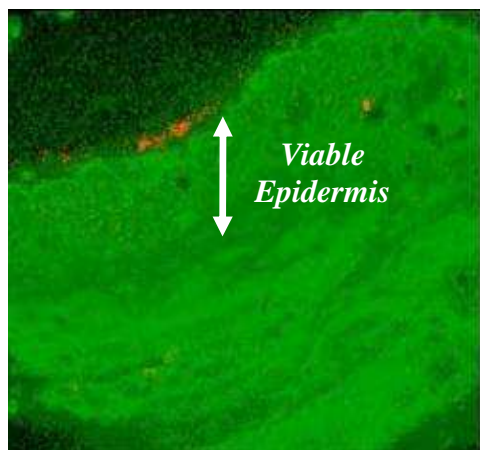


Figure 5: Mass spectrum (recorded at mass around 238) of intact skin biopsy that was not exposed to uranium.

After 24 hours of exposure to uranium, intact and excoriated skin samples were analysed by SIMS microscopy (Fig. 6). SIMS images showed an uranium accumulation in the most external layer of the *stratum corneum* of intact skin explants (Fig. 6 (A)), whereas no significant uranium accumulation was detected in the excoriated skin samples structures (Fig. 6 (B)). There was thus a significant difference of uranium repartition in the cutaneous structures between intact and excoriated skin.



(A)



(B)

Figure 6: Ionic images and corresponding mass spectra of intact (A) and excoriated (B) skin biopsies after 24 hours of exposure to 10 mg.l^{-1} uranyl solution: superposition of $^{238}\text{U}^+$ (red) and $^{40}\text{Ca}^+$ (green) images ($200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ image field).

3.4. Calixarene percutaneous diffusion from calixarene nanoemulsion

The calixarene percutaneous diffusion was determined in Franz diffusion cell experiments before assessing its decontamination efficiency. A 1 ml calixarene nanoemulsion volume was deposited on intact and excoriated skin biopsies in the Franz cell donor compartment and the diffusion of the calixarene molecule was assessed during 24 hours under occlusive condition. No calixarene was detected by HPLC in the Franz diffusion cell receptor fluid during the 24 hours experiments through both intact and excoriated skins.

3.5. Calixarene nanoemulsion efficiency on contaminated intact skin

The uranium diffusion kinetics was studied after the application of nanoemulsion without or with calixarene on intact skin biopsies immediately after the contamination step. The application of the nanoemulsion without calixarene did not significantly change the uranium diffusion kinetics (Fig. 7). In contrast, the application of the calixarene nanoemulsion allowed reducing very significantly ($p < 0.01$) the diffused uranium quantity starting from 30 minutes following contamination. Moreover, the application of the 4 mg.g^{-1} calixarene loaded nanoemulsion allowed a flux decrease of uranium from $0.12 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ in absence of treatment to $4.5 \times 10^{-3} \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ and an extremely significant ($p < 0.001$) decrease of the diffused uranium percentage after 24 hours from $0.07 \pm 0.03\%$ in absence of treatment to $0.004 \pm 0.003\%$.

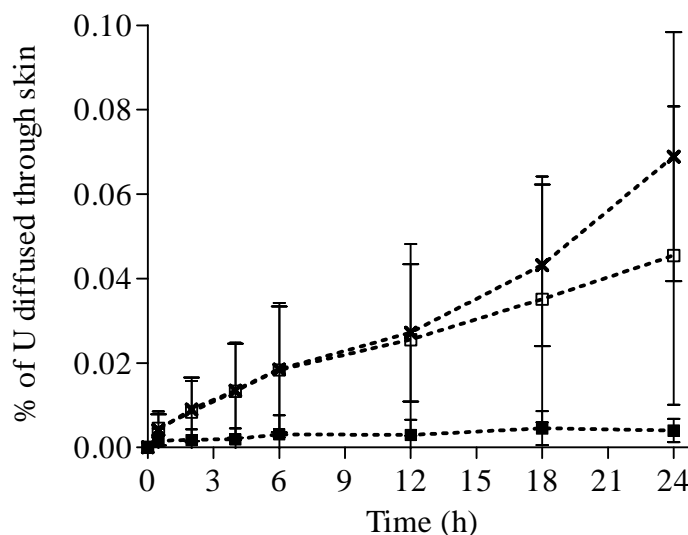


Figure 7: Uranium percutaneous diffusion kinetics through intact skin in absence of treatment (x) or after application of nanoemulsion without (□) or with 4 mg.g^{-1} calixarene (■). The treatment was applied immediately after the contamination step and the percentage of initially deposited uranium that diffused through intact skin biopsies was recorded during 24 hours. Each point corresponds to the mean of 10 assays \pm standard deviation.

At the issue of the 24 hours Franz cell diffusion experiments, intact skin biopsies were analysed by SIMS microscopy (Fig. 8). The images and mass spectra showed that after the application of the nanoemulsion without calixarene (Fig. 8 (A)), the uranium localisation was the same as that observed in absence of treatment (Fig. 6 (A)), *i.e.* an uranium accumulation in the most external layers of the *stratum corneum*. SIMS analysis revealed that, after the application of the calixarene nanoemulsion on uranium contaminated skin explants, the radionuclide was no more significantly detected in skin structures (Fig. 8 (B)). Hence, there was a significant difference of uranium repartition in the cutaneous structures between the non-treated and the calixarene nanoemulsion treated contaminated intact skins.

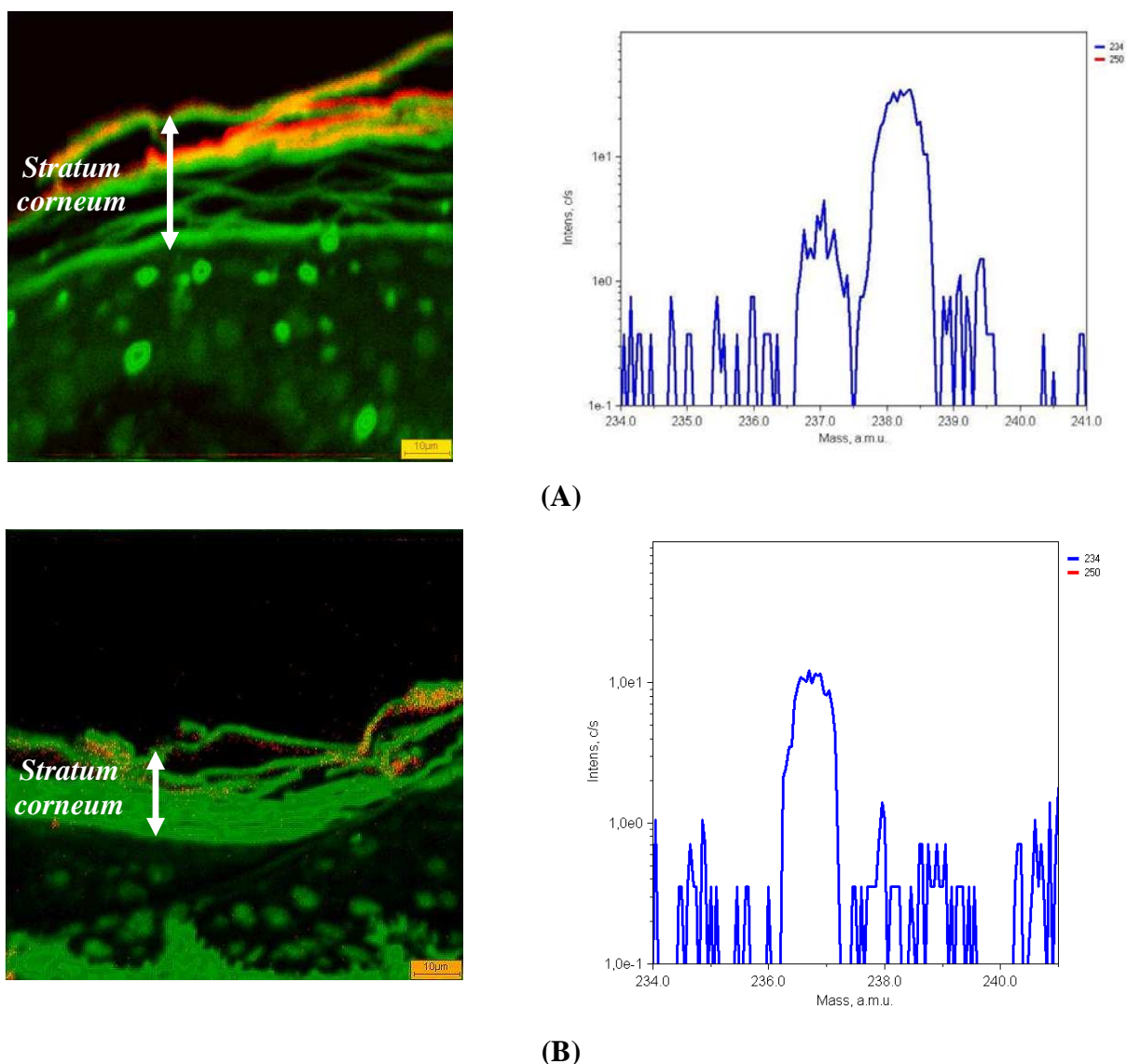


Figure 8: Ionic images and corresponding mass spectra of intact skin biopsies treated immediately after the contamination step (10 mg.l^{-1} uranyl solution) by nanoemulsion without calixarene (A) or with 4 mg.g^{-1} calixarene (B). Biopsies were analysed by SIMS microscopy 24 hours after the beginning of Franz cell experiments. In these ionic images, $^{238}\text{U}^+$ image (red) was superposed to $^{23}\text{Na}^+$ (A; green) or $^{40}\text{Ca}^+$ (B; green) images ($100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ image field).

3.6. Calixarene nanoemulsion efficiency on contaminated excoriated skin

Nanoemulsion without or with calixarene was deposited on excoriated skin biopsies immediately after the contamination step and the uranium diffusion kinetics was followed during 24 hours (Fig. 9). The application of nanoemulsion without or with calixarene allowed decreasing significantly ($p < 0.05$) the quantity of diffused uranium starting 4 hours after contamination. The application of the non loaded nanoemulsion and of the calixarene loaded nanoemulsion respectively led to a 6-fold ($12.67 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) and to a 36-fold ($2.16 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) uranium steady state flux reduction. The percentage of diffused uranium after 24 hours was decreased from $39.49 \pm 13.44\%$ in absence of treatment to $6.32 \pm 2.43\%$ and to $0.97 \pm 0.57\%$ by nanoemulsion respectively without and with calixarene. The dilution effect on uranium diffusion kinetics was studied by depositing 600 μl of water in the Franz cell donor compartment immediately after the contamination step. The application of water on contaminated excoriated skins led to a 3.4-fold diminution of the uranium steady state diffusion flux ($22.61 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) and to an approximate 2-fold reduction of the diffused uranium percentage after 24 hours ($16.19 \pm 8.00\%$).

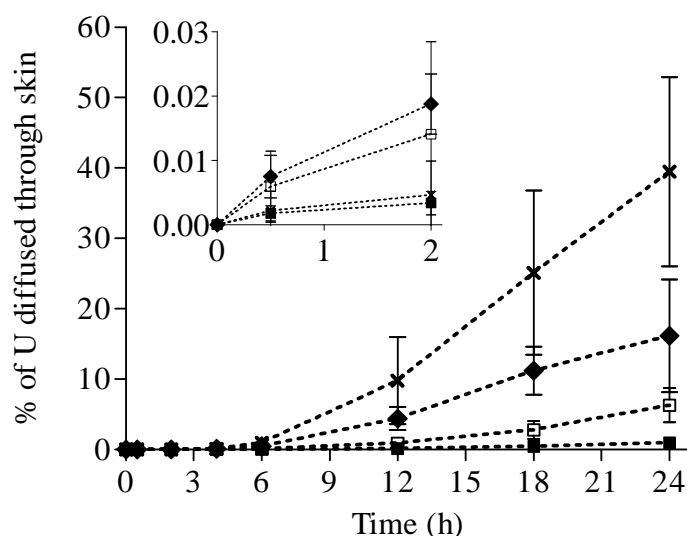


Figure 9: Uranium percutaneous diffusion kinetics through excoriated skin in absence of treatment (x) or after application of water (♦) or nanoemulsion without (□) or with 4 mg.g^{-1} calixarene (■). The treatment was applied immediately after the contamination step and the percentage of initially deposited uranium that diffused through excoriated skin biopsies was recorded during 24 hours. Each point corresponds to the mean of 10 assays \pm standard deviation.

After 24 hours of Franz cell diffusion experiments, SIMS images and mass spectra showed that no significant uranium accumulation was detected in the excoriated skin structures after the application of nanoemulsion without or with calixarene on contaminated excoriated skins. Uranium

traces were found to be retained in the areas where a few residual *stratum corneum* layers remained after the tape stripping step (Fig. 10). There was thus no significant difference between these observations and those made in the study of the uranium diffusion through excoriated skin in absence of treatment (Fig. 6 (B)).

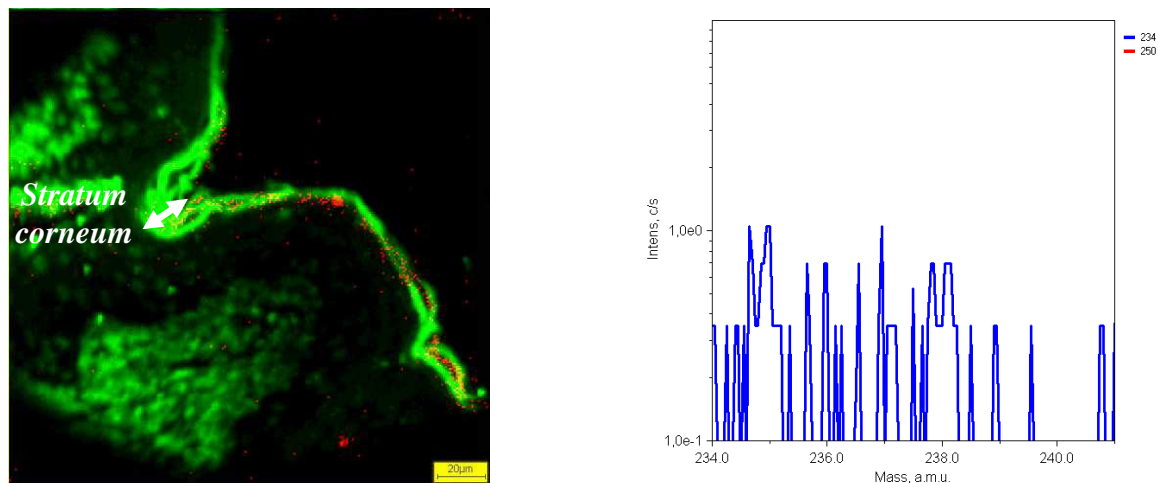


Figure 10: SIMS mass spectrum and ionic image of excoriated contaminated skin biopsy treated immediately after the contamination step (10 mg.l^{-1} uranyl solution) by nanoemulsion with 4 mg.g^{-1} calixarene. Biopsy was analysed by SIMS 24 hours after the beginning of Franz cell experiments. In the ionic image, $^{238}\text{U}^+$ image (red) was superposed to $^{23}\text{Na}^+$ (green) image ($200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ image field).

3.7. *Calixarene nanoemulsion efficiency on contaminated excoriated skin in case of delayed application*

The effect of time elapsed between the skin contamination by uranium and the application of the treatment on the uranium diffusion kinetics was studied by delaying the application of the calixarene nanoemulsion by 5, 15 and 30 minutes. As illustrated in figure 11, uranium diffusion kinetics was roughly the same when the calixarene nanoemulsion was applied 5, 15 or 30 minutes after the contamination step. In these three cases, the calixarene nanoemulsion allowed a 3-fold uranium steady state flux reduction ($26.53 \pm 6.64 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$) and a 3.5-fold uranium diffusion percentage decrease after 24 hours ($11.55 \pm 2.79\%$) as compared to the absence of treatment.

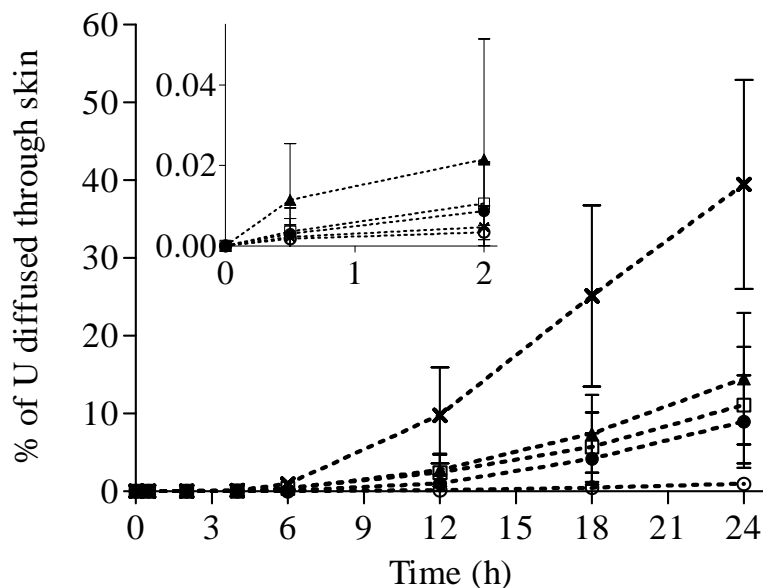


Figure 11: Uranium percutaneous diffusion kinetics through excoriated skin in absence of treatment (x) and after immediate (o) application or 5 minutes (●), 15 minutes (▲) and 30 minutes (□) delayed application of 4 mg.g^{-1} calixarene nanoemulsion. The percentage of initially deposited uranium that diffused through excoriated skin biopsies was recorded during 24 hours. Each point corresponds to the mean of 10 assays \pm standard deviation.

4. Discussion

The goal of the present work was to evaluate the ability of the calixarene nanoemulsion to trap uranium on intact and excoriated skin. For this purpose, pig ear skin was chosen as model in Franz diffusion cell experiments because it is known for being the most representative model of human percutaneous absorption (Jacobi *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2007; SCCNFP, 2003). The external face of pig ear skin explants was put in contact with carbonate-bicarbonate buffer as receptor fluid. This solution ensures sink conditions and high uranium solubility, which was not the case of physiological phosphate buffer in which uranium precipitation was observed during our preliminary uranium solubility studies. Moreover, the use of 0.025 M carbonate-bicarbonate buffer allowed us reproducing the blood medium in which uranium is strongly bound to carbonate ions once it passed through the skin and penetrates into the bloodstream (Chevari and Likhner, 1968; Durbin, 1984). The integrity of skin explants in contact with this receptor medium was checked during 24 hours by TEWL measurement before performing diffusion assays. The obtained TEWL values were in good agreement with the values recommended in the specifications of the used apparatus (Tewameter TM 300®, Monaderm®, Monaco) and in the literature (Nikolovski *et al.*, 2008). All Franz diffusion cell experiments were conducted under occlusive condition to prevent evaporation and

concentration phenomena of solutions deposited in the Franz cell donor compartment during the 24 hours percutaneous diffusion studies.

Our uranium diffusion kinetics studies through intact pig ear skin showed that a significant passage of uranyl occurred after 30 minutes, which is much faster than the 2 to 4 hours delay observed in other works performed on Franz diffusion cells using back rat skin, abdominal human skin and even pig ear skin explants (Petitot *et al.*, 2004; Tymen *et al.*, 2000). This lag time value is however coherent with those obtained in *in vivo* experiments performed on rats in which uranium was detected in the vascular dermis 30 minutes after the contamination step (Petitot *et al.*, 2007a; Petitot *et al.*, 2007b). Uranium diffusion observed in the present work through intact skin was still slow and low, which is in agreement with previous *in vivo* experiments carried out on intact rats back skin where uranium was not significantly detected in the blood during 24 hours and was detected in the kidneys only 6 hours after the contamination and in the urines after 24 hours (Petitot *et al.*, 2007a; Petitot *et al.*, 2007b). Indeed, the low uranium steady state flux value of $0.12 \text{ ng.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ determined in our experiment is similar to the value obtained by Petitot *et al.* (Petitot *et al.*, 2004), and only $0.07 \pm 0.03\%$ of the deposited uranium diffused through intact skin after 24 hours exposure. This low amount of uranium diffusing across intact pig ear skin is closer to the quantity passing through intact human skin in Franz diffusion cell experiments (Tymen *et al.*, 2000) than the value determined on back rat skin model which overestimates the uranium diffusion through intact skin (Petitot *et al.*, 2004; Tymen *et al.*, 2000). Pig ear skin thus seems to represent a better animal skin model for uranium percutaneous diffusion study than rat skin. SIMS images of intact skin explants and corresponding mass spectra determined 24 hours after contamination showed that uranium is mostly retained at the surface of the skin in the first most external *stratum corneum* layers. Uranium that is present in these layers can then be eliminated by natural skin desquamation (Reddy *et al.*, 2000). Intact skin thus appears to be an efficient barrier against the entry of uranium into the body.

As for the diffusion of uranyl through excoriated skin, the first significant amount of uranium was also detected in the receptor fluid of Franz diffusion 30 minutes after contamination. This lag time is similar to the value obtained on excoriated back rat skin and excoriated pig ear skin biopsies in other Franz diffusion cell experiments (Petitot *et al.*, 2004). During *in vivo* experiments carried out on excoriated back skin of rats, uranium was significantly detected in the vascular dermis 30 minutes after the contamination of wounds and only after 2 hours in the whole blood (Petitot *et al.*, 2007a). Nevertheless, uranium was significantly detected in the kidneys, and in urines 30 minutes after contamination, which indicates that its presence in the blood occurred earlier than 2 hours but its detection was not possible because of its very rapid extraction and filtration by the kidneys. The uranium diffusion kinetics determined in our study is thus likely to be similar to the one observed *in vivo*. Quantitatively, uranyl diffusion is 644-fold faster through excoriated skin than

through intact skin and the quantity of diffused uranium 24 hours after the contamination step is 530-fold higher in case of excoriation, which corresponds to a percutaneous passage of around 40 % of initially deposited uranium. Furthermore, no uranium accumulation was found in SIMS ionic images in the cutaneous structures of excoriated skin biopsies after 24 hours of uranium contamination. Excoriation, which represents a common and superficial wound, thus leads to a dramatic increase of percutaneous uranium diffusion flux and of the diffused uranium quantity as a function of time. These results obtained in Franz diffusion cell experiments and by SIMS analyses confirm the efficiency of the stratum corneum against the entry of uranium into the organism, which was previously observed in the studies of Petitot *et al.* (Petitot *et al.*, 2004). This wound model, which is easy to produce by tape stripping and reproducible, thus represents a suitable wound model for assessing the ability of local treatments for the decontamination of uranium contaminated injured skin. Moreover, the fact that uranium can pass through both intact and superficial wounded skin in less than 30 minutes emphasises the need to treat very rapidly the cutaneous contamination.

In case of cutaneous contamination by uranium, neither specific emergency treatment nor efficient decorporation treatment are available. Taking into account the fast diffusion of uranium through both intact and excoriated skin, we have designed a specific emergency treatment for contaminated intact and wounded skin and tested its decontamination ability using again pig ear skin explants.

Before the determination of the calixarene nanoemulsion potential in terms of cutaneous uranium decontamination, the percutaneous diffusion of the calixarene molecule through intact and excoriated skin explants was preliminary investigated. Calixarene nanoemulsion was then deposited on the biopsies and calixarene content in the fluid receptor was measured during 24 hours. It appeared that calixarene was not detected in the Franz diffusion cell receptor medium. Therefore, based on the detection limit of the HPLC method, less than 0.01 % of the deposited calixarene quantity could have passed through both intact and excoriated skins without being detected, which represents an almost negligible amount.

The skin decontamination potential of the calixarene nanoemulsion was first evaluated on contaminated intact skin and the diffusion of uranium was compared to the one obtained in absence of treatment. From the diffusion kinetics data and SIMS images, it appears that the unloaded nanoemulsion has no significant decontamination effect on intact skin. The application of the calixarene loaded nanoemulsion on intact skin immediately after the uranium contamination step allowed a $94.2 \pm 4.7\%$ reduction of the quantity of uranium that diffused through the skin at the end of the 24 hours Franz diffusion cell experiments and a 26-fold uranium steady state flux decrease. SIMS images and corresponding mass spectra revealed that there was no uranium retention in intact skin structures. By comparing these images to the ionic skin images obtained in absence of

treatment or after the application of the unloaded nanoemulsion, one can see that the treatment prevents the penetration of uranyl in the skin. According to these results obtained on intact skin and from our previous work that demonstrated *in vitro* the ability of the calixarene nanoemulsion to extract uranyl ions from a contaminated solution (Spagnul *et al.*, Submitted), we can conclude that the application of the calixarene nanoemulsion immediately after the cutaneous contamination step allows trapping and retaining the uranyl ions of an aqueous contaminated solution, which infers the uranium percutaneous transfer. Moreover, as SIMS images did not show any uranium accumulation after the contamination treatment by the calixarene nanoemulsion, it seems that the calixarene-uranium chelate does not significantly penetrate into intact skin structures. Thus, calixarene nanoemulsion constitutes an efficient treatment of skin contamination that acts at the skin surface. However, as intact skin can be considered itself as a sufficient barrier against the entry of uranium in the body, it is important to assess the efficiency of the calixarene nanoemulsion on a contaminated wound model.

The skin decontamination potential of the calixarene nanoemulsion was then evaluated on a superficial wound model consisting in excoriated skin. It was observed in a preliminary study that the unloaded nanoemulsion allowed a 6-fold uranium diffusion flux diminution and a reduction of $84.0 \pm 8.2\%$ of the quantity of uranium that diffused through excoriated skin after 24 hours of Franz diffusion cell experiments. This action of the unloaded nanoemulsion can be partly explained by the dilution effect of the contaminated solution due to the nanoemulsion aqueous phase. Indeed, the uranium diffusion flux obeys to the first Fick's law which stipulates that the diffusion kinetics at the steady state is proportional to the difference of uranium concentration between the epidermal and the dermal faces of the skin (Zatz, 1993). So, by diluting the uranium concentration deposited on the epidermal face of skin biopsies, the percutaneous diffusion flux of the radionuclide should be decreased. This dilution effect was demonstrated by depositing pure water instead of unloaded nanoemulsion on the contaminated skin. The water application allowed a 3.4-fold diminution of the uranium steady state diffusion flux and an approximated 2-fold reduction of the 24 hours diffused uranium percentage. Moreover, it was demonstrated in a previous report (Spagnul *et al.*, Submitted) that the unloaded nanoemulsion was able to extract around 20 % of uranium from a contaminated solution under the same conditions contributing to the reduction of the uranium diffusion flux. The fact that the unloaded nanoemulsion effect was not observed on intact skin biopsies may certainly be explained by the weak uranium diffusion and the high standard deviation observed in this case. SIMS images and corresponding mass spectra of excoriated skin biopsies 24 hours after the contamination step and the application of the unloaded nanoemulsion were not significantly different from the ones obtained in absence of contamination treatment. Uranium is thus not retained in excoriated skin structures after application of the calixarene non loaded nanoemulsion on contaminated skin. The application of the calixarene nanoemulsion immediately after the

contamination step induced a decrease of $97.5\pm 1.7\%$ of the quantity of uranium that diffused through excoriated skin after 24 hours of Franz diffusion cell experiments and allowed a 36-fold uranium diffusion flux diminution, which represents a 6-fold greater flux reduction than the one obtained by application of the unloaded nanoemulsion. SIMS analyses of excoriated skin biopsies at the end of the Franz diffusion cell experiment showed no uranium accumulation in the cutaneous tissues, as it was previously observed in absence of treatment of the skin contamination and after application of the unloaded nanoemulsion. From the results obtained in uranium diffusion assays and from SIMS images, we can conclude that the calixarene nanoemulsion quantitatively extracts and retains uranyl ions of an uranium contaminated solution deposited on wounded skin. Furthermore, the calixarene nanoemulsion seems to act at the surface of the skin as no significant penetration of the calixarene-uranyl chelate was observed into the skin. In addition, it was observed that the calixarene nanoemulsion is less efficient in case of delayed application but still allows a very significant uranium diffusion decrease as compared to the absence of treatment application. This reduction of efficiency being approximately the same whatever the delay of application (5 to 30 minutes), we assume that a part of the deposited uranium fastly penetrates in the upper excoriated skin structures, saturates them and then diffused passively through the skin to later reach the receptor medium. Experiments are in progress to better understand this phenomenon. From these results, it appears that it is preferable to treat the cutaneous contamination as soon as possible to ensure an optimal decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion.

5. Conclusion

In summary, our study demonstrates that the calixarene nanoemulsion allows decreasing almost quantitatively uranium percutaneous diffusion by trapping and retaining uranyl ions at the surface of the skin. This patented formulation (Bouvier-Capely *et al.*, 2008) thus constitutes a promising therapeutic approach for the local treatment of intact and wounded skin contaminated by transferable uranium compounds. For optimal efficiency, the treatment should be applied as fast as possible after the contamination. As the calixarene molecules used in this study also efficiently chelate other actinides, we planned to evaluate the calixarene nanoemulsion efficiency on skin contaminated by other actinides such as plutonium and americium and to perform *in vivo* studies.

Acknowledgements

Research funds were granted by the Délégation Générale pour l'Armement (DGA) and the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN).

References

ASN (2008) The French Nuclear Safety Authority, National Guide: Medical intervention in case of nuclear or radiological event http://www.asn.fr/sites/default/files/files/Interventions_medicales_evenement_nucleaire_ou_radiologique.pdf V3.6.

Baglan N, Cossonnet C, Trompier F, Ritt J, Bérard P (1999) Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Phys* 77:455-461.

Blanchin N, Desloires S, Grappin L, Guillermin AM, Lafon P, Miele A (2004) Protocols in an occupational medical facility for the management of internal plutonium exposure incidents in a nuclear plant: development – application – analysis – validation from 1996 to 2002. *Radioprotection* 39:59-75.

Bleise A, Danesi PR, Burkart W (2003) Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): A general overview. *Journal of Environmental Radioactivity* 64:93-112.

Boulet B, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Cote G (2006) Solvent extraction of U(VI) by calix[6]arenes. *Solvent Extraction and Ion Exchange* 24:319-330.

Bouvier-Capely C, Baglan N, Montegue A, Ritt J, Cossonnet C (2003) Validation of uranium determination in urine by ICP-MS. *Health Phys* 85:216-219.

Bouvier-Capely C, Fattal E, Phan G, Rebière F, Spagnul A (2008) Formulations pharmaceutiques de molécules de calix[6]arènes pour le traitement de contaminations cutanées par des actinides. FR-08/58703.

Bouvier-Capely C, Manoury A, Legrand A, Bonthonneau JP, Cuenot F, Rebière F (2009) The use of calix[6]arene molecules for actinides analysis in urine and drinking water: an alternative to current procedures. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry (to be published)*.

Bouvier-Capely C, Ritt J, Baglan N, Cossonnet C (2004) Potentialities of mass spectrometry (ICP-MS) for actinides determination in urine. *Applied Radiation and Isotopes* 60:629-633.

Castaing R, Slodzian G (1962) Microanalyse par émission ionique secondaire. *Journal de Microscopie* 1:395-410.

Chevani S, Likhner D (1968) Complex formation of natural uranium in blood. *Kompleksoobrazovanie estestvennogo urana v krovi* 13:53-57.

De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL (1983) Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environmental Research* 30:480-491.

Durbin PW. Metabolic model for uranium. Washington, 1984.

Durbin PW (2008) Lauriston S. Taylor Lecture: the quest for therapeutic actinide chelators. *Health Phys* 95:465-492.

Durbin PW, Kullgren B, Xu J, Raymond KN (1998) Development of decorporation agents for the actinides. *Radiation Protection Dosimetry* 79:433-443.

Houpert P, Chazel V, Paquet F (2004) A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 82:73-78.

Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, *et al.* (2007) Porcine ear skin: An in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology* 13:19-24.

Kathren RL, Burklin RK (2008a) Acute chemical toxicity of uranium. *Health Phys* 94:170-179.

Kathren RL, Burklin RK (2008b) Proposed standards for acute exposure to low enrichment uranium for compliance with 10 CFR 70.61. *The Radiation Safety Journal* 95:122-127.

Lopez R, Diaz Sylvester PL, Ubios AM, Cabrini RL (2000) Percutaneous toxicity of uranyl nitrate: its effect in terms of exposure area and time. *Health Phys* 78:434-437.

Meyer W, Kacza J, Zschemisch NH, Godynicki S, Seeger J (2007) Observations on the actual structural conditions in the stratum superficiale dermidis of porcine ear skin, with special reference to its use as model for human skin. *Annals of Anatomy* 189:143-156.

Miller AC, Beltran D, Rivas R, Stewart M, Merlot RJ, Lison PB (2005) Radiation and depleted uranium-induced carcinogenesis studies: characterisation of the carcinogenic process and development of medical countermeasures. *NATO Human Factor Medicine Panel Research Task Group 099 "Radiation Bioeffects and Countermeasures" meeting.*

Muller D, Houpert P, Hengé-Napoli MH, Métivier H, Paquet F (2006) Potential synergy between two renal toxicants: DTPA and uranium *Radioprotection* 41:413-420.

Nikolovski J, Stamatias GN, Kollias N, Wiegand BC (2008) Barrier function and water-holding and transport properties of infant stratum corneum are different from adult and continue to develop through the first year of life. *Journal of Investigative Dermatology* 128:1728-1736.

OECD (2004) Guideline for the Testing of Chemicals. Draft Guideline 428: Skin absorption: *in vitro* method.

Pavlakakis N, Pollock CA, McLean G, Bartrop R (1996) Deliberate overdose of uranium: Toxicity and treatment. *Nephron* 72:313-317.

Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, Tournalias E, *et al.* (2007a) Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health Phys* 92:464-474.

Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F (2007b) Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiation protection dosimetry* 127:125-130.

Petitot F, Moreels AM, Paquet F (2004) In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol* 82:133-139.

Reddy MB, Guy RH, Bunge AL (2000) Does epidermal turnover reduce percutaneous penetration? *Pharmaceutical Research* 17:1414-1419.

Rojas-Palma C, Liland A, Naess Jerstad A, Etherington G, Del Rosario Pérez M, Rahola T, *et al.* (2009) TMT Handbook - Triage, Monitoring and Treatment of people exposed to ionising radiation following a malevolent act

SCCNFP *The Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients*, 2003.

Spagnul A, Bouvier-Capely C, Adam M, Phan G, Rebière F, Fattal E (Submitted) Quick and efficient extraction of uranium from a contaminated solution by a calixarene nanoemulsion. *Radiation Research*.

Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E (In Press) Calixarene-entrapped nanoemulsion for uranium extraction from contaminated solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* DOI 10.1002/jps.21932.

Tessier C, Suhard D, Simon O, Floriani M, Rebière F, Jourdain JR (2009) Detection and analysis of the microdistribution of uranium in the gills of freshwater *Corbicula fluminea* by SIMS technique. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 267:1931-1935.

Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D (2000) Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol* 76:1417-1424.

Xu K, Ge W, Liang G, Wang L, Yang Z, Wang Q, *et al.* (2008) Bisphosphonate-containing supramolecular hydrogels for topical decorporation of uranium-contaminated wounds in mice. *International Journal of Radiation Biology* 84:353-362.

Yang F, Guo H, Cai X, Chen X (2005) Syntheses and adsorption properties of novel calixarene polymers: Calix[6]-1,4-crown-4-based netty polymers. *Reactive and Functional Polymers* 64:163-168.

Zatz J *Skin permeation - Fundamentals and application*. Allured publishing corporation, 1993.

CHAPITRE IV

Valorisation des travaux de thèse

L'ensemble des travaux menés au cours de cette thèse a fait l'objet de deux principales valorisations qui vont être présentées dans ce quatrième chapitre.

Les résultats obtenus dans ces travaux de thèse ont été présentés lors du 10^{ème} congrès international HEIR (Health Effects of Incorporated Radionuclides, Santa Fe, Nouveau-Mexique, Etats-Unis) à la suite duquel ils ont donné lieu à une publication dans un journal scientifique reconnu dans le secteur nucléaire (Health Physics). Cet article décrit la nanoémulsion de calixarène (chapitre I) et résume les principaux résultats obtenus *in vitro* (chapitre II) et *ex vivo* sur la peau (chapitre III) concernant l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion.

Une demande de dépôt de brevet assurant la protection de la formulation innovante mise au point au cours de ce travail de thèse, c'est-à-dire la nanoémulsion de calixarène, a été déposée le 17 décembre 2008 sous l'intitulé « ***Formulations pharmaceutiques de molécules de calix[6]arènes pour le traitement de contaminations cutanées par des actinides*** » (FR-08/58703). Le brevet ne pouvant être publié que 18 mois après la date de son dépôt, il ne sera pas présenté dans ce manuscrit de thèse.

**A new formulation containing calixarene molecules as an emergency
treatment of uranium skin contamination**

Health Physics, soumis

Aurélie Spagnol^{*†}, Céline Bouvier-Capely^{*}, Guillaume Phan^{*}, François Rebière^{*}, Elias Fattal[†]

^{*} IRSN, Radiochemistry Laboratory, DRPH/SDI, BP 17 F-92262 Fontenay-aux-Roses, France

[†] Laboratoire de Physico-chimie Pharmacotechnie et Biopharmacie, Faculté de Pharmacie, F-92296, UMR CNRS 8612, Châtenay-Malabry, France.

Keywords: Calixarene; Decontamination; Skin; Uranium

Abstract

Cutaneous contamination represents the second contamination way in the nuclear industry. Despite that the entry of actinides such as uranium into the body through intact or wounded skin can induce a high internal exposure, no specific emergency treatment for cutaneous contamination exists. In the present work, an innovative formulation dedicated to uranium skin decontamination was developed. The galenic form consists in an oil in water nanoemulsion which contains a tricarboxylic calixarene known for its high uranium affinity and selectivity. The physicochemical characterization of this topical form revealed that calixarene molecules are located at the surface of the dispersed oil droplets of the nanoemulsion, being thus potentially available for uranium chelation. It was demonstrated in preliminary *in vitro* experiments by using an adapted ultrafiltration method that the calixarene nanoemulsion was able to extract and retain more than 80% of uranium from an aqueous uranyl nitrate contamination solution. First *ex vivo* experiments carried out in Franz diffusion cells on pig ear skin explants during 24 hours showed that the immediate application of the calixarene nanoemulsion on a skin contaminated by an uranyl nitrate solution allowed an uranium transcutaneous diffusion decrease of about 98% through intact and excoriated skins. The calixarene nanoemulsion developed in this study thus seems to be an efficient emergency system for uranium skin decontamination.

INTRODUCTION

Internal contamination of power plants workers by actinides may occur by inhalation, ingestion or penetration through wounds or intact skin. Although the most current contamination pathway is inhalation (Gerber and Thomas 1992), the contamination through intact or wounded skins is still a big concern, since it may induce a high internal exposure of contaminated individuals after translocation of the radionuclides from the contamination site into the body (De Rey et al. 1983, Lopez et al. 2000, Petitot et al. 2004, Petitot, Frelon et al. 2007, Petitot, Gautier et al. 2007). The current medical care in case of skin contamination only occurs after transfer of the victim to the medical unit of the nuclear site and it only consists in local decontamination of the wound by rinsing with soaped water or a 25% calcic salt of diethylene triamine pentaacetic acid (Ca-DTPA) solution. This procedure is often followed by a decorporation treatment with intravenous injection of 1 g of Ca-DTPA in 4 mL (ASN 2008) to reduce the risks of tissue damage and induction of cancer. A surgical excision of the contaminated tissues can be needed in order to remove residual radionuclides and prevent their penetration into the body (Gerber and Thomas 1992, Bailey et al. 2003). Nevertheless, Ca-DTPA exhibiting a lack of selectivity and affinity for uranium in biological medium, these procedures are ineffective in case of uranium contamination that may induce strong kidney toxicity (Lopez et al. 2000, Métivier 2001). Some chelating agents more specific to uranium have been developed in order to decorporate uranium from the body (Durbin 2008). Except the biphosphonate molecule series (Houpert et al. 2004, Yang, et al. 2005, Xu et al. 2008), none of those chelating agents have been used in pharmaceutical forms dedicated to skin decontamination. In addition, the specific uranium chelation by the biphosphonate molecules within the proposed formulations has not been demonstrated.

In this context, we have developed a new topical pharmaceutical form dedicated to emergency treatment of uranium skin contamination. We have taken advantage of the particular chelation properties of a calixarene molecule (Fig. 1) developed in our laboratory for radiotoxicological analyses purpose. The selectivity, affinity and extraction efficiency of uranium present in trace in biological media by this calixarene have been successfully shown in previous works (Boulet et al. 2006). The objective of the present study is to integrate these calixarene molecules in a topical form for skin decontamination. We have thus developed an oil in water (O/W) nanoemulsion displaying calixarene molecules at the interface between the oily and external aqueous phase. The physicochemical properties of this nanoemulsion have been characterized and its efficiency for uranium extraction has been evaluated *in vitro* by using an adapted ultrafiltration method and *ex vivo* with first experiments on intact and excoriated pig ear skin explants in Franz diffusion cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Calixarene molecule (Fig. 1) was synthesized as described in the patent (Duval et al.). Other compounds used for preparing calixarene nanoemulsions were paraffin oil ($d = 0.86$), (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), non ionic surfactants sorbitan monooleate (Span® 80) and polyoxyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween® 80), purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) and water obtained from a Milli-Q® Synergy 185 water purification system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Uranium-contaminated solutions were prepared by diluting a standard depleted uranium solution ($1,000 \text{ mg L}^{-1}$ in 2% HNO_3 , SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France). The pH of the contaminated solutions was adjusted to 5 with 0.01 M acetate buffer. A bismuth (^{209}Bi) stock standard solution at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (from a 10 mg L^{-1} single element standard, SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France) and a multielemental standard solution containing depleted uranium at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (from a 10 mg L^{-1} tuning solution SPEX Certiprep, Horiba Jobin Yvon, Longjumeaux, France) were prepared in 2% HNO_3 (from a 67% HNO_3 stock solution, Normatom, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) for Inductively Coupled Mass Spectrometry (ICP-MS) measurements. All reagents were used as received without any further purification.

Pig ears used in Franz cell diffusion experiments were purchased from Guy Harang abattoir (France) with the authorization of the French Departmental Directorate of Veterinary Services of Hauts-de-Seine. Pig ears were stored at -20°C until use.

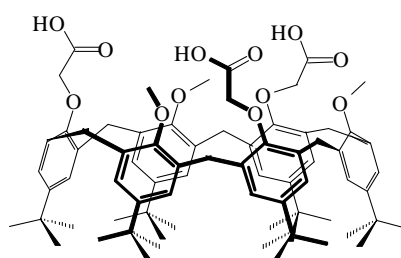


Figure 1: Structure of 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arene

Methods

Preparation and characterization of calixarene nanoemulsions

Oil in water calixarene nanoemulsions were prepared by the emulsion inversion point method as previously described (Spagnul et al.). The amounts of surfactants, oil and water were respectively 5%, 20% and 75% (w/w). The dispersed oil droplet size and zeta potential were both measured with a Nanosizer/Zetasizer® ZS apparatus (Malvern Instruments, Worcestershire, U.K.), and pH measurements were carried out with a MeterLab/pH M240 pH-meter (Radiometer Copenhagen, Denmark). These parameters were determined as a function of the calixarene concentration in the nanoemulsion.

In vitro calixarene nanoemulsion efficiency study

Equal volumes of uranium-contaminated solution ($40 \mu\text{g L}^{-1}$, pH 5) and calixarene loaded nanoemulsion (2 mg g^{-1}) were mixed and the mixture was kept under static condition during definite times. Aliquots of the mixture were put into Microcon® centrifugal filter devices (3,000 Da, Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) and centrifuged at 6,000 rpm for 30 minutes at 20°C . The uranium extraction by the calixarene nanoemulsion was determined by quantifying free uranium present in the aqueous filtrate phase recovered by ultrafiltration-ultracentrifugation of the mixture using Inductively Coupled Mass Spectrometry (ICP-MS) technique (Spagnul et al.).

Ex vivo calixarene nanoemulsion efficiency study on pig ear skin explants

The diffusion kinetics of uranium through intact and wounded skins was studied after application or no application of the calixarene nanoemulsion treatment in Franz diffusion cell assays using MicroettePlus™ apparatus (Hanson Research Corp., Chatsworth, California, USA). Full thickness skin pieces were removed from pig ears and wound was generated by removing the *stratum corneum* of the skin by tape stripping using 60 standard D-Squame® discs (Monaderme®, Monaco) pressed onto the skin using a D-Squame® applicator that provides a constant 150 g cm^{-2} pressure (Monaderme®, Monaco). Each skin sample was put on receptor compartment of the diffusion cell, its dermal face in contact with a 0.025 M carbonate buffer receptor medium (Sigma-Aldrich Saint-Quentin-Fallavier, France), covered with the donor compartment and the whole device was fixed with a clamp. The contamination was made by depositing $600 \mu\text{L}$ of a 10 mg L^{-1} uranyl nitrate solution at pH 5 on the skin sample in the donor compartment of the Franz diffusion cell. Skin decontamination was evaluated by depositing $600 \mu\text{L}$ of 4 mg g^{-1} calixarene nanoemulsion in the donor compartment immediately after the skin contamination. 24 hours later, uranium diffusion was then evaluated by uranium quantification in the receptor fluid. The Receptor medium was kept

under stirring and at the constant temperature of $(33.5 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ during the experiment. All experiments were conducted under occlusive conditions.

ICP-MS uranium analysis

Quantification of ^{238}U content in the aqueous samples was made by ICP-MS measurements using optimized protocols originally designed for human urine samples: aliquots were properly diluted in 2% HNO_3 and ^{209}Bi was added as internal standard at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Baglan et al. 1999, Bouvier-Capely et al. 2003, Bouvier-Capely et al. 2004). As diluted solutions were prepared by weighing, the related uncertainties can be neglected compared to the statistical ones. The combination of the statistical errors was made using the conventional law of uncertainty propagation. The ICP-MS signal was optimized at mass 238 before each measurement series.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the calixarene nanoemulsion

A previous study on the physicochemical characterization of the calixarene nanoemulsion showed that the oil droplet size is nearly 175 nm and decreases significantly ($p < 0.05$) to 150 nm from a calixarene concentration in the nanoemulsion of 2 mg g^{-1} (Spagnul et al.). Tension measurements at the oil/water interface showed that calixarene molecules have tensioactive properties which can explain the droplet size diminution after the calixarene molecules addition in the nanoemulsion.

The zeta potential measurement of the dispersed oily droplets showed that increasing calixarene concentration in the nanoemulsion leads to a zeta potential decrease from -13 mV to -50 mV until a 4 mg g^{-1} calixarene concentration at which the zeta potential value did not change significantly from its -50 mV minimal value (Spagnul et al.). This zeta potential decrease due to the emergence of negative charges at the surface of the oily droplets can be explained by the presence of calixarene molecules at the oil droplets surface. Indeed, the carboxylic functions of calixarene molecules may be partially deprotonated at the nanoemulsion aqueous phase pH which is about of 4.5 (Boulet 2006).

These results tend to demonstrate that calixarene molecules are at the surface of the oil droplets under ionised form. Calixarene molecules are thus potentially available to extract uranyl ions from an aqueous uranium contaminated solution.

In vitro evaluation of uranium extraction by the calixarene nanoemulsion

The decontamination potential of the calixarene nanoemulsion was first evaluated by keeping under static contact a mixture of equal volumes of 2 mg g⁻¹ calixarene loaded nanoemulsion with a 40 µg L⁻¹ nitrate uranyl solution at pH 5, ensuring a 10,000-fold calixarene molar excess. The extraction ability of the calixarene nanoemulsion was compared to that of a solution of calixarene in paraffin oil in the same conditions of calixarene excess (molar ratio calixarene/uranium = 10,000). The results presented in Table 1 indicate that the calixarene nanoemulsion is able to extract (83.4 ± 0.6)% of uranium of the contamination solution after only 5 minutes of contact (total contact time of 35 minutes after ultrafiltration) and the optimum of uranium extraction is quickly achieved. The presence of calixarene in the nanoemulsion is itself largely responsible for the extraction ability as the nanoemulsion without calixarene extracts only about 20% of uranium at equilibrium. The use of a more simple galenic form consisting in a solution of calixarene in paraffin oil only allows the extraction of ~7% of uranium from the contaminated solution. This last result shows that the emulsified system ensures a high uranium extraction yield due to the larger oil/water interfacial contact. The calixarene nanoemulsion form seems thus to be well suited for the decontamination of an aqueous solution contaminated by uranium.

Table 1: Uranium extraction (%) by paraffin oil and nanoemulsion in presence or not of calixarene, as a function of contact time between uranium solution and nanoemulsion or paraffin oil, in static conditions.

Contact time	U extraction (%)		
	Calixarene loaded Nanoemulsion	Non loaded Nanoemulsion	Calixarene in paraffin oil
5 min	83.4 ± 0.6	23.2 ± 0.8	/
1 hour	87.4 ± 0.7	16.7 ± 4.9	7.0 ± 0.9
4 hours	80.0 ± 3.9	25.3 ± 8.8	8.3 ± 0.3

Ex vivo evaluation of the skin decontamination efficiency of the calixarene nanoemulsion

From the good uranium extraction yields obtained by the calixarene nanoemulsion in the previous *in vitro* tests, the calixarene nanoemulsion extraction efficiency for skin decontamination was evaluated. A 4 mg g⁻¹ calixarene loaded nanoemulsion was deposited in the donor compartment of the Franz diffusion cells on pig ear skin explants immediately after a contamination with a 10 mg L⁻¹ uranyl nitrate solution. A concentration of 4 mg g⁻¹ of calixarene in the nanoemulsion was chosen in order to allow an excess of calixarene molecules compared to uranium ions (molar ratio calixarene/uranium = 80) and ensure a good uranium extraction. The uranium diffusion through the skin was followed during 24 hours under occlusive conditions and as a function of the application or no application of the calixarene nanoemulsion immediately after the contamination. The results obtained on intact skin 24 hours after the contamination are presented in Fig. 2. Intact skin seems to be a good barrier against uranium penetration as only 0.026 ± 0.006 % of the deposited uranium diffused through the skin 24 hours after the contamination.

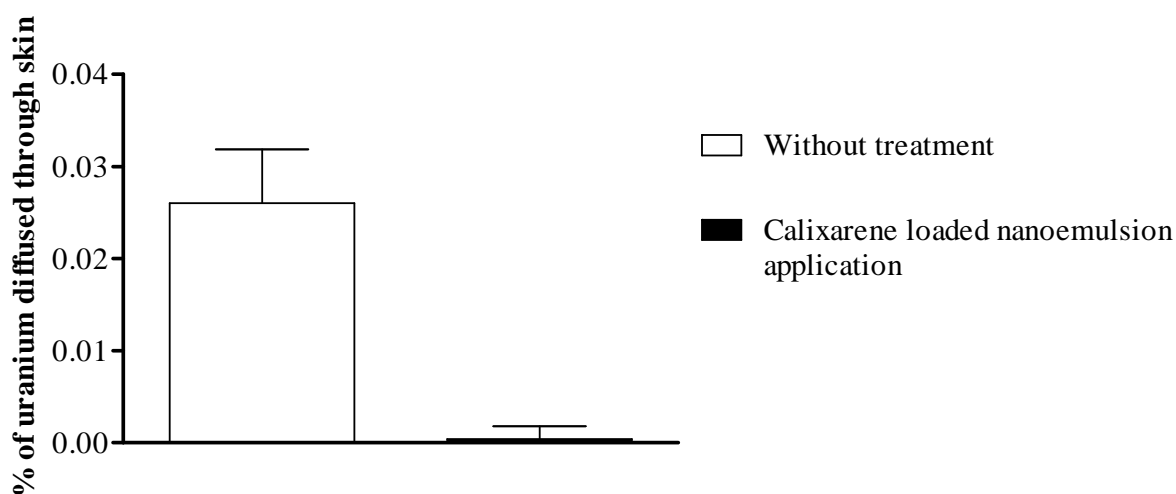


Figure 2: Percentage of uranium diffused through intact skin and recovered in the receptor medium of the Franz diffusion cells 24 hours after the contamination of intact pig ear skin explants in function of the application or no application of calixarene nanoemulsion (n = 4).

The application of the calixarene nanoemulsion immediately after the contamination allowed an uranium diffusion decrease of (98.4 ± 5.3)%. In the case of wounded contaminated skin (Fig. 3), (44.3 ± 6.4)% of the deposited uranium diffused through the skin, which is significantly higher than what was observed for intact skin. The prompt application of the calixarene nanoemulsion treatment conducted to an uranium diffusion decrease of (97.7 ± 0.8)% after 24 hours. The calixarene nanoemulsion is thus still efficient in case of contaminated wounds.

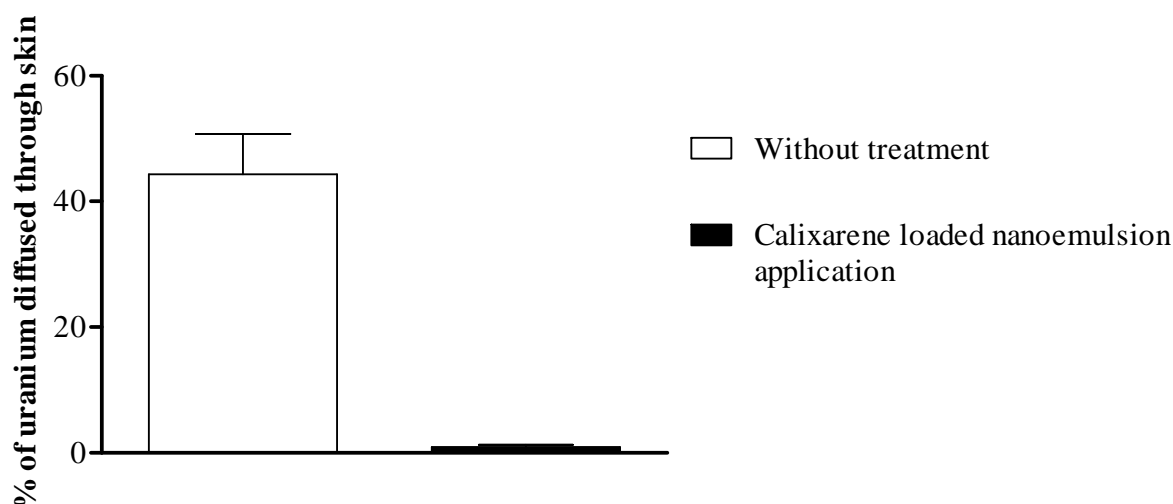


Figure 3: Percentage of uranium diffused through excoriated skin and recovered in the receptor medium of the Franz diffusion cells 24 hours after the contamination of excoriated pig ear skin explants in function of the application or no application of calixarene nanoemulsion (n = 8).

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

In this work, a new topical form dedicated to the emergency treatment of uranium skin contamination consisting in an oil in water nanoemulsion containing tricarboxylic calix[6]arene molecules as uranium chelating agent was developed. The physicochemical characterization of this form showed the presence of calixarene molecules potentially available for uranium chelation at the surface of the dispersed oil droplets. It has been established by the mean of an adapted ultrafiltration method that this calixarene organisation within the nanoemulsion allows the extraction and the retention of more than 80% of the uranium contained in an aqueous contaminated solution. The evaluation of the uranium skin decontamination potential of the calixarene nanoemulsion on intact and excoriated pig ear skin explants using Franz diffusion cells demonstrated that the calixarene nanoemulsion allows decreasing the uranium diffusion through both intact and excoriated skins of about 98%. The calixarene nanoemulsion thus appears to be a very promising system for uranium skin decontamination.

Further *in vitro* experiments are carried out in order to determine the calixarene nanoemulsion efficiency as a function of various parameters such as contamination solution pH and calixarene/uranium molar ratio.

Other percutaneous skin diffusion experiments on intact and excoriated skins are in progress in order to study the kinetics of uranium diffusion after the application of calixarene nanoemulsion and to determine the influence of the calixarene nanoemulsion application delay on the calixarene

nanoemulsion efficiency. The calixarene nanoemulsion decontamination ability will also be evaluated by carrying out *in vivo* experiments on rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research funds were granted by the Délégation Générale pour l'Armement (DGA) and the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN).

REFERENCES

- ASN. Guide national : Intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. V3.6; 2008.
- Baglan N, Cossonnet C, Trompier F, Ritt J, Berard P. Implementation of ICP-MS protocols for uranium urinary measurements in worker monitoring. *Health Physics* 77: 455-461; 1999.
- Bailey BR, Eckerman KF, Townsend LW. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. *Radiat Prot Dosimetry* 105: 509-512; 2003.
- Boulet B. Extraction sélective des actinides par les calixarènes. Application à l'analyse radiotoxicologique. In: Université Paris VI; 2006.
- Boulet B, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Cote G. Solvent extraction of U(VI) by calix[6]arenes. *Solvent Extraction and Ion Exchange* 24: 319-330; 2006.
- Bouvier-Capely C, Baglan N, Montegue A, Ritt J, Cossonnet C. Validation of uranium determination in urine by ICP-MS. *Health Phys* 85: 216-9; 2003.
- Bouvier-Capely C, Ritt J, Baglan N, Cossonnet C. Potentialities of mass spectrometry (ICP-MS) for actinides determination in urine. *Applied Radiation and Isotopes* 60: 629-633; 2004.
- De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environmental Research* 30: 480-491; 1983.
- Durbin PW, Lauriston S. Taylor Lecture: the quest for therapeutic actinide chelators. *Health physics* 95: 465-492; 2008.
- Duval R, Cossonnet C, Bouvier-Capely C, Le Strat C, Boulet B, Chelator. Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, French Patent, FR 2006 / 001105; 2006.
- Gerber GB, Thomas RG. Internal radionuclide contamination guidebook. *Radiation Protection Dosimetry* 41: 1-49; 1992.
- Houpert P, Chazel V, Paquet F. A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 73-8; 2004.
- Lopez R, Diaz Sylvester PL, Ubios AM, Cabrini RL. Percutaneous toxicity of uranyl nitrate: its effect in terms of exposure area and time. *Health Phys* 78: 434-7; 2000.
- Métivier H. L'uranium de l'environnement à l'Homme. Les Ulis: EDP Sciences; 2001.
- Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, Tournalonias E, Dhieux B, Maubert C, Paquet F. Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health Physics* 92: 464-474; 2007.
- Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiation protection dosimetry* 127: 125-130; 2007.

Petitot F, Moreels AM, Paquet F. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 133-9; 2004.

Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Rebière F, Fattal E. Design of a calixarene-entrapped nanoemulsion for the extraction of uranium in biological media. Submitted to *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Xu K, Ge W, Liang G, Wang L, Yang Z, Wang Q, Hsing IM, Xu B. Bisphosphonate-containing supramolecular hydrogels for topical decorporation of uranium-contaminated wounds in mice. *International Journal of Radiation Biology* 84: 353-362; 2008.

Yang Z, Xu K, Wang L, Gu H, Wei H, Zhang M, Xu B. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. *Chemical Communications*: 4414-4416; 2005.

Formulations pharmaceutiques de molécules de calix[6]arènes pour le traitement de contaminations cutanées par des actinides

Demande de dépôt de brevet
déposée le 17 décembre 2008
sous la référence FR-08/58703

Céline Bouvier-Capely¹, Elias Fattal², Guillaume Phan¹, François Rebière¹, Aurélie Spagnol^{1,2}

¹ IRSN, Radiochemistry Laboratory, DRPH/SDI, BP 17 F-92262 Fontenay-aux-Roses, France

² Laboratoire de Physico-chimie Pharmacotechnie et Biopharmacie, Faculté de Pharmacie, F-92296, UMR CNRS 8612, Châtenay-Malabry, France.

DISCUSSION GENERALE

Nous avons développé au cours de ce travail de thèse une forme pharmaceutique destinée à l'application cutanée permettant de limiter le passage de l'uranium à travers la peau intacte et à travers un modèle de peau lésée. En effet, nous avons étudié l'effet du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène, agent chélatant de la famille des calixarènes connu pour sa forte affinité envers les ions uranyle, sur le passage percutané de l'uranium. Afin de rendre disponible cette molécule hydrophobe pour la chélation de l'uranium et dans l'objectif d'assurer une action localisée à la surface de la peau, le calixarène a été formulé à l'aide d'un système émulsionné de type huile dans eau et, plus précisément, sous forme de nanoémulsion.

Ainsi, le premier objectif de ce travail de thèse a consisté à concevoir la nanoémulsion, forme pharmaceutique adaptée à l'usage cutané capable de véhiculer le calixarène tricarboxylique d'intérêt et de le rendre disponible à la chélation de l'uranium. Le deuxième objectif a été d'évaluer *in vitro* la capacité de la nanoémulsion de calixarène à extraire l'uranium depuis une solution contaminée. Enfin, le troisième objectif a consisté à évaluer *ex vivo*, sur des explants de peau d'oreille de porc montés en cellule de Franz, la capacité de cette forme à décontaminer la peau intacte ou lésée contaminée par une solution d'uranium.

Au cours de cette discussion générale :

- Nous nous pencherons sur la pertinence du choix de la forme galénique développée pour véhiculer le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène en vue de traiter dans l'urgence les contaminations cutanées par l'uranium,
- Nous évaluerons l'intérêt de la nanoémulsion de calixarène pour le traitement des contaminations cutanées par l'uranium. Nous discuterons alors des résultats obtenus en termes d'efficacité de décontamination lors des études menées au cours de cette thèse et nous les comparerons avec ceux obtenus pour des formes galéniques développées par d'autres équipes de recherche.

I. Intérêt de la nanoémulsion de calixarène développée pour le traitement de la contamination cutanée par l'uranium

Cette première partie de la discussion s'applique tout d'abord à justifier la stratégie que nous avons choisie de mettre en œuvre au cours de ces travaux de thèse dans le cadre de la prise en charge des victimes contaminées par voie cutanée par de l'uranium dans l'industrie nucléaire. Nous discuterons ensuite de l'intérêt de la forme galénique que nous avons développée pour le traitement de ce type de contamination.

I.1. Intérêt de la voie d'administration cutanée

Deux stratégies peuvent être mises en œuvre pour traiter la contamination cutanée par l'uranium. La première stratégie est la décontamination cutanée. Elle a pour but d'éliminer l'uranium de la zone cutanée contaminée et donc de limiter son entrée dans l'organisme. La seconde stratégie est la décorporation qui consiste à administrer par voie intraveineuse des agents chélatants et dont l'objectif est d'accélérer l'excrétion par la voie urinaire du radioélément ayant pénétré dans l'organisme. Dans la pratique, le traitement de décontamination peut être appliqué en urgence sur le lieu de la contamination alors que le traitement décorporant est quant à lui administré après transfert de la victime au service médical du site nucléaire.

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons choisi de développer la première stratégie en mettant au point un traitement de décontamination cutanée. En effet, face à la faible efficacité des traitements de décorporation de l'uranium actuellement employés (Paquet *et al.* 1998), qui consistent en des injections intraveineuses uniques ou répétées d'acide diéthylène-triamine-pentaacétique (DTPA) (Blanchin *et al.* 2004) ou de bicarbonate de sodium (ASN 2008), nous proposons avec ce sujet de thèse de développer une forme pharmaceutique dont l'application dans l'urgence, en substitut ou en complément de l'étape de rinçage de la zone cutanée contaminée, permet de limiter l'entrée de l'uranium dans l'organisme. Avec ce type de prise en charge, nous espérons également alléger le traitement de décorporation qui peut lui-même présenter des effets toxiques. En effet, l'administration par voie intraveineuse de DTPA, qui est parfois systématique en cas de suspicion de contamination par voie cutanée (Blanchin *et al.* 2004), peut potentialiser les effets néphrotoxiques de l'uranium (Muller *et al.* 2006) et peut conduire à l'apparition de carences en oligo-éléments tels que le zinc, le magnésium et le manganèse, dues à la chélation aspécifique du DTPA (Grappin *et al.* 2007). De plus, étant donné la toxicité potentielle des calixarènes aux niveaux hépatique et sanguin (Archimbaud *et al.* 1994, Da Silva *et al.* 2004), il nous a paru plus adapté de mettre à profit les propriétés chélatantes du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arène

vis-à-vis de l'uranium pour un traitement de décontamination cutanée plutôt que pour un traitement décorporant.

Enfin, la mise à la disposition des salariés de l'industrie nucléaire susceptibles d'être exposés à un risque de contamination par voie cutanée par l'uranium d'un traitement de décontamination cutanée peut avoir un impact psychologique non négligeable. En effet, ceci permettrait de rassurer les victimes contaminées et ainsi de faciliter leur prise en charge au niveau du service médical.

I.2. Intérêt de la formulation émulsionnée du calixarène tricarboxylique

Le principe actif que nous avons choisi de formuler pour le développement d'un traitement de la contamination cutanée par l'uranium est un calixarène tricarboxylique, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène. Cette molécule, issue de dix années de recherche, a initialement été développée par le Laboratoire de RadioChimie (LRC) de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) pour extraire quantitativement et sélectivement les ions uranyle du milieu urinaire vers une phase organique, en vue d'améliorer l'analyse radiotoxicologique des urines dans le cadre de la surveillance des travailleurs de l'industrie nucléaire soumis à des risques de contamination interne (Dinse 1999, Boulet 2006). La capacité de ce calixarène à chélater l'uranium, l'extraire depuis une solution aqueuse contaminée et le retenir en phase organique en fait un candidat idéal pour traiter une zone cutanée contaminée par une solution d'uranium. Ce calixarène se présentant sous forme de poudre insoluble dans l'eau, il a été nécessaire de développer une forme galénique capable de véhiculer ce principe actif à la surface de la peau.

Le choix du véhicule du calixarène a été effectué en tenant compte d'un certain nombre de contraintes. En premier lieu, les modifications structurales de la molécule qui auraient permis de réaliser des greffages ou des polymérisations n'ont pas été envisagées dans le cadre de cette étude en raison des faibles rendements de synthèse obtenus (Souane 2005). De plus, la forme doit non seulement véhiculer le calixarène mais également le rendre disponible pour la chélation de l'uranium présent dans une solution aqueuse contaminée. Enfin, la formulation doit être choisie de façon à être applicable sur la peau et à assurer une action de surface.

Ayant constaté la tendance du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène à se placer à l'interface d'un système biphasique huile de paraffine-phase aqueuse (chapitre I) et prenant en compte les contraintes de formulation énoncées ci-dessus, nous avons décidé de formuler le calixarène dans un système émulsionné de type huile dans eau. Les excipients de la formulation, c'est-à-dire les tensioactifs non ioniques et l'huile de paraffine, ont été choisis pour leur bonne tolérance cutanée et leur faible pouvoir pénétrant (Rowe *et al.* 2003, Martini 2006). Le choix de la

phase huileuse fut crucial car des travaux préliminaires menés en extraction liquide-liquide ont indiqué que la présence ou non de calixarène à l'interface phase aqueuse/phase organique dépend de la phase organique le véhiculant (Boulet 2006). Le système émulsionné que nous avons conçu dans ces travaux de thèse est un système particulier nommé nanoémulsion qui consiste en une fine dispersion de gouttelettes huileuses véhiculant le calixarène (diamètre moyen de 150 nm) dans une phase aqueuse continue et qui permet de développer une grande surface de contact entre ces deux phases. Les études de caractérisation physico-chimique de la nanoémulsion de calixarène présentées dans le chapitre I (mesure de la taille des gouttelettes huileuses, du pH de la phase aqueuse et du potentiel zêta en fonction de la quantité de calixarène incorporée dans la nanoémulsion) ont confirmé la présence de calixarène à la surface des gouttelettes huileuses dispersées (figure 1).

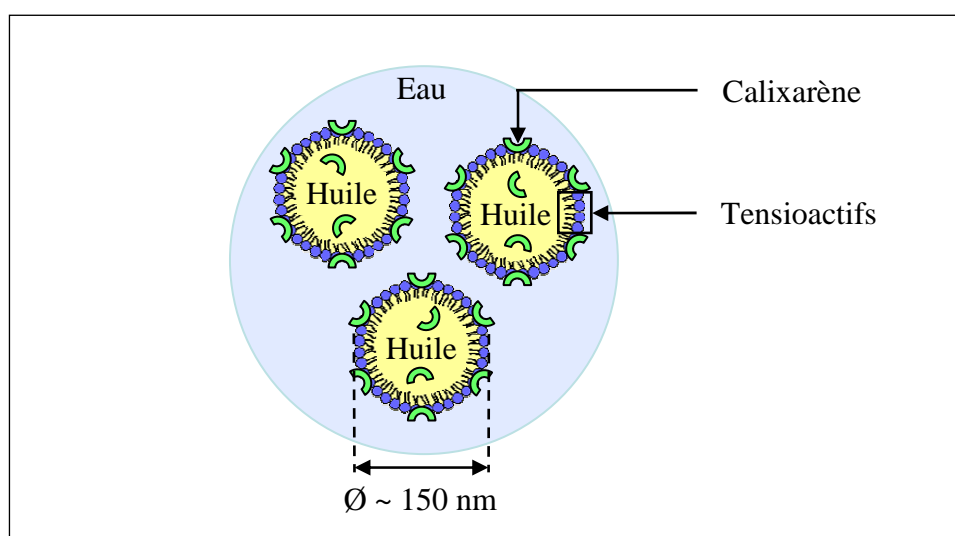


Figure 1. Représentation schématique de la nanoémulsion de calixarène.

D'après les travaux de Dei *et al.* (Dei *et al.* 1995) et de Lo Nostro *et al.* (Lo Nostro *et al.* 1996, Lo Nostro *et al.* 2001) qui indiquent que des calixarènes de structure similaire à celle du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène ont tendance à se placer parallèlement à l'interface air/eau, il est probable que notre calixarène d'intérêt se place de la même façon à l'interface huile de paraffine/eau avec les trois fonctions carboxyliques dans la phase aqueuse disponibles pour chélater l'uranium (figure 2) et que la molécule conserve cette disposition dans la nanoémulsion. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que des molécules de calixarène soient disposées perpendiculairement à la surface des gouttelettes huileuses dispersées. Cette configuration ne constituerait cependant pas un obstacle à la chélation des ions uranyle d'une solution aqueuse contaminée puisque, selon des études de modélisation moléculaire, cette chélation peut avoir lieu avec seulement deux des trois fonctions carboxyliques du calixarène et une molécule d'eau (Boulet 2006, Boulet *et al.* 2008).

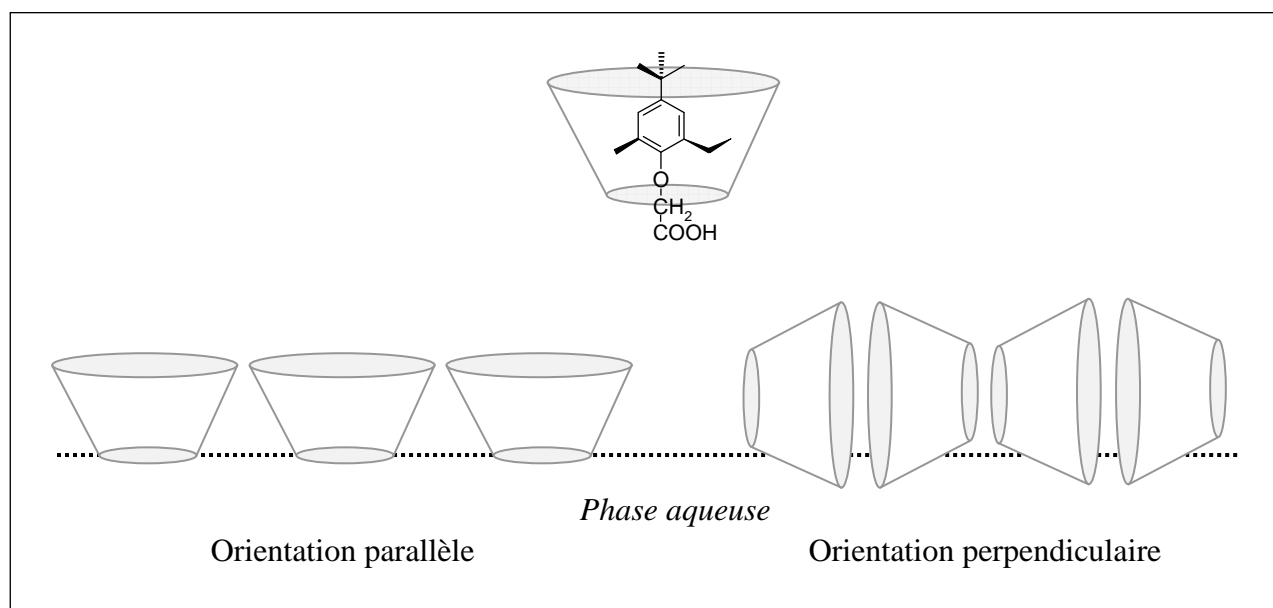


Figure 2. Hypothèses d'orientation du 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-tertbutylcalix[6]arène à l'interface huile de paraffine/eau, d'après (Dei *et al.* 1995).

Les tests préliminaires d'efficacité de la nanoémulsion de calixarène menés *in vitro* ont démontré que l'application de la nanoémulsion de calixarène sur une solution aqueuse contaminée par de l'uranium permet d'extraire plus de 80 % des ions uranyle de cette solution (chapitre I), ce qui confirme la présence et la disponibilité des fonctions chélatantes du calixarène tricarboxylique à la surface des gouttelettes huileuses dispersées. D'après les études de mesure de tension interfaciale (chapitre I) et les travaux préliminaires que nous avons menés en extraction liquide-liquide (tableau 1), le chélate calixarène-uranium semble être localisé à la surface des gouttelettes huileuses (figure 3).

Extraction de l'uranium depuis la solution aqueuse contaminée (%)	Répartition de l'uranium extrait de la solution aqueuse (%)	
	Huile de paraffine	Interface eau/huile de paraffine
91,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1	88,1 ± 4,1

Tableau 1. Répartition à l'équilibre de l'uranium entre l'huile de paraffine chargée en calixarène et la phase aqueuse contaminée en extraction liquide-liquide.

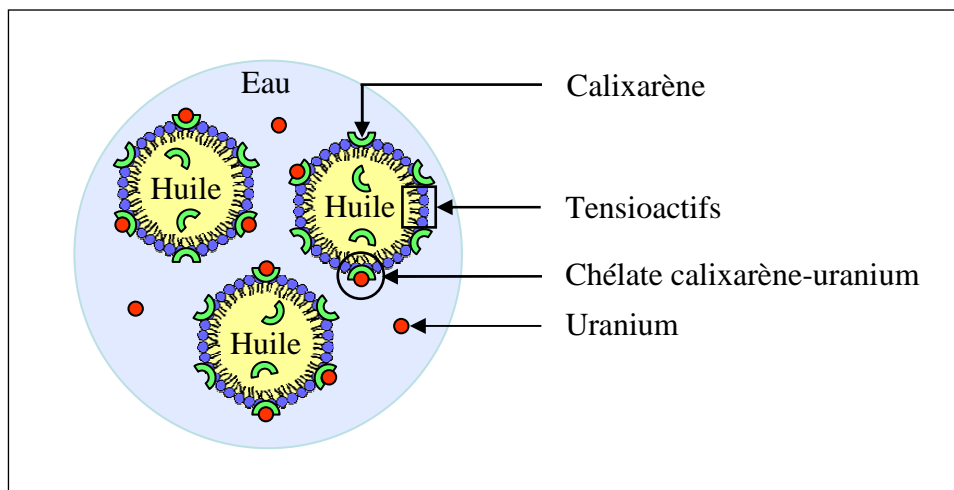


Figure 3. Représentation schématique de l'extraction par la nanoémulsion de calixarène des ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée par de l'uranium.

La nanoémulsion que nous avons développée constitue donc un système non dynamique d'extraction de l'uranium depuis une solution aqueuse contaminée, contrairement aux membranes liquides émulsionnées. Les membranes liquides émulsionnées à base de calixarène, qui ont déjà été utilisées comme système d'extraction de l'uranium depuis une solution aqueuse contaminée (Ramkumar *et al.* 2002), sont constituées de trois phases (figure 4) : une phase externe contenant l'uranium à extraire, une phase membranaire véhiculant le calixarène et une phase interne où le radioélément extrait est relargué et concentré, le tout étant stabilisé par des tensioactifs. Dans ce type de système, les ions uranyle diffusent depuis la phase externe vers la phase membranaire à la surface de laquelle ils sont chélatés par des molécules de calixarène, passent à travers la membrane sous forme de chélates calixarène-uranium et atteignent la phase interne où ils sont dissociés des molécules de calixarène et concentrés, libérant ainsi les molécules de calixarène qui peuvent alors retourner extraire d'autres ions uranyle de la phase externe. Il apparaît alors que la nanoémulsion de calixarène est plus rapidement saturable que les membranes liquides émulsionnées puisque, après la chélation des ions uranyle, le stock de molécules de calixarène disponibles pour la chélation n'est pas renouvelé (figure 5). Cependant, alors que les membranes liquides émulsionnées peuvent conduire à un relargage de l'uranium dans la phase externe en cas de déstabilisation du système, la nanoémulsion de calixarène assure elle un véritable piégeage des ions uranyle par chélation.

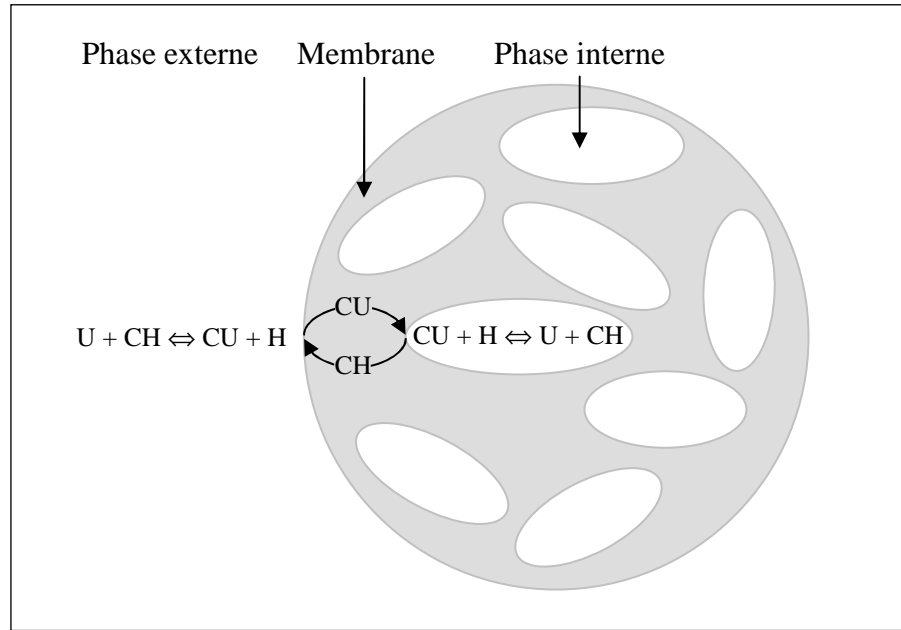


Figure 4. Représentation schématique du mécanisme d'extraction des ions uranyle par un système de type membrane liquide émulsionnée depuis une solution aqueuse contaminée (C : calixarène ; U : uranium ; CU : chélate calixarène-uranium ; H : proton), d'après (Devulapalli *et al.* 1999, Ramkumar *et al.* 2002).

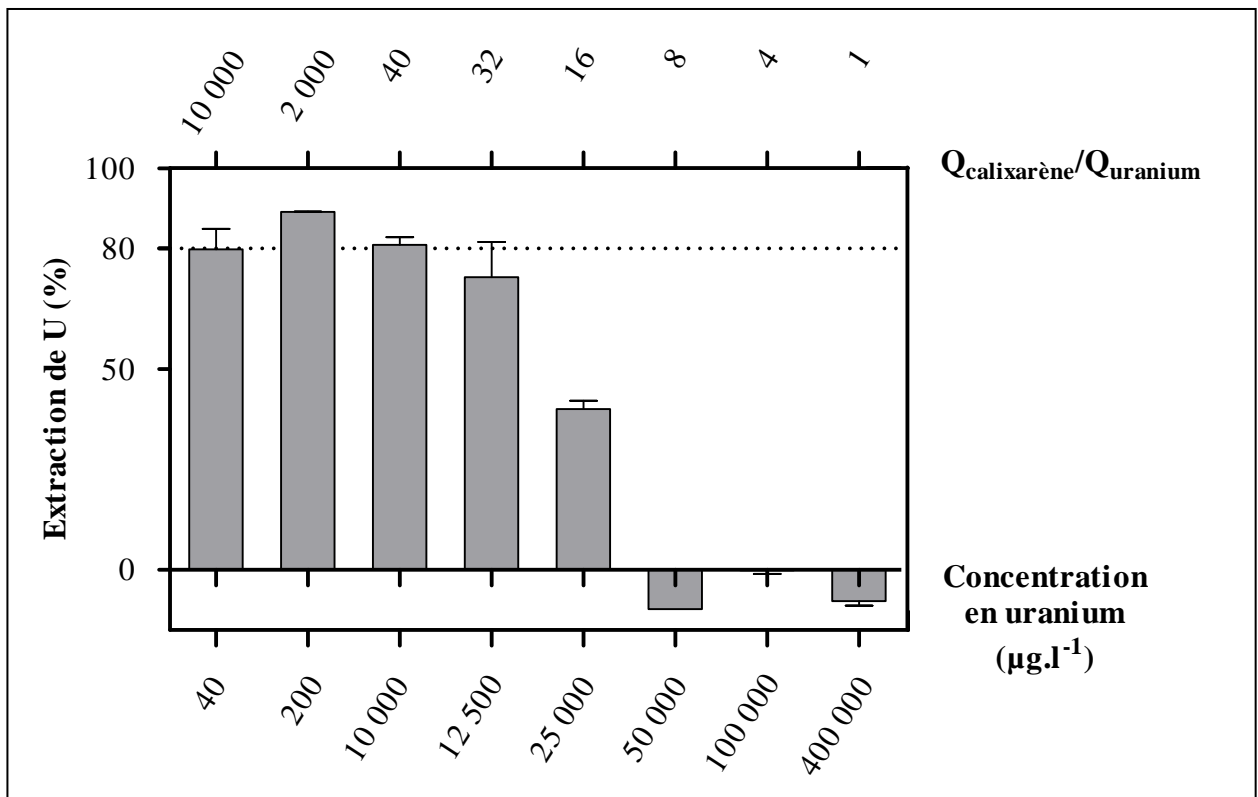


Figure 5. Mise en évidence du phénomène de saturation de la nanoémulsion chargée en calixarène à 2 mg.g^{-1} . Conditions *in vitro* : 1 heure de contact statique, $V_{\text{nanoémulsion}}/V_{\text{contamination}} = 1$.

Certaines études indiquent que les nanoémulsions conduisent à une pénétration cutanée et un passage percutané du principe actif qu'elles véhiculent supérieurs à ceux obtenus dans le cas des émulsions. En effet, ces travaux ont tendance à montrer que la pénétration cutanée et l'absorption percutanée augmentent lorsque la taille des gouttelettes dispersées des systèmes émulsionnés diminue (Fernandez *et al.* 2000, Röpke *et al.* 2002). Cependant, ces études comparant des systèmes émulsionnés non seulement de taille variable, mais également de composition différente, il est difficile de mettre en évidence la contribution propre de la taille des gouttelettes dispersées dans les phénomènes observés. Une étude systématique menée plus récemment par Izquierdo *et al.* (Izquierdo *et al.* 2007) a quant à elle démontré qu'aucune corrélation ne peut être établie entre la taille des globules dispersés et le passage percutané d'un principe actif. Ainsi, le choix de formuler dans notre étude une nanoémulsion plutôt qu'une émulsion ne va pas à l'encontre de l'objectif d'action de surface que nous nous sommes initialement fixé. De plus, la nanoémulsion permet d'assurer une interface plus importante qu'une émulsion entre les gouttelettes huileuses dispersées porteuses de calixarène et une phase aqueuse contaminée par de l'uranium. En effet, comme illustré dans la figure 6, la surface de contact entre ces deux phases joue un rôle crucial dans l'efficacité de décontamination de la forme galénique développée (chapitre II).

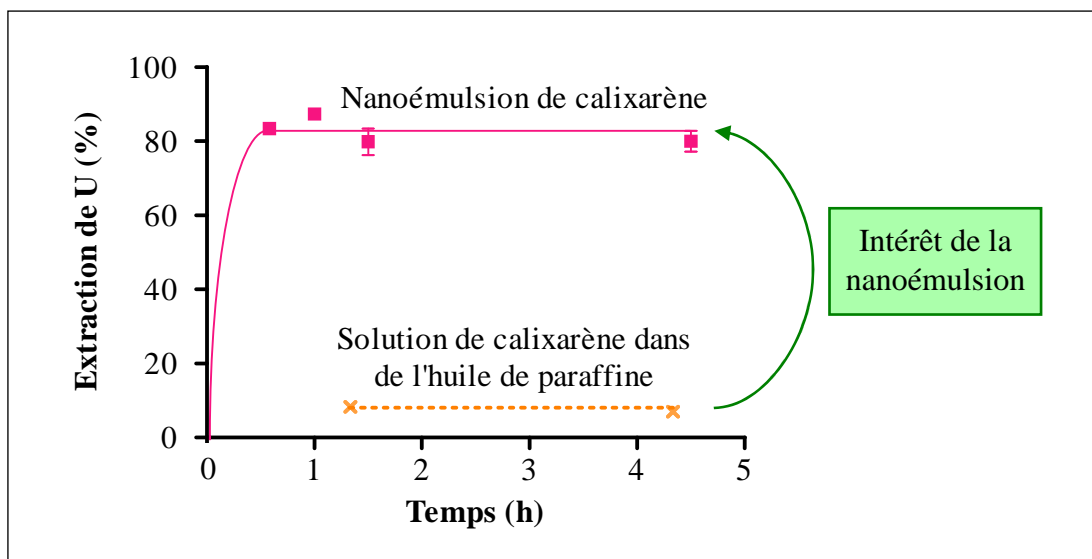


Figure 6. Cinétique d'extraction par la nanoémulsion de calixarène et par une solution de calixarène dans de l'huile de paraffine des ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'uranium extrait en fonction du temps.

Conditions *in vitro* : contact statique, $V_{\text{forme galénique}}/V_{\text{contamination}} = 1$, $Q_{\text{calixarène}}/Q_{\text{uranium}} = 10\,000$.

La forme galénique développée rend donc disponible les molécules de calixarène tricarboxylique pour la chélation des ions uranyle présents dans une solution aqueuse contaminée. De plus, grâce à sa phase aqueuse externe, la nanoémulsion constitue une forme lavable qui peut être aisément éliminée de la peau par simple rinçage à l'eau (Roberts 1999, Durgin *et al.* 2005), ce qui en fait une forme tout à fait adaptée au traitement des contaminations cutanées par l'uranium.

II. Effets de la nanoémulsion de calixarène sur la contamination cutanée par l'uranium

Dans cette seconde partie de la discussion seront tout d'abord justifiées les conditions expérimentales qui ont été utilisées pour évaluer l'efficacité de décontamination cutanée de la nanoémulsion de calixarène. Les résultats obtenus au cours de ces travaux seront ensuite analysés et comparés avec ceux obtenus dans d'autres études menées dans le même domaine.

II.1. Justification de la méthode mise en œuvre

Après avoir démontré *in vitro*, par la mise en œuvre de la technique d'ultrafiltration, la capacité de la nanoémulsion de calixarène à extraire rapidement (5 minutes) et quasi totalement (> 80 %) les ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée par de l'uranium (figure 6 et chapitre II), l'efficacité de décontamination de cette forme a été évaluée *ex vivo* en cellule de Franz sur des explants de peau d'oreille de porc. Cette technique, initialement développée pour la pharmacologie cutanée et validée pour l'étude du passage transdermique d'éléments radioactifs et notamment de l'uranium (Tymen *et al.* 2000), présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et permet d'éviter le sacrifice d'animaux de laboratoire. Dans ce système, nous avons employé de la peau de la face externe d'oreilles de porc qui est plus facile à obtenir que les biopsies de peau humaine et qui est reconnue comme étant le modèle de peau animale le plus représentatif de la peau humaine (Jacobi *et al.* 2007). Les expérimentations ont été menées sur des explants de peau entière constitués de l'épiderme et du derme. L'uranium étant résorbé par la circulation sanguine dès le haut du derme, l'emploi de peaux entières en cellule de Franz peut conduire à une sous-estimation du délai du passage percutané du radioélément. Cependant, dans notre étude de la cinétique de diffusion percutanée de l'uranium, le passage de ce radioélément à travers la peau a été détecté dès 30 minutes après la contamination (chapitre III), ce qui est en accord avec les données obtenues *in vivo* chez la rat (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b).

La contamination des explants de peau d'oreille de porc a été réalisée avec une solution de nitrate d'uranyle. Ce composé d'uranium, soluble et transférable, a été choisi car il a été identifié comme étant celui diffusant le plus rapidement et le plus fortement à travers la peau (De Rey *et al.* 1983). Il fait donc partie des composés d'uranium les plus préoccupants en cas de contamination cutanée. La concentration en uranium dans la solution contaminée déposée sur les biopsies de peau

(10 mg.l⁻¹) a été choisie de façon à être significative et à assurer, après application de la nanoémulsion de calixarène sur la contamination cutanée, un excès de calixarène suffisant pour garantir, d'après les études *in vitro* (figure 5 et chapitre II), un rendement optimal d'extraction des ions uranyle par la nanoémulsion de calixarène. Le pH de la solution contaminée a quant à lui été fixé à pH = 5 pour deux principales raisons. Premièrement, nous avons démontré *in vitro* que l'extraction par la nanoémulsion de calixarène des ions uranyle depuis une solution contaminée est optimale pour un pH supérieur ou égal à 5, sachant que l'efficacité de la nanoémulsion peut être maintenue en cas de contamination acide en tamponnant à pH = 5 la phase aqueuse la constituant (chapitre II). De plus, l'emploi d'une solution contaminée de pH = 5 permet d'étudier le passage percutané de l'uranium à travers une peau intègre, le pH de la surface cutanée étant compris entre 4,2 et 5,8 (ECETOC 1993, Seiller *et al.* 1996). En effet, l'emploi de solutions contaminées acides conduit à l'apparition de brûlures chimiques responsables d'une rétention de l'uranium dans les tissus cutanés, ce qui peut mener à une sous-estimation du passage percutané de l'uranium dans les premiers instants suivant l'exposition (Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b, Fukuda *et al.* 2009). Cela permet également de ne pas mélanger deux modèles de blessure lors de l'étude du passage percutané de l'uranium à travers le modèle de peau lésée que nous avons sélectionné.

Les études de diffusion percutanée de l'uranium en fonction de l'application ou non de la nanoémulsion de calixarène ont été menées sur des cellules de Franz durant 24 heures, durée maximale assurant le maintien de l'intégrité des explants de peau (SCCNFP 2003, OECD/OCDE-428 2004), en condition occlusive. Nous avons fait le choix de travailler en condition occlusive pour plusieurs raisons. Tout d'abord, cela permet d'éviter l'évaporation des échantillons aqueux déposés sur la peau au cours des 24 heures d'expérimentation et donc d'éviter un phénomène de concentration de l'uranium à la surface cutanée qui, selon la première loi de diffusion de Fick, peut influencer sur le flux de passage percutané de ce radioélément. De plus, cette condition est représentative des conditions réellement rencontrées dans les cas de contamination cutanée. En effet, après rinçage de la zone cutanée ou de la blessure contaminée, un bandage est appliqué afin de limiter la dispersion de radioéléments durant le transport de la victime au service médical du centre nucléaire. Enfin, l'occlusion conduisant en règle générale à une augmentation de l'absorption cutanée (Zatz 1993, Seiller *et al.* 1996, Bucks *et al.* 1999, Golda *et al.* 2005), elle favorise potentiellement le passage de l'uranium à travers la peau. Ainsi, le fait d'employer une solution de nitrate d'uranyle comme contaminant et de maintenir une condition occlusive nous permet de nous placer dans des conditions expérimentales favorables au passage percutané de l'uranium qui sont idéales pour évaluer le potentiel de la nanoémulsion de calixarène que nous avons développée pour le traitement des contaminations cutanées par l'uranium. L'efficacité de décontamination cutanée de la nanoémulsion de calixarène a alors été évaluée sur la peau intacte et sur un modèle de blessure superficielle, l'excoriation. Nous avons choisi ce modèle de blessure car il constitue l'un des

modèles les plus préoccupants en terme de vitesse de translocation de l'uranium du site de dépôt vers les organes cibles qui sont les reins et le squelette (Petitot *et al.* 2004, Petitot *et al.* 2007a, Petitot *et al.* 2007b). De plus, la technique dite du tape stripping permettant de réaliser ce type de blessure par élimination de la couche cornée, strate la plus externe de la peau connue pour sa fonction de barrière face au passage de substances exogènes (Schmitt 2000, Hadgraft 2004, Martini 2006), présente les avantages d'être facile à mettre en œuvre et reproductible.

II.2. Efficacité de décontamination cutanée de la nanoémulsion de calixarène

Très peu d'études ont utilisé la stratégie de traitement des contaminations cutanées consistant à développer des formes galéniques véhiculant localement des agents chélatants capables de piéger l'uranium au niveau de la zone cutanée contaminée. En effet, les premières formes ont été développées seulement deux années avant l'initiation de ces travaux de thèse (Houpert *et al.* 2004). Elles consistaient en des pansements et des gels hydrocolloïdaux véhiculant des chélateurs de la famille des biphosphonates. Cependant, il a été démontré que l'action de décontamination de ces formes était exclusivement due à un phénomène physique d'absorption de la solution contaminée par le système. Par conséquent, les agents chélatants véhiculés ne jouant pas leur rôle, la rétention de l'uranium par ces systèmes n'est pas garantie. De plus, une rémanence du gel au niveau du site d'application a été constatée, ce qui n'est pas souhaitable pour le traitement des contaminations cutanées. Depuis ces travaux, d'autres hydrogels véhiculant également des agents chélatants de la famille des biphosphonates ont été formulés (Yang *et al.* 2005, Xu *et al.* 2008). A l'image des études menées par Houpert *et al.* (Houpert *et al.* 2004), ces formes ont permis de limiter de façon significative l'absorption cutanée de l'uranium, mais l'action des chélateurs n'a encore une fois pas été démontrée.

Dans nos travaux, nous avons non seulement démontré la capacité de la nanoémulsion de calixarène que nous avons développée à limiter de façon très significative le passage d'une forme soluble et transférable d'uranium à travers la peau intacte ou excoriée (figure 7), mais nous avons également mis en évidence la chélation de l'uranium par les molécules de calixarène tricarboxylique. En effet, nous avons étudié *in vitro* la contribution de chaque constituant de la nanoémulsion dans l'extraction des ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée (chapitre II). Ainsi, nous avons montré que la forme en elle-même, c'est-à-dire la nanoémulsion dépourvue de calixarène, extrait environ 20 % de l'uranium de la solution contaminée et que cette extraction est attribuable aux tensioactifs. De plus, les études *ex vivo* en cellule de Franz ont indiqué que l'ajout de la nanoémulsion sur une solution contaminée par de l'uranium conduit à une dilution du radioélément dans la phase aqueuse de la forme, ce qui entraîne, en accord avec la première loi de diffusion de Fick, une diminution du flux de diffusion percutanée de ce dernier (chapitre III).

Ainsi, l'effet de dilution de la solution contaminée dans la phase aqueuse de la nanoémulsion, le piégeage par les tensioactifs et la chélation par les molécules de calixarène tricarboxylique contribuent tous les trois à l'action de décontamination de la nanoémulsion de calixarène. En complément et en vue de mieux comprendre l'action de la nanoémulsion de calixarène sur la peau intacte ou excoriée contaminée par de l'uranium, nous avons localisé l'uranium dans les structures cutanées après application ou non de la nanoémulsion de calixarène sur la contamination. Cette étude, réalisée par microscopie ionique SIMS, montre que l'application de la nanoémulsion de calixarène immédiatement après la contamination permet de réduire très significativement la rétention de l'uranium dans la couche cornée de la peau intacte, ce qui indique que la nanoémulsion de calixarène piège l'uranium à la surface de la peau et y demeure durant les 24 heures d'expérimentation. Le fait qu'aucune accumulation d'uranium ne soit observée dans les diverses strates cutanées de la peau excoriée suite à l'application de la nanoémulsion sur la contamination semble indiquer qu'en cas de blessure la nanoémulsion de calixarène demeure également essentiellement à la surface de la peau après le piégeage des ions uranyle. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que de l'uranium soit présent dans les strates cutanées en quantité non détectable par la technique SIMS. Ainsi, des études complémentaires doivent être menées afin de quantifier l'uranium, suite à l'application de la nanoémulsion de calixarène sur la contamination, dans les explants de peau entiers dans un premier temps, puis séparément dans l'épiderme et le derme dans un second temps, afin d'évaluer la répartition du radioélément entre ces strates cutanées. De plus, même si les études de diffusion percutanée du calixarène depuis la nanoémulsion ont montré que cette molécule ne diffuse pas à travers la peau intacte ou excoriée, il serait intéressant d'estimer sa pénétration cutanée et, dans le cas où elle pénétrerait effectivement dans la peau, d'étudier sa localisation au sein des tissus cutanés.

Nous avons également constaté que la nanoémulsion de calixarène est légèrement moins efficace lorsqu'elle est appliquée sur la peau dans un délai de 5 à 30 minutes après la contamination, mais elle permet tout de même de réduire de plus de 70 % la quantité d'uranium diffusée à travers la peau excoriée à l'issue des 24 heures d'étude en cellule de Franz. D'après cette observation, il semblerait qu'une certaine proportion de l'uranium déposé sur la peau excoriée pénètre très rapidement, en moins de 5 minutes, dans les structures cutanées où elle n'est alors plus extractible par la nanoémulsion. Nous poursuivons actuellement les travaux de recherche afin de mieux comprendre ce phénomène. Ce dernier résultat souligne la nécessité de prendre en charge le plus rapidement possible les contaminations cutanées par l'uranium, notamment dans le cas d'une blessure contaminée et ce, même lorsque cette blessure semble bénigne.

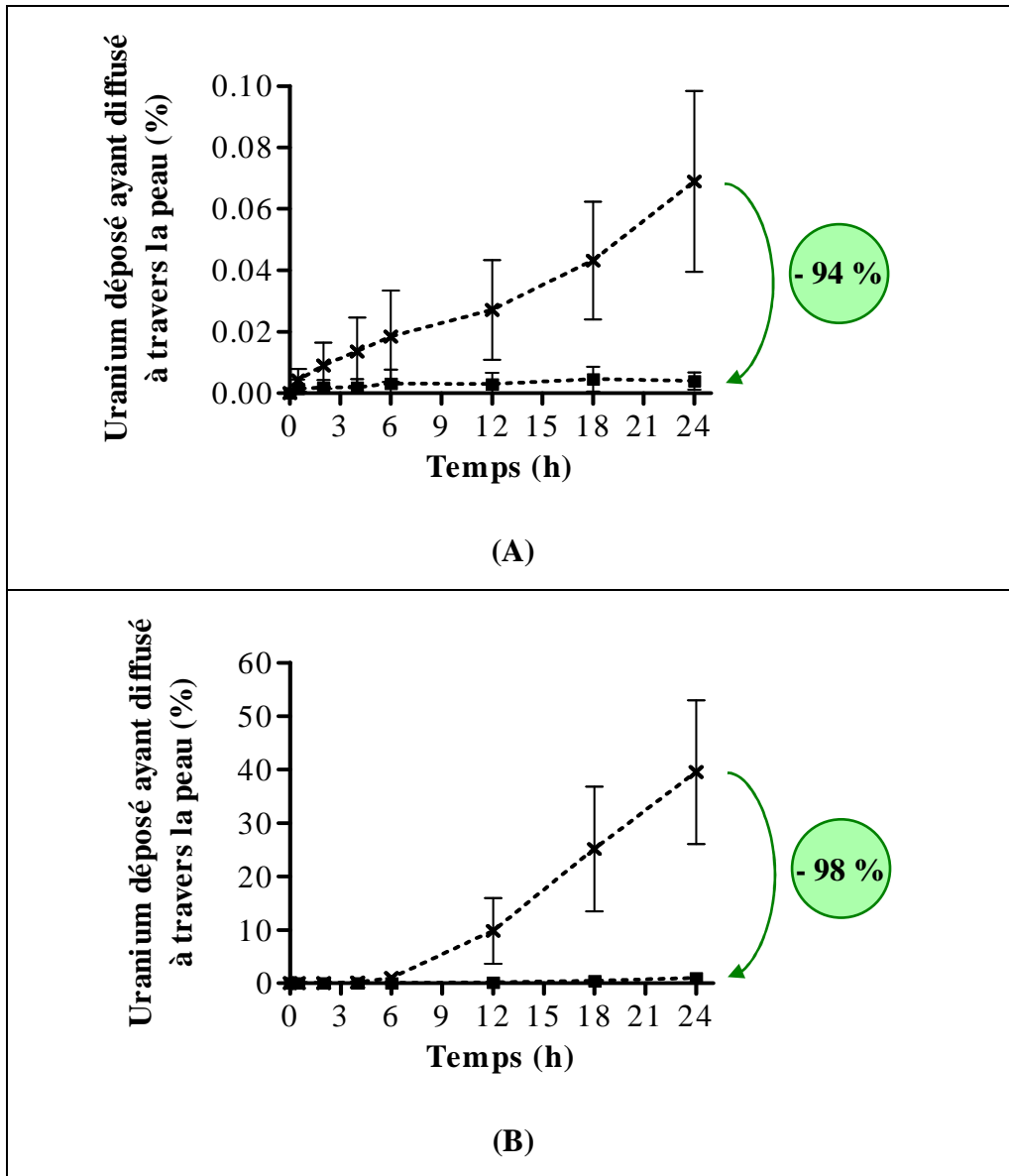


Figure 7. Cinétique de diffusion percutanée de l'uranium à travers la peau intacte (A) et lésée (B) en absence de traitement (x) ou suite à l'application de la nanoémulsion de calixarène immédiatement après l'étape de contamination (■).

Enfin, l'action de la nanoémulsion de calixarène sur la peau excoriée contaminée par une solution de nitrate d'uranyle a été comparée à celle de l'eau qui est couramment employée pour rincer la zone cutanée contaminée (chapitre III). Ainsi, nous avons constaté que l'ajout d'eau sur la contamination permet de réduire le passage percutané de l'uranium suite au phénomène de dilution précédemment discuté. Cependant, cet effet n'est pas aussi marqué que l'action de la nanoémulsion qui est capable d'extraire et retenir l'uranium à la surface de la peau. Ainsi, nous pouvons envisager d'employer la nanoémulsion de calixarène en tant que solution de rinçage d'une contamination cutanée par l'uranium car elle combine une action physique de rinçage, de par sa fluidité et la nature aqueuse de sa phase continue, à une action de piégeage de l'uranium.

Références bibliographiques

- Archimbaud M, Henge-Napoli MH, Lilienbaum D, Desloges M, Montagne C. Application of calixarenes for the decorporation of uranium: Present limitations and further trends. *Radiation Protection Dosimetry* 53: 327-330; 1994.
- ASN. Guide national : Intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. V3.6; 2008.
- Blanchin N, Desloires S, Grappin L, Guillermin AM, Lafon P, Miele A. Protocoles de prise en charge des incidents d'expositions internes au plutonium dans un service médical d'installation nucléaire de base : élaboration - mise en place - évaluation - validation de 1996 à 2002. *Radioprotection* 39: 59-75; 2004.
- Boulet B. Extraction sélective des actinides par les calixarènes. Application à l'analyse radiotoxicologique. In: Université Paris VI; 2006.
- Boulet B, Joubert L, Cote G, Bouvier-Capely C, Cossonnet C, Adamo C. Theoretical study of the uranyl complexation by hydroxamic and carboxylic acid groups. *Inorganic Chemistry* 47: 7983-7991; 2008.
- Bucks D, Maibach H. Occlusion does not uniformly enhance penetration in vivo; In: RL Bronaugh, H Maibach. *Drugs and the pharmaceutical sciences - Percutaneous Absorption. Durgs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Vol. 97, 81-106. Marcel Dekker; 1999.
- Da Silva E, Shahgaldian P, Coleman AW. Haemolytic properties of some water-soluble para-sulphonato-calix-[n]-arenes. *International Journal of Pharmaceutics* 273: 57-62; 2004.
- De Rey BM, Lanfranchi HE, Cabrini RL. Percutaneous absorption of uranium compounds. *Environmental Research* 30: 480-491; 1983.
- Dei L, Casnati A, Lo Nostro P, Baglioni P. Selective complexation by p-tert-butylcalix[6]arene in monolayers at the water-air interface. *Langmuir* 11: 1268-1272; 1995.
- Devulapalli R, Jones F. Separation of aniline from aqueous solutions using emulsion liquid membranes. *Journal of Hazardous Materials* 70: 157-170; 1999.
- Dinse C. Etude de l'extraction des actinides par les calixarènes : Application à l'analyse radiotoxicologique. In: Université Louis pasteur de Strasbourg; 1999.
- Durgin JM, Hanan ZI. Thomson Delmar Learning's Pharmacy Practice for Technicians. 3^{ème} ed. Delmar Publishers; 2005.
- ECETOC. European Centre for Ecotoxicology and toxicology of Chemicals - Absorption percutanée. 1993.
- Fernandez C, Marti-Mestres G, Ramos J, Maillols H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of 'in vitro' and 'in vivo' skin penetration from solvents, coarse and

- submicron emulsions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24: 155-165; 2000.
- Fukuda S, Ikeda M, Nakamura M, Yan X, Xie Y. Acute toxicity of subcutaneously administered depleted uranium and the effects of CBMIDA in the simulated wounds of rats. *Health physics* 96: 483-492; 2009.
- Golda N, Koo J, Maibach HI. Effects and uses of occlusion on human skin: An overview. *Cutaneous and Ocular Toxicology* 24: 91-104; 2005.
- Grappin L, Bérard P, Ménétrier F, Carbone L, Courtay C, Castagnet X, Le Goff JP, Neron MO, Piechowski J. Treatment of actinide exposures: A review of Ca-DTPA injections inside CEA-COGEMA plants. *Radiation Protection Dosimetry* 127: 435-439; 2007.
- Hadgraft J. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58: 291-299; 2004.
- Houpert P, Chazel V, Paquet F. A local approach to reduce industrial uranium wound contamination in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 73-8; 2004.
- Izquierdo P, Wiechers JW, Escribano E, Garcia-Celma MJ, Tadros TF, Esquena J, Dederen JC, Solans C. A study on the influence of emulsion droplet size on the skin penetration of tetracaine. *Skin Pharmacology and Physiology* 20: 263-270; 2007.
- Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W, Lademann J. Porcine ear skin: An in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology* 13: 19-24; 2007.
- Lo Nostro P, Capuzzi G, Fratini E, Dei L, Baglioni P. Modulation of interfacial properties of functionalized calixarenes. *Progress in Colloid and Polymer Science* 118: 238-242; 2001.
- Lo Nostro P, Casnati A, Bossoletti L, Dei L, Baglioni P. Complexation properties of calixarenes in Langmuir films at the water-air interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 116: 203-209; 1996.
- Martini M-C. *Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie*. Second ed. Lassay-les-Châteaux: EMD S.A.S; 2006.
- Muller D, Houpert P, Hengé-Napoli MH, Métivier H, Paquet F. Synergie potentielle entre deux toxiques rénaux : le DTPA et l'uranium. *Radioprotection* 41: 413-420; 2006.
- OECD/OCDE-428. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques n°428- Absorption cutanée : méthode *in vitro*. 2004.
- Paquet F, Ramounet B, Hengé-Napoli MH, Métivier H, Gourmelon P. In vitro experiments to determine the mechanisms by which chelators remove neptunium and uranium from the body. *Radiation Protection Dosimetry* 79: 467-470; 1998.
- Petitot F, Frelon S, Moreels AM, Claraz M, Delissen O, Tournalias E, Dhieux B, Maubert C, Paquet F. Incorporation and distribution of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Health Physics* 92: 464-474; 2007a.

- Petitot F, Gautier C, Moreels AM, Frelon S, Paquet F. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiation protection dosimetry* 127: 125-130; 2007b.
- Petitot F, Moreels AM, Paquet F. In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig. *Can J Physiol Pharmacol* 82: 133-9; 2004.
- Ramkumar J, Nayak SK, Maiti B. Transport of uranyl ion across a bulk liquid membrane using calixarene and synergistic agents as carriers. *Journal of Membrane Science* 196: 203-210; 2002.
- Roberts N. Médicaments et la peau. *Pharmacologie intégrée*: 353-368; 1999.
- Röpke CD, Kaneko TM, Rodrigues RM, Da Silva VV, Barros S, Sawada TCH, Kato MJ, Barros SBM. Evaluation of percutaneous absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 249: 109-116; 2002.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. *Handbook of pharmaceutical Excipients*. Fourth ed. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association; 2003.
- SCCNFP. The Scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers. Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. 2003.
- Schmitt D. *Biologie de la peau humaine Séminaire d'enseignement INSERM*; 2000.
- Seiller M, Martini M-C. *Formes pharmaceutiques pour application locale*. Paris: Lavoisier; 1996.
- Souane R. Synthèse et propriétés complexantes vis-à-vis de l'ion uranyle de dérivés carboxyliques du p-tert-butyl-calix[6]arène. In: *Université Louis Pasteur, Strasbourg*; 2005.
- Tymen H, Gerasimo P, Hoffschir D. Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber. *Int J Radiat Biol* 76: 1417-24; 2000.
- Xu K, Ge W, Liang G, Wang L, Yang Z, Wang Q, Hsing IM, Xu B. Bisphosphonate-containing supramolecular hydrogels for topical decorporation of uranium-contaminated wounds in mice. *International Journal of Radiation Biology* 84: 353-362; 2008.
- Yang Z, Xu K, Wang L, Gu H, Wei H, Zhang M, Xu B. Self-assembly of small molecules affords multifunctional supramolecular hydrogels for topically treating simulated uranium wounds. *Chemical Communications*: 4414-4416; 2005.
- Zatz J. *Skin permeation - Fundamentals and application*. Allured publishing corporation; 1993.

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous avons démontré que l'administration locale de 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène, agent chélatant de la famille des calixarènes connu pour sa forte affinité envers les ions uranyle, constitue une nouvelle stratégie de traitement des contaminations cutanées par l'uranium survenant dans l'industrie nucléaire.

Le calixarène tricarboxylique que nous avons choisi se présentant sous forme d'une poudre hydrophobe, il était nécessaire de concevoir une forme pharmaceutique capable de le véhiculer à la surface de la zone cutanée contaminée par de l'uranium et de le rendre disponible pour la chélation de ce radionucléide. Ainsi, nous avons développé une nanoémulsion de type huile dans eau dont la caractérisation physico-chimique a mis en évidence la présence à la surface des gouttelettes huileuses dispersées de molécules de calixarène potentiellement disponibles pour piéger les ions uranyle d'une solution aqueuse contaminée.

Il a ensuite été démontré par des études *in vitro* que les molécules de calixarène, ainsi localisées au sein de la nanoémulsion, étaient capables d'extraire très rapidement les ions uranyle depuis une solution aqueuse contaminée. Nous avons également montré que l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène en cas de contamination par une solution acide, milieu le plus fréquemment rencontré dans les accidents de contamination cutanée par l'uranium, peut être maintenue en tamponnant le pH de la phase aqueuse continue constituant la nanoémulsion.

Enfin, l'évaluation *ex vivo* de l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène sur des explants de peau d'oreille de porc montés en cellule de Franz a montré que cette forme pharmaceutique permet d'empêcher le passage de l'uranium à travers la peau intacte ou excoriée lorsqu'elle est appliquée immédiatement après la contamination. Il a également été mis en évidence que l'action de décontamination de la nanoémulsion de calixarène diminue légèrement lorsque son application est retardée de 5 à 30 minutes. Afin d'assurer une décontamination optimale, la nanoémulsion de calixarène doit donc être appliquée le plus rapidement possible après une contamination cutanée par l'uranium.

A l'issue de ces travaux, nous pouvons conclure que la nanoémulsion de calixarène constitue un système prometteur adapté au traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium.

Plusieurs axes de recherche pourraient être développés à la suite de cette thèse qui compte parmi les tous premiers travaux portant sur la mise au point de traitements d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium. En effet, les études *ex vivo* sur les explants de peau d'oreille de porc doivent dans un premier temps être approfondies et poursuivies avant d'aborder les expérimentations *in vivo* chez l'animal.

► **Poursuite des expériences *ex vivo* sur les explants de peau d'oreille de porc**

Même si les études de diffusion percutanée du calixarène depuis la nanoémulsion ont montré que cette molécule ne diffuse pas à travers la peau intacte ou excoriée, il serait intéressant d'estimer sa pénétration cutanée et, dans le cas où elle pénétrerait effectivement dans la peau, de la localiser au sein des tissus cutanés. Dans cette perspective, une étude de détection et de localisation du calixarène par microscopie confocale Raman dans les explants de peau d'oreille de porc intacte ou lésée, sur lesquels la nanoémulsion de calixarène a été appliquée durant 24 heures, a été initiée en fin de thèse, en collaboration avec le Pr. Michel Manfait, le Dr. Ali Tfayli (Unité MéDIAN, UMR CNRS 6142, Université de Reims Champagne-Ardenne) et le Pr. Arlette Baillet-Guffroy (Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Université Paris-Sud 11). Dans le cas où cette étude ne serait pas concluante, il pourrait être envisagé de localiser le calixarène dans les structures cutanées par radiomarquage de cette molécule, au carbone 14 par exemple. Enfin, le contenu en calixarène dans les explants de peau pourrait également être estimé, après digestion chimique des biopsies de peau, par une analyse HPLC ou par une mesure de radioactivité si des molécules radiomarquées de calixarène sont employées. En cas de détection significative du calixarène dans les explants de peau entiers, il serait possible de déterminer de la même façon le contenu en calixarène dans l'épiderme et le derme, après séparation de ces deux couches cutanées.

Les travaux menés au cours de cette thèse indiquent que l'action de décontamination de la nanoémulsion de calixarène semble être localisée à la surface de la peau intacte ou excoriée. En effet, aucune présence d'uranium n'a été détectée par la technique d'imagerie SIMS dans les explants de peau après application de la nanoémulsion de calixarène sur les biopsies de peau contaminées. Toutefois, il n'est pas impossible que de l'uranium ait pénétré en très faibles quantités dans les explants de peau et qu'il y soit présent de façon diffuse et donc non détectable par la technique SIMS que nous avons employée. Des études complémentaires doivent donc être menées afin de déterminer s'il y a ou non présence d'uranium dans la peau intacte ou lésée après l'application de la nanoémulsion de calixarène sur la zone cutanée contaminée. Dans cette perspective, le contenu en uranium dans les biopsies de peau, contaminées par de l'uranium puis traitées avec la nanoémulsion de calixarène, pourrait être déterminé par ICP-MS après digestion chimique des explants de peau. En cas de détection significative d'uranium dans les explants de peau, il serait intéressant d'estimer, selon la même procédure, la répartition du radioélément entre l'épiderme et le derme, après séparation de ces deux strates cutanées.

▶ **Etude comparative entre la nanoémulsion de calixarène et d'autres traitements locaux de la contamination cutanée par l'uranium**

Les travaux menés *ex vivo* en cellule de Franz ont démontré que la nanoémulsion de calixarène constitue un système plus adapté au traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium que le simple rinçage à l'eau de la zone contaminée. Cette étude pourrait être complétée en comparant, dans les mêmes conditions, l'action de la nanoémulsion de calixarène à celle d'autres traitements d'urgence de la contamination cutanée par l'uranium qui sont actuellement employés, tels que le rinçage par de l'eau savonneuse ou par une solution d'acide diéthylène-triamine-pentaacétique (DTPA), ainsi qu'à celle de solutions contenant d'autres chélateurs de l'uranium tels que l'éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP).

▶ **Evaluation de l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène sur d'autres composés d'uranium**

Le choix du composé d'uranium que nous avons utilisé durant nos études s'est volontairement porté sur le nitrate d'uranyle, forme d'uranium soluble et transférable, car ce composé d'uranium fait partie des formes diffusant le plus rapidement et le plus fortement à travers la peau. Cependant, les travailleurs de l'industrie nucléaire étant exposés à de nombreuses autres formes d'uranium, de solubilité et de transférabilité variées, il est nécessaire d'évaluer l'action de la nanoémulsion de calixarène sur des contaminations cutanées par d'autres composés d'uranium, comme UO_2 , UO_3 , ou U_3O_8 .

▶ **Evaluation de l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène sur d'autres modèles de blessure**

Nous avons démontré au cours des travaux menés en cellule de Franz sur la peau intacte et sur un modèle de blessure superficielle, l'excoriation, que la nanoémulsion de calixarène constitue un traitement d'urgence efficace de la contamination cutanée par l'uranium. La contamination par voie cutanée pouvant également avoir lieu dans l'industrie nucléaire suite à une contusion, une brûlure chimique, une brûlure thermique, une piqûre ou encore une plaie, il est primordial d'évaluer l'efficacité de décontamination de la nanoémulsion de calixarène sur des modèles de blessure contaminée autres que l'excoriation. Il serait également intéressant d'étudier les effets de la nanoémulsion de calixarène sur le processus de cicatrisation d'une blessure et, dans les cas où la nanoémulsion de calixarène pénétrerait dans le sang, d'étudier sa distribution dans l'organisme ainsi que sa toxicité.

▶ **Application à d'autres actinides**

Le chélateur que nous avons choisi d'utiliser en tant que principe actif dans la forme galénique développée, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p-tert*butylcalix[6]arène, présente non seulement une forte affinité envers l'uranium, mais il est également capable d'extraire le plutonium et l'américium d'une solution aqueuse contaminée par ces radioéléments. L'exposition interne faisant suite à une contamination cutanée par ces deux actinides étant également préoccupante dans l'industrie nucléaire, il est envisagé d'appliquer la nanoémulsion de calixarène au traitement des contaminations cutanées par le plutonium, l'américium ou encore pour des contaminations mixtes contenant un mélange des trois actinides uranium, plutonium et américium. L'efficacité de la nanoémulsion de calixarène en tant que traitement de ces contaminations sera tout d'abord évaluée *in vitro* avec l'emploi de l'ultrafiltration puis *ex vivo* en cellule de Franz sur des explants de peau d'oreille de porc.

▶ **Etudes *in vivo***

La technique *ex vivo* d'étude de diffusion percutanée employée dans cette thèse a permis d'établir la cinétique de diffusion percutanée de l'uranium à travers la peau intacte ainsi que sur un modèle de peau lésée et de comparer l'effet de l'application de différentes formulations sur cette cinétique. Cette technique ne tenant cependant pas compte de la résorption sanguine de l'uranium qui a lieu dans les explants de peau, des études *in vivo* sur un modèle animal doivent être menées, le porc constituant le modèle animal le plus représentatif de l'absorption cutanée chez l'homme.

▶ **Evolution de la forme galénique**

La nanoémulsion de calixarène est une forme fluide qui pourrait être employée comme solution de rinçage sur la zone cutanée contaminée par l'uranium, ce traitement pouvant être appliqué en urgence sur le lieu de l'accident de contamination puis au niveau service médical du centre nucléaire. Il est également possible de modifier la viscosité de la nanoémulsion par ajout d'agents gélifiants afin d'obtenir une forme de type gel ou de s'orienter vers des formes à caractère filmogène. Il serait aussi intéressant de faire évoluer la forme galénique pour décontaminer des zones cutanées difficiles d'accès, tels que les orifices naturels (nez, oreilles), avec des systèmes éponge. De plus, il pourrait être avantageux de développer une forme de type shampoing afin de décontaminer les cheveux et le cuir chevelu car les shampoings classiquement employés au service médical ne permettent qu'une décontamination partielle.

▶ **Autre application envisageable de la nanoémulsion de calixarène**

Enfin, les nanoémulsions constituant des systèmes injectables par voie intraveineuse déjà développés pour la détoxification, il pourrait être envisagé, à plus long terme, de développer un système similaire à celui mis au point dans ce travail de thèse en vue d'une application à la décorporation de l'uranium, les décorporants actuellement employés étant peu efficaces. La distribution de la nanoémulsion de calixarène injectée dans l'organisme ainsi que sa toxicité devront alors être étudiées chez l'animal.

RÉSUMÉ

Les accidents de contamination par voie cutanée représentent la seconde cause de contamination des travailleurs de l'industrie nucléaire, après l'inhalation. La contamination cutanée par l'uranium est particulièrement préoccupante car elle peut conduire à une forte exposition interne des individus et les traitements actuellement employés, c'est-à-dire le rinçage de la zone cutanée contaminée et l'administration de décorporants, sont peu efficaces. Il apparaît alors important de développer de nouveaux traitements. La stratégie adoptée dans ces travaux de thèse a consisté à mettre au point un traitement local de la contamination cutanée par l'uranium basé sur l'utilisation d'un chélateur de la famille des calixarènes, le 1,3,5-OCH₃-2,4,6-OCH₂COOH-*p*-*tert*butylcalix[6]arène, permettant de piéger le radioélément au niveau de la zone cutanée contaminée afin d'empêcher sa pénétration dans l'organisme et ainsi d'éviter la manifestation de ses effets toxiques.

Notre premier objectif a été de développer une forme galénique adaptée à l'usage cutané contenant le calixarène tricarboxylique d'intérêt et capable de le rendre disponible pour la chélation de l'uranium présent dans une solution aqueuse contaminée. Une nanoémulsion de type huile dans eau caractérisée par la présence de molécules de calixarène à la surface des gouttelettes huileuses dispersées a ainsi été formulée.

Notre second objectif a consisté à évaluer l'intérêt de la nanoémulsion de calixarène en tant que traitement d'urgence des contaminations cutanées par l'uranium. Dans un premier temps, nous avons démontré par des expérimentations *in vitro* utilisant la technique d'ultrafiltration que la nanoémulsion de calixarène est capable d'extraire rapidement les ions uranyle d'une solution aqueuse contaminée. L'étude *ex vivo* de la diffusion percutanée de l'uranium à travers des explants de peau d'oreille de porc montés en cellule de Franz a ensuite montré que l'application de la nanoémulsion de calixarène immédiatement après la contamination cutanée permet d'empêcher le passage de l'uranium à travers la peau intacte et la peau excoriée.

Nous avons donc mis au point au cours de cette thèse une forme galénique véhiculant un chélateur original de l'uranium. Ce système montre de réelles potentialités et permet d'envisager de nouvelles perspectives dans le traitement des contaminations cutanées par l'uranium.

MOTS-CLÉS

Uranium, décontamination, peau, calixarène, nanoémulsion, diffusion percutanée

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

UMR CNRS 8612 – Laboratoire de Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie
5, rue Jean Baptiste Clément
92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex

ÉCOLE DOCTORALE : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex