



**HAL**  
open science

# Pénétration et décontamination cutanée des actinides

Anissa Tazart

► **To cite this version:**

Anissa Tazart. Pénétration et décontamination cutanée des actinides. Radiochimie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1046 . tel-01537749

**HAL Id: tel-01537749**

**<https://theses.hal.science/tel-01537749>**

Submitted on 12 Jun 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N°d'ordre NNT : 2017LYSE1046

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**  
opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° EDISS 205**  
**(Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé)**

**Spécialité de doctorat : Biologie-Radiochimie-Biopharmacie**

Soutenue publiquement le 14/03/2017, par :  
**Anissa TAZRART**

**Pénétration et décontamination cutanée des  
actinides**

Devant le jury composé de :

Dr. Ansoborlo Eric (CEA)  
Dr. Dublineau Isabelle (IRSN)  
Pr. Piot Olivier (Université de Reims)  
Dr. Bérard Philippe (CEA)  
Dr. Guillot-Combe Emmanuelle (DGA)

Pr. Briançon Stéphanie (Université Lyon 1)  
Pr. Bolzinger Marie-Alexandrine (Université Lyon 1)  
Dr. Griffiths Nina (CEA)

Rapporteur  
Rapporteur  
Président du Jury  
Examineur  
Examinatrice

Directrice de thèse  
Co-directrice de thèse  
Co-encadrante



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E. PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE



## Résumé:

Les actinides sont des radioéléments émetteurs- $\alpha$  couramment manipulés par les travailleurs de l'industrie nucléaire et font partie de la menace NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique). La contamination cutanée représente une voie d'exposition majeure de ces agents radiologiques. La décontamination de la peau est donc cruciale pour empêcher une dispersion de la contamination et l'absorption systémique du contaminant par la peau. Ce travail s'est attaché à évaluer les profils de pénétration cutanée de deux actinides : l'américium et le plutonium, sous différentes formes, dans un modèle d'étude *ex vivo*, la peau d'oreille de porc. L'efficacité de décontamination de différents produits usuels a également été testée sur ce modèle, mais aussi sur un modèle *in vitro* de poudre de couche cornée bovine. Pour compléter l'étude de la décontamination, l'efficacité d'une formulation d'hydrogel de DTPA a également été testée. La détermination de la distribution de la contamination dans la peau a été réalisée à l'aide de différentes techniques d'imagerie : l'autoradiographie par émulsion, le TASTRAK ou encore l'iQID camera. Les résultats ont montré une grande différence dans les profils de pénétration et de rétention des actinides lorsqu'ils sont en solution aqueuse modérément soluble ou en solution organique dans un mélange de solvant. De plus, cette dernière forme modifie fortement la structure cutanée, menant à une forte augmentation de la pénétration cutanée. Les résultats des protocoles de décontamination montrent une efficacité égale du savon (Trait rouge®) comparé au DTPA, qui est le traitement décorporant utilisé également en décontamination. La formulation en hydrogel présente une efficacité supérieure pour le traitement de solutions organiques et met en évidence l'intérêt de développer d'autres formulations galéniques.



## **Abstract:**

Actinides are alpha-emitting radioactive elements handled by nuclear industry workers and are part of the NRBC threat (nuclear, radiological, biological, and chemical). Skin contamination represents a major exposure route for these radioelements. Skin decontamination is therefore essential to prevent any dispersion of contamination and systemic absorption through the skin. This work focused the evaluation of skin penetration behavior of two actinides: americium and plutonium, in different forms, in an *ex vivo* model, pig ear skin. The decontamination efficacy of various products was tested on this model as well as an *in vitro* model of bovine hide powder. The efficacy of a new DTPA hydrogel formulation was also tested. The localization of actinides in different skin layers was carried out using various imaging techniques: emulsion autoradiography, solid track autoradiography, TASTRAK or iQID camera. Data showed differences in penetration, retention and localization profiles of the different actinides used in moderately soluble aqueous solution or in a solvent mixture. In addition, the latter modifies skin structure that is associated with an increase in skin penetration. Radioactivity activity measurements in skin layers agreed well with distribution as shown by the different autoradiography techniques. The results of decontamination protocols showed an equal efficacy of the cleansing gel (Trait rouge®) as compared to DTPA, that is used for decorporation therapy and also for decontamination. The hydrogel formulation showed a superior efficacy for the treatment of organic solutions and demonstrates the interest for development of other pharmaceutical formulations.



## Remerciements

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien financier du CEA et de la DGA permettant de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé durant ces travaux de thèse et notamment ma directrice le Professeur Stéphanie Briançon, directrice du LAGEP UMR 5007, et ma co-directrice le Professeur Marie Alexandrine Bolzinger pour leur intérêt et leurs nombreux conseils durant la rédaction de ma thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Nina Griffiths pour son aide, son encadrement et la confiance dont elle a fait preuve à mon égard durant ces 3 années. Je tiens également à remercier chaleureusement le Docteur Jaime Angulo-Mora, directeur du LRT du CEA, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe.

J'adresse également mes sincères remerciements aux Docteurs Isabelle Dublineau et Eric Ansoberlo, le Professeur Olivier Piot d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit de thèse, ainsi que le Docteur Emmanuelle Guillot-Combe et Philippe Bérard de m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, pour leur suivi et leurs encouragements.

Je souhaite remercier toute l'équipe du LRT pour m'avoir enseigné les diverses pratiques du laboratoire et d'avoir répondu à mes nombreuses questions en particulier Agnès Moureau, Sylvie Coudert, Maxime Potier, Daniel Renaud et les Docteurs Stéphanie Lamart, Laurent Miccoli et Olivier Grémy. Un grand merci à Catherine Mahieu, sans qui je me serai noyée dans les méandres administratifs du CEA, et pour le surnom qu'elle m'a attribuée.

Je tiens à remercier le LAGEP pour m'avoir accueilli durant les débuts de ma thèse, en particulier Jocelyne Pelletier pour son soutien. Je tiens à remercier l'équipe PROSITON composée des Docteurs Florence Ménétrier, Alexandra Leiterer et Phillippe Bérard d'avoir participé à l'élaboration de ce sujet de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Philippe Moisy pour son aide précieuse sur les expérimentations d'extraction du TBP et le docteur Brian Miller pour avoir permis l'utilisation de sa technique.

Mes remerciements vont tout naturellement à ma famille qui s'est déplacée pour ma soutenance de thèse et particulièrement vers mes parents pour leur soutien tout au long de ce périple et leur patience durant les moments difficiles de la thèse. Un immense merci également à ma tata Saliha et mon tonton Salah pour leurs conseils et leurs relectures avisées !

Je remercie bien évidemment mes amis qui m'ont accompagnée durant ces 3 ans de thèse, sans toujours comprendre le sujet de ma thèse et quand elle se terminerait ... Merci pour tous les bons moments passés ensemble à me changer les idées!

Je remercie mes collègues et maintenant amies Alicia et Zoé, merci pour tous ces bons moments de shopping, sorties, repas, cinéma, salons ... entre ravagés !

Je remercie la team Doctoriales Marie, Pablo, Camille et Kévin pour ces weekends à voyager et à jouer ! Et remerciement spécial pour Nabil, le patient Zéro.

# TABLES DES MATIERES

Liste des abréviations .....	15
Liste des figures .....	19
Liste des tableaux .....	21
<b>Introduction générale .....</b>	<b>21</b>
<b>CHAPITRE I : Revue de la bibliographie .....</b>	<b>25</b>
<b>1. La peau et ses annexes : organe cible de la contamination.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1. Généralités.....</b>	<b>27</b>
<b>1.2. Structure et fonctions .....</b>	<b>27</b>
1.2.1. L'épiderme .....	28
1.2.2. Le stratum corneum: clé de la contamination.....	29
1.2.3. Le derme.....	31
1.2.4. L'hypoderme et les annexes cutanées .....	31
<b>1.3. La pénétration cutanée.....</b>	<b>32</b>
1.3.1. Généralités.....	32
1.3.2. Voie transépidermique.....	33
1.3.3. Voie des annexes .....	33
1.3.4. Cinétique de pénétration.....	33
<b>1.4. Modèles d'étude de la pénétration cutanée .....</b>	<b>34</b>
<b>2. La contamination radiologique cutanée par les actinides .....</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Mode d'exposition – généralités .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2. Les actinides : généralités .....</b>	<b>38</b>
<b>2.3. Propriétés du plutonium et de l'américium .....</b>	<b>39</b>
2.3.1. Propriétés radiologiques .....	39
2.3.2. Effets des rayonnements ionisants sur la peau .....	41
2.3.3. Propriétés Chimiques.....	43
<b>2.4. Les actinides rencontrés en milieu professionnel.....</b>	<b>47</b>
2.4.1. Sources et mode de contamination .....	47
2.4.2. Cas de contamination et données expérimentales .....	49
<b>2.5. Effets physiologiques d'une contamination aux actinides .....</b>	<b>59</b>
<b>2.6. Radioprotection - Risque radiologique.....</b>	<b>62</b>
2.6.1. Peau saine .....	63
2.6.2. Blessure .....	63
<b>3. La décontamination cutanée radiologique et nucléaire (NR).....</b>	<b>65</b>

<b>3.1. La décontamination cutanée : généralités .....</b>	<b>65</b>
3.1.1. La contamination interne, externe et l'irradiation : généralités .....	65
3.1.2. La décontamination cutanée nucléaire et radiologique (NR) : historique .....	65
3.1.3. La décontamination cutanée NR : principe général.....	66
<b>3.2. Gestion sur le terrain.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3. Protocoles et produits utilisés .....</b>	<b>69</b>
3.3.1. Les recommandations nationales et internationales .....	69
3.3.2. Les produits non spécifiques .....	71
3.3.3. Les chélateurs .....	72
3.3.4. Mesures en cas de contamination fixée.....	75
3.3.5. Mode d'action .....	76
3.3.6. Tests et efficacité des produits .....	77
<b>3.4. Procédure après la décontamination .....</b>	<b>78</b>
<b>3.5. Etudes de décontamination cutanée.....</b>	<b>79</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>82</b>
<b>Références bibliographiques: .....</b>	<b>83</b>
<b>CHAPITRE II : Matériels et méthodes .....</b>	<b>99</b>
<b>1. Préparation des explants de peaux .....</b>	<b>101</b>
<b>2. Contamination et étude de pénétration des actinides dans la peau .....</b>	<b>102</b>
<b>3. Traitement des compartiments donneur et receveur.....</b>	<b>105</b>
3.1 Analyse par radiochimie des compartiments receveurs .....	105
3.2 Détermination de l'activité des échantillons .....	107
<b>4. Traitement des échantillons de peaux : .....</b>	<b>108</b>
<b>5. Histologie des échantillons de peaux.....</b>	<b>109</b>
5.1 Autoradiographie par émulsion .....	109
5.2 Autoradiographie solide : TASTRAK.....	111
5.3 Autoradiographie digitale : The ionizing-radiation Quantum Imaging Detector ....	111
<b>6. Etude de décontamination .....</b>	<b>111</b>
6.1. Formulation de l'hydrogel.....	113
6.2. Traitement des lavages et des compresses .....	113
<b>7. Modèle <i>in vitro</i> .....</b>	<b>114</b>
<b>8. Mesures de radioprotection.....</b>	<b>115</b>

<b>CHAPITRE III : Penetration and decontamination of Americium-241 ex vivo using fresh and frozen pig skin .....</b>	<b>117</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>121</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>122</b>
<b>2. Material and methods .....</b>	<b>124</b>
2.1 Skin samples .....	124
2.2 Contamination solution.....	124
2.3 Skin contamination .....	124
2.4 Skin decontamination at 24 hours .....	125
2.5 Skin decontamination at 2 hours .....	125
2.6 Radioactivity measurements.....	126
2.7 Distribution of contamination in the skin .....	126
2.8 Statistical analysis.....	127
<b>3. Results .....</b>	<b>127</b>
<b>4. Discussion .....</b>	<b>133</b>
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>135</b>
<b>Acknowledgement .....</b>	<b>135</b>
<b>References .....</b>	<b>136</b>

<b>CHAPITRE IV : Skin absorption of actinides: influence of solvents or chelates on skin penetration ex vivo .....</b>	<b>141</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>145</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>146</b>
<b>2. Material and methods .....</b>	<b>148</b>
2.1 Skin samples .....	148
2.2 Contamination solutions .....	148
2.3 Skin contamination and penetration .....	149
2.4 Radioactivity measurements.....	150
2.5 Localization of the activity in the skin .....	150
2.6 Localization and quantification of the activity using the iQID camera.....	151
2.7 Statistical analysis.....	152
<b>3. Results .....</b>	<b>152</b>
3.1 Absorption properties of different actinide preparations.....	152

3.2	Transfer and retention of the actinide preparations in skin layers and receiver compartment.....	153
3.3	Localization of actinides in skin by imaging approaches .....	156
<b>4.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>159</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>162</b>
	<b>Acknowledgements.....</b>	<b>162</b>
	<b>References .....</b>	<b>163</b>

**CHAPITRE V : Actinide-contaminated skin: evaluating decontamination efficacy of water, gels and chelating agents in vitro and ex vivo. .... 169**

	<b>Abstract.....</b>	<b>173</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction .....</b>	<b>174</b>
<b>2.</b>	<b>Material and methods .....</b>	<b>176</b>
2.1	Pig skin and bovine hide preparation .....	176
2.2	Contamination solutions .....	176
2.3	Skin actinide binding and decontamination in vitro : bovine hide preparation.....	177
2.4	Skin actinide decontamination ex vivo : pig ear skin explant .....	177
2.5	DTPA gel formulation .....	179
2.6	Radioactivity measurements.....	179
2.7	Statistical analysis.....	180
<b>3.</b>	<b>Results .....</b>	<b>180</b>
3.1	Actinide binding to bovine hide and decontamination .....	180
3.2	Actinide binding to porcine skin and decontamination .....	182
<b>4.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>187</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>191</b>
	<b>Acknowledgement .....</b>	<b>191</b>
	<b>References .....</b>	<b>192</b>

**Discussion générale et conclusions .....** 197

<b>1.</b>	<b>Justification du modèle et choix de décontaminants.....</b>	<b>199</b>
<b>2.</b>	<b>Discussion des résultats.....</b>	<b>201</b>
<b>3.</b>	<b>Perspectives : .....</b>	<b>207</b>
	<b>Conclusions :.....</b>	<b>214</b>
	<b>Références bibliographiques : .....</b>	<b>210</b>

## **LISTE DES ABBREVIATIONS:**

3,4,3 LI(1.2-HOPO) : hydroxypyridone

AFNOR : Association française de normalisation

Am : Américium

A.M.M : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

ASN: Autorité de Sureté Nucléaire

ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

Bq: Becquerel

Ca: Calcium

CAPBP: acide carballyl amido bisphosphonique

CBMIDA: acide catechol-3,6-bis-methyliminodiacétique

CD (DC) : Compartiment donneur

CDC : Centers for Diseases Control and prevention

CEA : Commissariat à l'Énergie Atomique

CIPR (ICRP): Commission internationale de protection radiologique

CIRC : Centre international de recherche sur le cancer

Cm : Curium

CR (RC) : Compartiment receveur

Cs: Césium

CWA: Chemical Warfare Agent

DGS: Direction Générale de la Santé

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DTPA : acide diéthylène triamine penta acétique

ED : Epiderme + derme

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

EHBP (HEDP): acide éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate

EPA : Environmental Protection Agency

EtOH : Ethanol

Eu: Europium

FDA: Food and drug administration

Gd: Gadolinium

HCl: Acide chlorhydrique

HF: Acide fluorhydrique

HNO<sub>3</sub>: Acide nitrique

IND: Improvised nuclear devices

iQID: ionizing-radiation quantum imaging detector

I.V: Intraveineuse

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire

KOH : Hydroxyde de potassium

MOX: Oxyde mixte (Mixed Oxyde fuel) (U,Pu)O<sub>2</sub>

NaCl: Chlorure de sodium

NCRP: National Council on Radiation Protection & Measurements

NIST: National Institute of Standards and Technology

Np: Neptunium

NRBC (CBRN): Nucléaire, radiologique biologique et chimique

OCDE (OECD): Organisation de Coopération et de Développement Économiques

ORSAN: Organisation de la réponse du système de santé en situations sanitaires exceptionnelles

PIE (= TEWL): Perte Insensible en Eau

Pu: Plutonium

PUREX: Plutonium Uranium Redox Extraction

RDD: Radiological Dispersion Device

SC: Stratum corneum

SGDSN: Secrétariat Général de la Défense et de la Sécurité Nationale

SPR: Service de Protection contre les Rayonnements

Sr: Strontium

TBP: Tributylphosphate

Th: Thorium

U: Uranium

USTUR: U.S. Transuranium and Uranium Registries



## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

<b>Figure 1:</b> Coupe schématique de la structure de la peau .....	27
<b>Figure 2:</b> Schéma représentant le renouvellement de l'épiderme .....	28
<b>Figure 3:</b> Schéma représentatif de la structure et fonction du <i>stratum corneum</i> .....	30
<b>Figure 4:</b> Représentation des voies de pénétration cutanée.....	32
<b>Figure 5:</b> Schéma de la cellule de Franz .....	34
<b>Figure 6:</b> Synthèse de la fréquence des voies de contamination entre 1970 et 2003 .....	37
<b>Figure 7:</b> Schéma simplifié de la fission nucléaire de l'uranium .....	38
<b>Figure 8:</b> Les principaux types des rayonnements ionisants émis par les actinides.....	40
<b>Figure 9:</b> Schéma illustrant la capacité de pénétration des types de rayonnements.....	41
<b>Figure 10:</b> Trajet des rayonnements ionisants dans la peau .....	43
<b>Figure 11:</b> Diagramme de Pourbaix du Pu (A) et de l'Am (B) en milieu aqueux .....	45
<b>Figure 12:</b> Schéma représentant différents moyen d'extraction du combustible usagé.....	48
<b>Figure 13:</b> Photographie obtenue par $\gamma$ caméra du foie à trois intensités (A) et répartition de l'activité de l'Am sur le visage (B) .....	60
<b>Figure 14:</b> Images de la peau d'un témoin (A) et du patient contaminé (B,C,D).....	61
<b>Figure 15:</b> Schéma illustrant le principe de marche avant .....	67
<b>Figure 16:</b> Procédure de déshabillage et de traitement d'une victime debout .....	68
<b>Figure 17:</b> Schéma des décontaminants à utiliser en fonction du scénario de contamination	71
<b>Figure 18:</b> Structure du DTPA .....	72
<b>Figure 19:</b> Structure du 3,4,3-LI(1,2-HOPO).....	74
<b>Figure 20:</b> Structure de l'EHBP .....	74
<b>Figure 21:</b> Cas de contamination cutanée et d'exérèse .....	76
<b>Figure 22:</b> Mode d'action du savon et des chélateurs .....	76
<b>Figure 23:</b> Recommandations pour évaluer la dose et la contamination résiduelle cutanée... 78	

### CHAPITRE II

<b>Figure 1:</b> Etapes de préparation des explants de peau .....	102
<b>Figure 2:</b> Cellule de Franz (A) et dispositif <i>ex vivo</i> et cellule de Franz (B).....	103
<b>Figure 3:</b> Schéma du protocole de traitement des compartiments de la cellule de Franz .....	105
<b>Figure 4:</b> Spectre d'émission d'un filtre contenant de l'Américium .....	107
<b>Figure 5:</b> Schéma du protocole de traitement des explants de peau.....	108

<b>Figure 6:</b> Schéma du protocole de décontamination par lavage simple.....	112
<b>Figure 7:</b> Schéma du protocole de décontamination par lavage et frottements .....	112
<b>Figure 8:</b> Schéma du protocole de décontamination de la poudre de couche cornée bovine	114

### CHAPITRE III

<b>Figure 1:</b> Diagram representing the skin decontamination procedure.....	125
<b>Figure 2:</b> Activity recovered in the different compartments after exposure of skin samples with <sup>241</sup> Am during 24 h. ....	127
<b>Figure 3:</b> Effect of successive washes of Am-contaminated skin with water or DTPA .....	128
<b>Figure 4:</b> Skin-associated Am activity in fresh or frozen samples after water or DTPA.....	129
<b>Figure 5:</b> Activity recovered in the skin following decontamination using compresses at 2 hours after <sup>241</sup> Am contamination.....	131
<b>Figure 6:</b> Autoradiographs of skin after water or DTPA washes.....	132

### CHAPITRE IV

<b>Figure 1:</b> Total skin absorption of Am or Pu – different behaviour from different forms....	152
<b>Figure 2:</b> Distribution of activity recovered in the different compartments at 24 h after contamination with different actinide forms. ....	153
<b>Figure 3:</b> Localisation in the skin of activity after contamination with different actinide forms.....	157
<b>Figure 4:</b> Comparison of americium distribution in the skin using three techniques .....	158

### CHAPITRE V

<b>Figure 1:</b> Hide decontamination protocol ( <i>in vitro</i> ) .....	177
<b>Figure 2:</b> <i>ex vivo</i> decontamination protocol using porcine skin.....	178
<b>Figure 3:</b> Time course of Am, Pu or Pu-TBP binding to hide. ....	181
<b>Figure 4:</b> Decontamination of Am, Pu or Pu-TBP from hide. ....	181
<b>Figure 5:</b> Decontamination of Am in the different skin layers at 2 H .....	183
<b>Figure 6:</b> Decontamination of Pu in the different skin layers at 2 H .....	184
<b>Figure 7:</b> Decontamination efficacy of various products after Pu-TBP contamination .....	184
<b>Figure 8:</b> Receptor fluid activity after skin contamination with Pu-TBP . ....	185
<b>Figure 9:</b> Actinide recovery after decontamination of skin using a gel containing DTPA in comparison with Osmogel.....	186

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

<b>Tableau I:</b> Caractéristiques nucléaires des principaux isotopes du plutonium et de l'américium .....	40
<b>Tableau II:</b> Résumé des effets déterministes et stochastiques cutanés.....	42
<b>Tableau III:</b> Résumé des études d'absorption percutanée du plutonium et de l'américium...50	
<b>Tableau IV:</b> Résumé des études d'une contamination sur peau saine de l'Am ou du Pu.....	53
<b>Tableau V:</b> Résumé des études de contamination sur peau lésée ou blessure de l'Am ou du Pu.....	58
<b>Tableau VI:</b> Recommandations nationales et internationales des protocoles de décontamination cutanée des radioéléments .....	70

### CHAPITRE II

<b>Tableau I:</b> Préparation des solutions d'actinides .....	104
<b>Tableau II:</b> Protocole de déparaffinage des échantillons en paraffine .....	109
<b>Tableau III:</b> Protocole de révélation d'autoradiographie par émulsion.....	110
<b>Tableau IV:</b> Protocole de la coloration à l'Hématoxyline de Harris et l'éosine.....	110

### CHAPITRE III

<b>Table I:</b> Percentage of activity recovered in the washes using compresses (W), the cotton swab and the drying swab after decontamination. ....	130
--	-----

### CHAPITRE IV

<b>Table I:</b> Preparation of the actinide solutions.....	149
<b>Table II:</b> Retention and transfer of the different actinide forms in each compartment.....	155
<b>Table III:</b> The amount of actinides found in each compartment. ....	156

### CHAPITRE V

<b>Table I:</b> Comparison of the decontamination efficacies of different products following skin contamination with Am, Pu and Pu-TBP.....	187
---	-----



## Introduction générale

Les accidents de Tchernobyl et Fukushima ont rappelé la nécessité d'accroître les capacités de protection sanitaire pour les travailleurs de l'industrie nucléaire exposés, les primo-intervenants et les membres du public dans les conditions d'un accident de grande ampleur. Avec l'inhalation, la contamination radiologique cutanée est l'un des risques les plus probables lors d'un acte malveillant. La gestion des déchets contaminés, une éventuelle pénurie d'eau ou la contamination de l'eau sont également des problématiques majeures. En effet, en cas de contamination, l'eau (savonneuse idéalement) est le premier moyen de décontamination utilisé du fait de son accessibilité. Il existe par conséquent de forts enjeux pour le développement de nouvelles procédures de décontamination et de produits anhydres et/ou ne nécessitant pas de rinçage.

Les actinides représentent une famille d'éléments principalement émetteurs- $\alpha$ , aux propriétés physico-chimiques voisines, et essentiellement présents dans l'aval du cycle du combustible et l'amont (Mox). Une contamination cutanée par ces derniers peut conduire à une forte exposition interne des individus après transfert des actinides par inhalation, ingestion ou par la peau contaminée vers la circulation sanguine. Après diffusion dans l'organisme à travers une peau saine ou une blessure, une partie des actinides est distribuée aux organes de rétention tels que l'os ou le foie, et l'autre partie est excrétée par la voie urinaire ou les fèces. Il existe deux types de toxicité dans le cas des radioéléments : la toxicité chimique et la toxicité radiologique. Cette dernière reste la plus préoccupante en fonction du type de rayonnement émis par l'élément ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Dans le cadre industriel, le traitement actuel d'une contamination cutanée sur peau saine par les actinides débute par un simple rinçage à l'eau qui peut être réalisé sur le lieu de l'accident. Si une contamination résiduelle subsiste ou en cas de plaie contaminée, la victime est transférée au service médical où est administré un chélateur l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) recommandé par l'Autorité de Sûreté Nucléaire Française (ASN), visant à complexer le contaminant afin d'accélérer son excrétion. Dans le cadre d'un événement de plus grande ampleur, des protocoles définis par l'ASN sont à appliquer avec différentes zones de triages de victimes.

Dans ces travaux de thèse, l'objectif a consisté dans un premier temps à étudier la pénétration cutanée du plutonium et de l'américium dans différentes conditions pour ensuite réaliser des tests de décontamination. Les cinétiques de pénétration des actinides ainsi que leur distribution dans le tissu ont été évaluées *ex vivo* en utilisant un modèle d'explants de peau

d'oreille de porc en cellule de diffusion. Ce modèle a été choisi du fait que la peau de porc est la plus représentative de la peau humaine, qu'il est recommandé par l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) et qu'il représente une alternative à l'expérimentation *in vivo*. Une technique *in vitro* a également été utilisée pour des tests de décontamination utilisant de la poudre de couche cornée. Ces expériences préliminaires ont permis d'établir un protocole de décontamination pour tester différents produits. Une formulation galénique de type hydrogel contenant un chélateur a également été réalisée et sa capacité de décontamination testée à l'aide du protocole établi. La distribution des contaminants dans la peau a été étudiée par différentes techniques d'histologie et d'imagerie.

Ce manuscrit de thèse se compose des parties suivantes :

Le chapitre I basé sur la revue de la bibliographie présentera tout d'abord la structure et les fonctions de la peau. Les risques et cas d'exposition engendrés par une contamination cutanée par les actinides tels que l'américium et le plutonium ainsi que les différents produits utilisés lors de la procédure de décontamination seront exposés.

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 II présente les principales techniques d'analyses utilisées. Chaque technique sera de nouveau expliquée sommairement dans chaque chapitre.
- Dans le chapitre III, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'étude de la pénétration et de la localisation cutanée du nitrate d'américium. L'influence de la viabilité de la peau a été étudiée par comparaison des modèles peau congelée/peau viable afin de mettre en évidence d'éventuels mécanismes actifs de pénétration
- Le chapitre IV est consacré à l'étude de pénétration de solution d'actinides (nitrate d'Am et de Pu) sous différentes formes (aqueuse, organique) ainsi qu'à l'étude de la localisation et la modification de la structure cutanée en fonction de ces conditions.
- Dans le chapitre V, l'efficacité de décontamination d'une sélection de produits a été évaluée sur différentes solutions d'actinides (Nitrate d'Am, Pu et Pu-TBP), *in vitro* sur de la couche cornée bovine et *ex vivo* sur des explants de peau saine d'oreille de porc.

Finalement, une discussion générale et une conclusion de l'ensemble des résultats obtenus seront présentées et les perspectives pouvant être envisagées pour la poursuite de ce travail seront exposées.

# **CHAPITRE I**

---

## **Revue de la bibliographie**

---



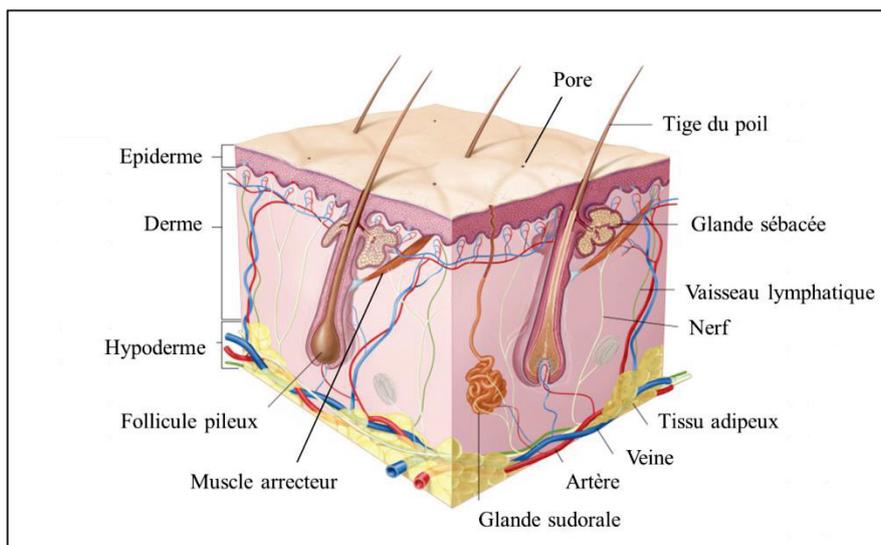
## 1. La peau et ses annexes : organe cible de la contamination

### 1.1. Généralités

La peau est considérée comme l'un des organes le plus étendu du corps humain avec une surface d'environ  $2\text{m}^2$  avec un pH acide variant de 4,5 à 5,5. De par l'importance de sa surface, la peau est directement exposée au milieu extérieur. Un de ses rôles essentiels est d'assurer la protection de l'organisme vis-à-vis des agressions chimiques, biologiques et physiques (UV, microorganismes, allergènes...). Au niveau métabolique, elle va permettre la thermorégulation, l'homéostasie, la régulation de la pression artérielle, l'élimination de déchets par la sueur ou encore la synthèse de la vitamine D. (Crickx et al., 2005). La peau fonctionne également comme un organe sensoriel important dans le contact avec l'environnement, la détection de stimuli (température, pression, douleur). Bien que la peau soit souvent l'organe le plus exposé à une contamination, elle représente une barrière efficace à la pénétration de nombreux composés. Les mécanismes par lesquels des composés peuvent passer la barrière cutanée sont abordés plus loin dans ce chapitre (§1.3)

### 1.2. Structure et fonctions

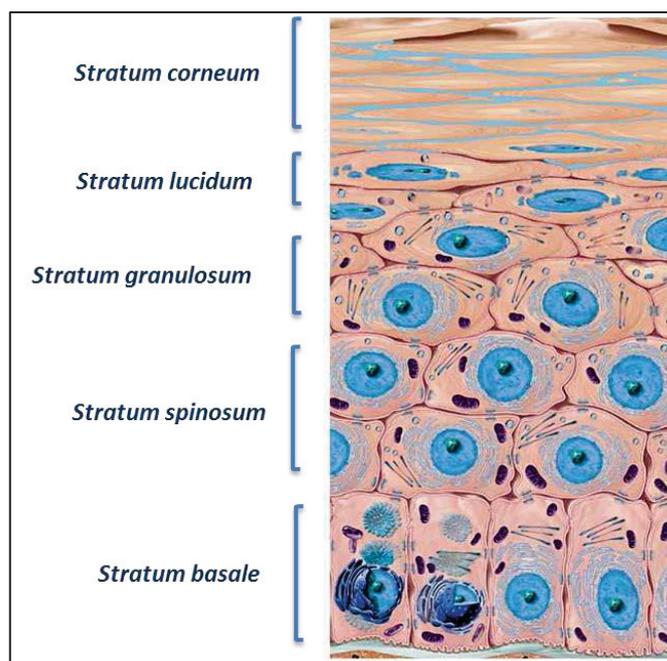
La peau est un tissu complexe constitué de trois couches différentes de la surface vers la profondeur du corps : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1). La peau est également constituée d'annexes comme les glandes sébacées, souvent associées aux poils ou aux cheveux, ou encore les glandes sudoripares. Cette partie décrit succinctement la structure ainsi que les caractéristiques de ces différentes couches cutanées.



**Figure 1:** Coupe schématique de la structure de la peau (adapté de Pubmed Health)

### 1.2.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié et constitué de multicouches qui varient en fonction de la partie du corps (0.06 mm pour les paupières à 0.8 mm sur la paume de la main). De nombreux types cellulaires vont se répartir dans ces couches du *stratum basale* en profondeur au *stratum corneum* (ou couche cornée) à la surface (Figure 2). Ce tissu n'étant pas vascularisé, les cellules épidermiques vont donc puiser leurs nutriments et éliminer leurs déchets dans les couches plus profondes (derme).



**Figure 2:** Schéma représentant le renouvellement de l'épiderme (adapté d'Eucerin.fr)

Les cellules vont perdre leur viabilité avec l'augmentation de la distance à partir de la couche basale. L'épiderme viable et les structures dermiques ne participent que très modérément à la fonction barrière de la peau contrairement au *stratum corneum* (Martini, 2003). L'épiderme est en constant renouvellement, du fait de la desquamation par la formation d'une nouvelle couche de kératinocytes au niveau du *stratum basale*, qui va conduire à la perte du noyau et des organites des kératinocytes pour former les cornéocytes du *stratum corneum*. Ainsi, la structure des cellules de l'épiderme va changer depuis le *stratum basale*, à travers le *stratum spinosum*, le *stratum granulosum*, le *stratum lucidum* jusqu'à la couche la plus externe qui est la couche cornée (Benson et Watkinson, 2012).

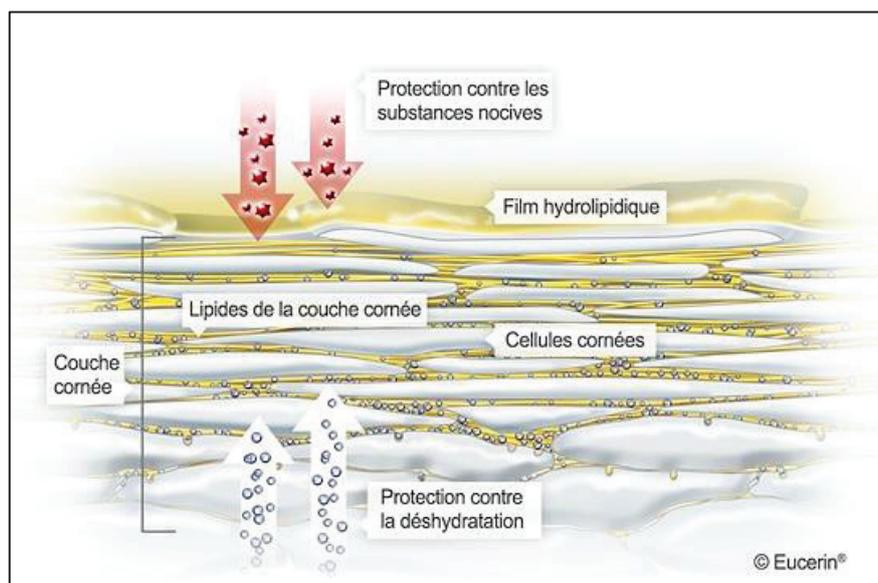
Le *stratum basale* contient les cellules de Langerhans, les mélanocytes, les cellules de Merkel et les kératinocytes, qui synthétisent la kératine assurant l'imperméabilité de la peau. Ce sont ces dernières qui vont subir différentes étapes de différenciations afin de former les cornéocytes du *stratum corneum*. C'est dans la couche supérieure, le *stratum spinosum*, que la morphologie des kératinocytes va évoluer, ils vont devenir polygonaux tandis que leur noyau va s'arrondir (Figure 2). Ils vont continuer leur différenciation dans le *stratum granulosum* par l'apparition de granules dans le cytoplasme. Finalement, il va progressivement s'organiser la perte de noyau et des organelles, l'augmentation du taux en kératine et la compaction des cellules dans le *stratum lucidum* (Crickx et al., 2005). C'est cette étape qui va donner les cornéocytes matures. Ce renouvellement varie en fonction de l'endroit sur le corps et de l'espèce mais correspond à un temps moyen de 2 à 3 semaines chez l'homme (Reddy et al., 2000 ; Hoath et al., 2003 ; Martini, 2006).

Les autres types cellulaires de l'épiderme sont impliqués dans différentes fonctions physiologiques. Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques, issues des cellules souches de la moelle osseuse, qui initient et propagent la réponse immunitaire. Après contact avec un antigène, elles vont migrer jusqu'aux nœuds lymphatiques présents dans le derme, contenant les lymphocytes T qui vont générer une réponse immunitaire adaptée. Elles sont impliquées dans différentes pathologies notamment les allergies. Les mélanocytes vont produire la mélanine, assurant la pigmentation cutanée, des poils et cheveux. Sa principale fonction est la protection contre les rayonnements UV en empêchant la formation de radicaux libres oxydants. Les cellules de Merkel sont associées aux terminaisons nerveuses et ont donc un rôle majeur dans la sensation cutanée.

### 1.2.2. *Le stratum corneum: clé de la contamination*

Le *stratum corneum* (SC) ou couche cornée représente la première couche superficielle de l'épiderme d'une faible épaisseur (20  $\mu\text{m}$  environ de 10 à 15 couches cellulaires en profondeur), qui varie en fonction de la région anatomique. Néanmoins, elle constitue la barrière primaire de la peau régulant majoritairement la pénétration cutanée (Figure 3). Le *stratum corneum* a été décrit comme un mur de « briques » (Rougier et al., 1985; Harding, 2004). En effet, il est composé de cellules appelées cornéocytes, imbriquées au sein d'une matrice lipidique agissant comme un ciment entre chaque cellule (Bjorklund et al., 2013). Ces dernières sont issues de la migration et la différenciation, de la profondeur vers l'extérieur de la peau, d'autres cellules qui sont les kératinocytes.

Les cornéocytes sont dépourvus de noyau et aplaties de par leur nature hydrophile liée à leur contenu en kératine (70 à 80 %) et en lipides (10%) (Benson et Watkinson, 2012). Leur enveloppe cellulaire est également constituée de deux parties : une enveloppe lipidique et une enveloppe protéique, composée de protéines structurales comme l'involucrine, la lorucrine et des filaments intermédiaires.



**Figure 3:** Schéma représentatif de la structure et fonction du *stratum corneum* (Eucerin.fr)

Les composants majeurs de la matrice lipidique, dans laquelle sont maintenues les cornéocytes, sont des céramides, des acides gras, du cholestérol, des sulfates et esters de cholestérol (Weerheim et Ponc, 2001). Dans le *stratum corneum* humain, 9 classes de céramides ont été identifiées. Cependant, avec la découverte et la diversité des techniques d'analyses, de nouveaux types de céramides sont identifiés régulièrement (Wartewig et al., 2007; Bjorklund et al., 2013). La composition et l'arrangement structural en lamelle de ces lipides intercellulaires est essentielle à la fonction de barrière du *stratum corneum*.

Cette couche joue donc un rôle clé car elle représente la première barrière à un contaminant mais elle peut également servir de réservoir (Teichmann et al., 2005). En effet, un contaminant peut s'y fixer aisément (selon sa forme physico-chimique) pour potentiellement diffuser progressivement vers les couches inférieures, tant que la quantité de substance est supérieure à celle contenue dans l'épiderme.

Ce phénomène de diffusion peut continuer jusqu'à ce que le stock du réservoir soit épuisé par diffusion ou par desquamation. Il est également supposé qu'elle joue un rôle de tamis et que seules les particules de taille inférieure ou égale à 50  $\mu\text{m}$  pénètrent dans le *stratum corneum* (Tymen, 2002a). Cependant, cette propriété reste très controversée du fait que différentes études montrent soit une forte pénétration ou soit le contraire sur une peau de porc ou de souris *in vivo* et *in vitro* (Magnusson et al., 2004; Schneider et al., 2009; Desai et al., 2010)

### 1.2.3. *Le derme*

Le derme est un tissu conjonctif de 2 à 5 mm d'épaisseur habituellement lâche en périphérie et plus dense (fibreuse) en profondeur (Schaefer et al., 1996). Il est composé de fibres de collagène et de fibres élastiques, synthétisées par les fibroblastes. Il renferme également une grande diversité de cellules comme les mastocytes, impliquées dans la réponse immunitaire et inflammatoire, et les mélanocytes. Le derme contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que diverses annexes cutanées se prolongeant dans l'épiderme. Ce réseau extrêmement vascularisé va assurer la régulation de la température corporelle, l'apport d'oxygène et de nutriments aux cellules ainsi que l'élimination des déchets. C'est également grâce à ce système que vont pouvoir diffuser différentes substances comme des médicaments afin d'arriver à la circulation systémique. Le derme contient aussi un réseau nerveux d'une grande diversité, de l'ordre de 10 000 fibres nerveuses par  $\text{mm}^2$  (Agache, 2000). Elles font de la peau un organe sensoriel majeur sensible au toucher, à la chaleur, à la pression et à la douleur.

### 1.2.4. *L'hypoderme et les annexes cutanées*

L'hypoderme est un tissu sous cutané très innervé et vascularisé, constitué d'une couche de cellules graisseuses, les adipocytes, arrangées en lobules interconnectés avec du collagène et des fibres élastiques (Schaefer et al., 1996). Les vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que les nerfs sont reliés à la peau par l'hypoderme, parcourent le derme et s'arrêtent sous la jonction dermo-épidermique. De ce fait, il assure différentes fonctions dont la survie des cellules à travers la peau, l'isolation thermique du corps, la perception et les sensations.

Il existe trois types d'appendices dans la peau : le follicule pileux, les glandes sébacées associées à ce dernier et les glandes sudoripares. Les glandes sébacées vont sécréter le sébum, permettant une lubrification et le maintien du pH acide (Crickx et al., 2005).

Le muscle arrecteur relié au follicule pileux va lui permettre de répondre par exemple à un changement de température. De nombreuses cellules souches sont localisées tout le long du follicule pileux, sensibles aux rayonnements ionisants. La sécrétion de sueur par les glandes sudoripares s'effectuera en cas de changements environnementaux (stress, température...).

### 1.3. La pénétration cutanée

#### 1.3.1. Généralités

Ce processus est décrit comme le passage d'une substance à travers la peau depuis le milieu extérieur. Il peut être scindé en deux événements successifs : une pénétration au sein de la peau, suivie d'une absorption systémique ou lymphatique depuis le derme profond. Un contaminant externe peut diffuser à travers la peau au moyen de trois voies distinctes (Figure 4): à travers les espaces intercellulaires du *stratum corneum*, à travers les cornéocytes elles-mêmes et à travers les annexes cutanées (follicules pilo-sébacés et/ou glandes sudoripares). Ces voies ne s'excluant pas mutuellement, un contaminant pourra donc passer à la fois par la voie transépidermique et par la voie des annexes (Agache, 2000 ; Benson et Watkinson, 2012). Différents facteurs peuvent influencer sur la pénétration cutanée comme les pathologies cutanées, l'âge ou le sexe.

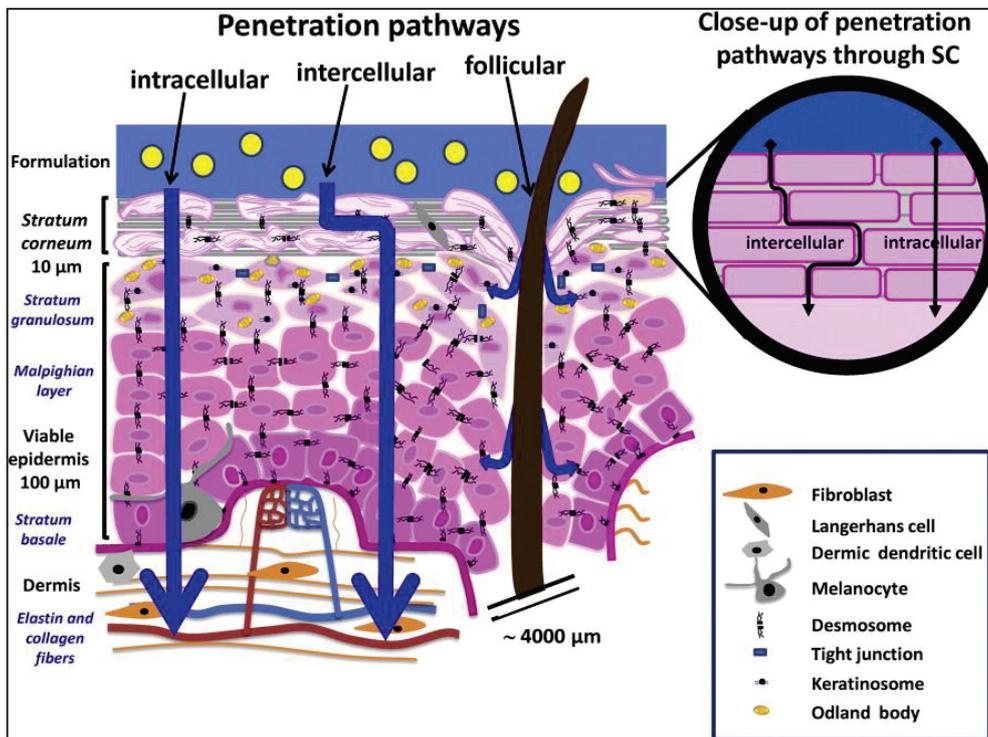


Figure 4: Représentation des voies de pénétration cutanée (Bolzinger et al., 2012)

### 1.3.2. Voie transépidermique

La voie transcellulaire (ou intracellulaire) a été considérée jusqu'à récemment comme la voie de diffusion majoritaire à travers la couche cornée. Cependant, elle exige une alternance entre les cornéocytes polaires par leur contenu en kératine et les espaces intercellulaires apolaires les entourant. De ce fait, il est maintenant admis que le transport à travers la couche cornée s'effectue principalement par voie intercellulaire, qui reste un chemin sinueux (Benson et Watkinson, 2012). Ces espaces intercellulaires ont une surface assez faible mais les lipides intercellulaires arrangés en bicouches délimitent des espaces hydrophobes et hydrophiles. Les molécules polaires se dirigent vers les régions « hydrophiles » des couches lipidiques intercellulaires, alors que les régions « hydrophobes » de ces mêmes chaînes permettraient la diffusion des molécules moins polaires (Martini, 2003 ; Bolzinger et al., 2011).

### 1.3.3. Voie des annexes

Les annexes cutanées ont été considérées comme des voies ayant une faible résistance à la pénétration cutanée. Cependant, leur rôle comme voie de pénétration est contesté. En effet, elles représentent 0.1 à 1% de la superficie totale de la surface de la peau. De plus, il s'avère que la sécrétion de sueur va limiter la migration d'une substance vers l'intérieur de la glande (Farina, 1991 ; Wilke et al., 2006). De ce fait, on suppose que ces voies jouent majoritairement un rôle dans la pénétration des molécules peu diffusibles et des nanoparticules à travers la couche cornée (Lademann et al., 2006; Desai et al., 2010)

### 1.3.4. Cinétique de pénétration

La cinétique de pénétration d'une substance est décrite en trois temps. La substance se sépare de son véhicule (solution aqueuse) et gagne l'environnement cutané. Cette étape dépend de l'affinité de la substance (lipophile ou non) avec les lipides du *stratum corneum*. Une fois au sein du *stratum corneum*, le contaminant va diffuser selon une concentration décroissante vers les couches les plus profondes (Agache, 2000). Et enfin, la molécule va passer dans le tissu vivant. Après une phase d'amorçage, ce flux atteint un maximum qui se maintient tant que la molécule reste en quantité suffisante à la surface de peau. Lorsque cet équilibre est atteint, la diffusion est réglée par la loi de Fick (Martini, 2006) :  $J = Kp.S. \Delta C$  avec :

$J$  = quantité de substance absorbée par unité de temps ( $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )

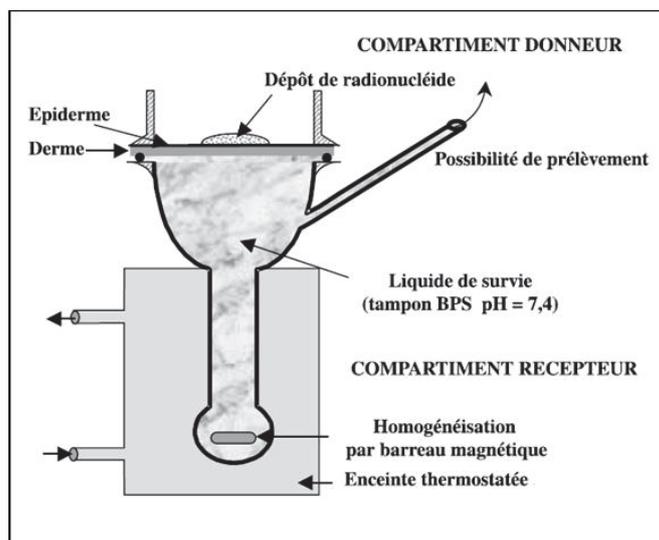
$Kp$  = constante de perméabilité de la molécule en  $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$

$S$  = surface de la membrane en  $\text{cm}^2$

$\Delta C$  = différence de concentration de la substance de part et d'autre du SC ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )

#### 1.4. Modèles d'étude de la pénétration cutanée

Plusieurs approches sont alors possibles pour l'étude de la pénétration et la décontamination : l'approche *ex vivo*, au moyen d'explants cutanés d'origine animale ou humaine, l'approche *in vitro*, utilisant de la poudre de couche cornée, et enfin l'approche *in vivo*, menée directement chez l'animal ou chez l'homme. Afin d'étudier la pénétration et la décontamination cutanée, différentes voies s'appliquent. Dans le cas de contaminant radioactif, l'expérimentation *in vivo* a longuement été utilisée avec pour modèle le chien « Beagle » (Polig, 1989 ; Luciani et al., 2006) ou le rat (Sprague Dawley) (Bauerová et al., 2001 ; Petitot et al., 2007; Griffiths et al., 2014 a,b). Ces méthodes permettent une évaluation réaliste de la cinétique d'absorption dans le système sanguin ainsi que le métabolisme post absorption. Cependant, il existe un biais du fait de la différence de structure et physiologie entre l'homme et les espèces utilisées dans ces études.



**Figure 5:** Schéma de la cellule de Franz (Tymen, 2002b)

Aujourd'hui, la pénétration transcutanée des actinides, comme le plutonium et l'américium, n'est pas totalement connue principalement en raison de la complexité de leur spéciation et la grande variabilité de la peau entre les différents individus (Hostynek, 2003). Les structures impliquées dans la diffusion ne sont également pas connues mais les radioéléments sont retrouvés dans le milieu intracellulaire (Gorman-Lewis et al., 2011; Jensen et al, 2012).

Cependant, le mécanisme ainsi que les molécules (protéines, lipides ...) impliquées dans la translocation du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire ne sont toujours pas connus.

Actuellement, les études de pénétration sont recommandées sur des explants de peau *ex vivo* en cellule de diffusion (OCDE n°428, 2004). Cette méthode a souvent été utilisée afin de déterminer l'absorption percutanée des cosmétiques, des médicaments ou des radioéléments. En effet, la cellule de Franz (Figure 5) permet de mesurer la cinétique de pénétration et la distribution de substances exogènes à travers les différentes couches de la barrière cutanée. Un explant cutané de peau est placé entre le compartiment donneur à l'air libre et le compartiment receveur, contenant un tampon isotonique à pH neutre (Figure 5). La compression de la peau à l'aide d'une pince va permettre l'étanchéité du système. La solution du compartiment récepteur peut être prélevée afin de doser la substance ayant traversé la peau. Le dosage permet de déterminer la quantité de molécules ayant traversé la peau et donc le flux de diffusion (% d'activité.h<sup>-1</sup>) (Bolzinger et al., 2010).

C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser cette technique comme modèle d'étude, avec de la peau porcine. Cette dernière, par sa structure et physiologie, est décrite comme le modèle le plus représentatif de la peau humaine (Herkenne et al., 2006; Jacobi et al., 2007; Simon et Maibach, 2000; Tfaili et al., 2012; Jung et Maibach, 2015). En effet, les deux sont similaires du point de vue de leur structure, physiologie et immunologie (Barbero et Frasch, 2009 ; Summerfield et al., 2015). La différence majeure se trouve au niveau du système d'excrétion, principalement de type eccrine chez l'homme et apocrine chez le porc (Mannis et Brandl, 2015). L'utilisation de cette méthode permet d'évaluer la pénétration ainsi que la décontamination cutanée dans des conditions expérimentales reproductibles (OCDE n°428, 2004; Bolzinger et al., 2010 ; Rolland et al., 2013 ; Salerno et al., 2016). La technique de la cellule de Franz a été utilisée dans différentes études sur les actinides ou d'autres radioéléments (Tymen et al., 2000a ; Spagnul et al., 2011 ; Grives et al., 2015). Elle permet de remplir différents objectifs correspondant à notre étude sur les actinides: l'évaluation de la fixation dans les tissus cutanés, la cinétique de pénétration à travers la peau, la décontamination ainsi que leurs différents effets biologiques. Sur un autre volet, elle permet d'évaluer les effets radiologiques par la dosimétrie cutanée (Tran Minh et al., 1999).

Des études *in vitro*, utilisant le *stratum corneum* en tube, ont également été réalisées (Tymen, 2002a). Dans ces travaux, les modalités de fixation du césium et du cobalt à une poudre de couche cornée, issue de cabinet de podologie, ont été évaluées. La variation de temps de

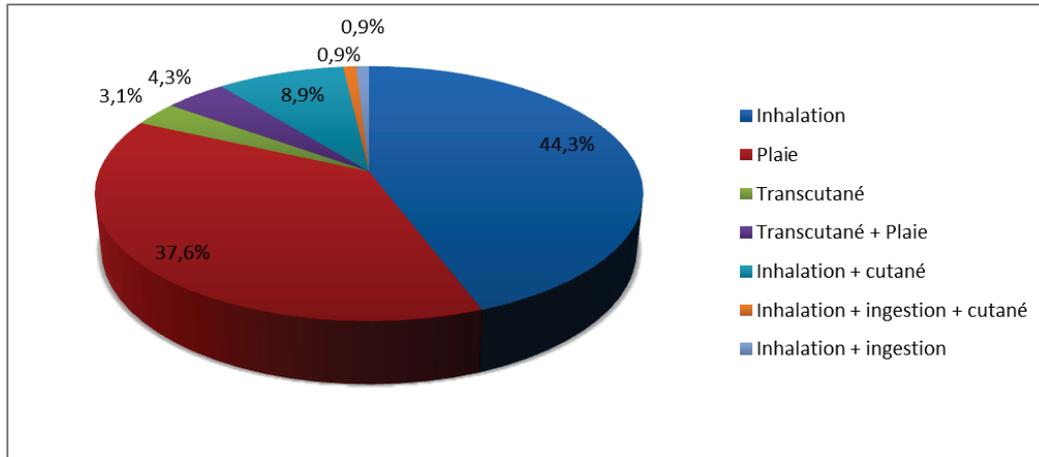
contact du radioélément avec la poudre a permis d'évaluer le temps d'apparition de l'équilibre de répartition. Lorsque l'équilibre est atteint (activité constante fixée), le rapport de la quantité retenue par la couche cornée et celle restée dans la solution est calculé.

Cette technique permet uniquement une approche primaire du fait du système simplifié du modèle mais reste intéressante en tant que prélude d'études de décontamination et de pénétration *in vivo* ou *ex vivo*. Cette technique sera donc également abordée dans nos travaux de décontamination et d'évaluation de la cinétique de fixation de l'américium et du plutonium.

## **2. La contamination radiologique cutanée par les actinides**

### **2.1. Mode d'exposition – généralités**

Une contamination d'origine nucléaire ou radiologique (NR) peut survenir selon différentes voies d'incorporation de radioéléments comme les actinides (inhalation, ingestion, blessure, contamination cutanée). L'exposition à ces agents radioactifs peut être d'origine naturelle, industrielle ou terroriste (acte de malveillance) et peut ainsi toucher les travailleurs et les membres du public. En France, une partie de ces incidents de contamination ont été recensés dans le rapport CEA-R-6097 : « Exposition aux actinides : bilan des injections de Ca-DTPA dans les centres CEA-COGEMA », exposant 548 cas des centres CEA-AREVA entre 1970 et 2003 (Grappin et al., 2007). D'après ce rapport, la contamination des actinides par voie cutanée en présence ou non de blessure constitue la première voie de contamination avec 53,8% des cas, suivie par l'inhalation représentant 39,5% des cas (Figure 6). Le cas de la peau saine représente environ 17% de ces cas de contamination recensés. Aux États-Unis, il existe un registre dénommé U.S. Transuranium and Uranium Registries (USTUR) permettant de recenser et d'évaluer les effets sur la santé, les causes de la mort et l'espérance de vie des anciens travailleurs nucléaires. Ce recensement s'effectue par ces derniers qui ont documenté les contaminations accidentelles d'uranium et les éléments transuraniens au cours des années.



**Figure 6:** Synthèse de la fréquence des voies de contamination entre 1970 et 2003 dans les centres CEA-AREVA (adapté de Grappin et al., 2007)

Des incidents en laboratoire, en industrie ou la perte de sources radioactives (Métivier, 2006) sont des événements plus probables et plus fréquents que les accidents de grande ampleur comme celui de Tchernobyl. En effet, la fréquente manipulation d'actinides tel que le plutonium par les travailleurs de l'industrie a entraîné différents cas de contamination comme à Hanford (1985), Mayak (1948-1992) ou encore plus récemment à Marcoule (Laroche et al., 2010). De ce fait, il existe un suivi régulier pour les travailleurs du nucléaire qui sont protégés par différentes règles et mesures de radioprotection notamment par le suivi de la dose reçue (sur 50 ans).

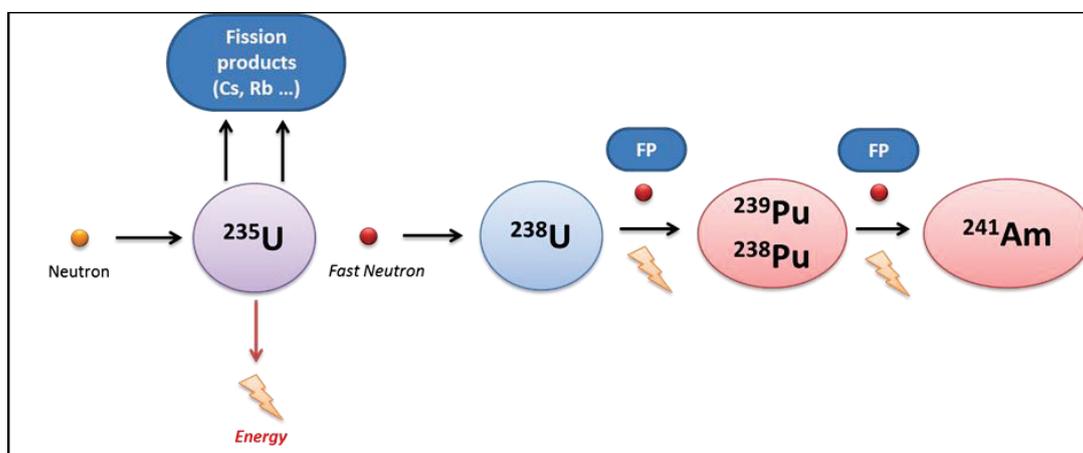
L'éventualité d'un acte malveillant utilisant des radioéléments est prise en considération depuis les attentats du 11 septembre 2001 (Buisson et al., 2004) et plus récemment les attentats du 13 novembre 2015. Cette préoccupation a été récemment évoquée lors du Nuclear Summit 2016 par le président Obama : "There is no doubt that if these madmen ever got their hands on a nuclear bomb or nuclear material they most certainly would use it to kill as many innocent people as possible". De ce fait, une liste répertoriant un certain nombre de radioéléments, dont l'américium et le plutonium, pouvant être utilisés en tant qu'élément radiologique dispersible a été établie, appelés RDD (Radiological Dispersion Device) ou IND (Improvised Nuclear Device).

Dans l'éventualité de survenue de ces événements, différents plans de protection nationaux ont été mis en place. Le plan Vigipirate, instauré en 1978, permet de répondre aux risques NBRC au travers de ses trois volets : le plan Biotox, Piratox et le plan Piratome en cas d'attaque nucléaire, chacun ayant pour but la protection des populations, l'aide aux victimes et

la décontamination. La circulaire 800 (spécifique au domaine NR) et le plan ORSAN (comprenant le plan Blanc) sont quant à eux des plans d'urgences relatifs à la gestion et l'organisation du système hospitalier en cas d'affluence massive de victimes notamment suite à un évènement NRBC (SGDSN, 2011; DGS, 2014).

## 2.2. Les actinides : généralités

La famille des actinides regroupe différents éléments ayant des caractéristiques chimiques similaires, représentée par des éléments artificiels, descendant de l'uranium, comme l'isotope  $^{235}\text{U}$  (0.2% de l'uranium naturel) dont la fission naturelle est utilisée dans les réacteurs nucléaires pour fournir de l'énergie sous forme d'électricité (Métivier, 2006 ; Figure 7).



**Figure 7:** Schéma simplifié de la fission nucléaire de l'uranium, générant des produits de fission d'intérêt : le plutonium et l'américium (FP : produits de fission)

Sous l'impact d'un neutron, le noyau d'uranium se trouve déséquilibré et se transforme en deux noyaux plus légers mais peu stables qui sont les produits de fission. Les noyaux issus de ces fissions sont dans la plupart des cas radioactifs. La fission dégage une grande quantité d'énergie ainsi que des neutrons qualifiés « d'accélérés » pouvant induire de nouveaux produits de fission à la chaîne. Quelques grammes d'uranium libèrent autant d'énergie que la combustion chimique d'une tonne de charbon (Reuss, 2012). Dans les réacteurs nucléaires, la réaction s'auto-entretient mais doit être contrôlée. Si le nombre de neutrons présents est trop important, la réaction peut devenir explosive, ce qui se produit en cas de bombe atomique.

Après quatre années en réacteur nucléaire, près de 4 % de l'uranium initial fissionné donne naissance à des composés de masse atomique intermédiaire (les produits de fission). Près de 1,1 % sont des composés de masse atomique supérieure, comme le plutonium et autres

actinides mineurs comme le neptunium (Np), l'américium (Am) ou le curium (Cm). Or, il s'avère que le plutonium et les actinides mineurs contribuent à l'essentiel de la toxicité radiologique des combustibles nucléaires usés sur des durées atteignant des milliers d'années (Poinssot et Warin, 2009). C'est pourquoi dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur le plutonium ainsi que l'américium, résultant de ces réactions de fission.

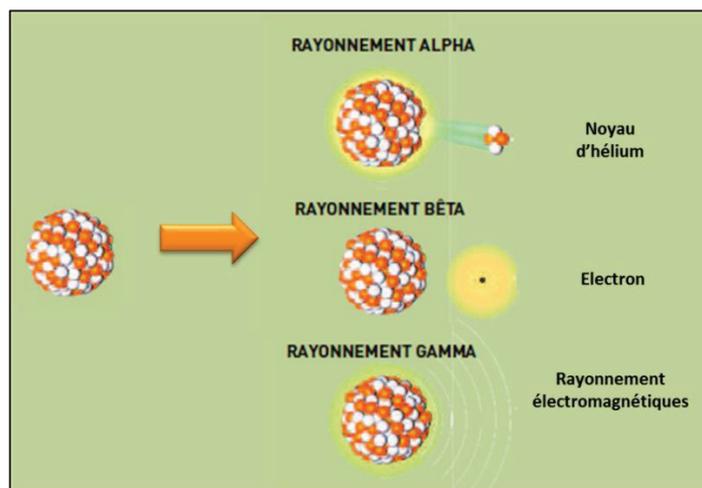
Le Plutonium ( $Z = 94$ ) a été créé en grande quantité dans les années 1940 dans le cadre du projet Manhattan afin de créer la bombe atomique (Métivier, 2010). Il est formé lorsque le noyau d'un atome d'uranium 238 capture un ou plusieurs neutrons (Figure 7). L'isotope 239 est principalement utilisé pour la fabrication de missiles (Métivier, 2001). Un autre isotope, le plutonium-238, est quant à lui utilisé comme source de chaleur dans les générateurs radiothermiques ou encore pour fournir de l'énergie dans les réacteurs nucléaires pour produire de l'électricité et dans des engins spatiaux non habités.

L'américium ( $Z = 95$ ) a été découvert en 1944 dans un réacteur nucléaire à l'Université de Chicago par le Dr. Glenn T. Seaborg qui a proposé ce nom pour cet élément en 1946 en l'honneur du continent sur lequel il a été découvert (Schulz et al., 1981). Actuellement, il est souvent associé au vieillissement du combustible nucléaire par la décroissance du  $^{241}\text{Pu}$ . L'isotope 241 de l'américium est utilisé sous forme de métal dans certains dispositifs médicaux de diagnostic et on le retrouve également dans les détecteurs de fumée. Le principe de ces détecteurs repose sur l'émission de particules  $\alpha$  associées à la décroissance de l'américium-241, provoquant un très faible courant électrique entre deux électrodes. Lorsque la fumée pénètre dans cet espace, le rayonnement  $\alpha$  est absorbé par les particules de suie et l'interruption du courant va déclencher l'alarme (CDC, 2004). Cela ne présente pas un risque pour la santé du fait que les rayonnements  $\alpha$  sont absorbés dans les quelques centimètres d'air ou par la structure du détecteur.

## **2.3. Propriétés du plutonium et de l'américium**

### *2.3.1. Propriétés radiologiques*

Il existe quatre principaux isotopes du plutonium ( $^{238}\text{Pu}$ ,  $^{239}\text{Pu}$ ,  $^{240}\text{Pu}$ ,  $^{241}\text{Pu}$ ) et trois pour l'américium ( $^{241}\text{Am}$ ,  $^{242}\text{Am}$ ,  $^{243}\text{Am}$ ). Tous ces isotopes sont radioactifs, ce qui signifie que ces noyaux atomiques instables se désintègrent spontanément pour tendre à la stabilité en dégageant de l'énergie sous forme de particules ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) et/ou de rayonnements ( $\gamma$ , X) (Figure 8).



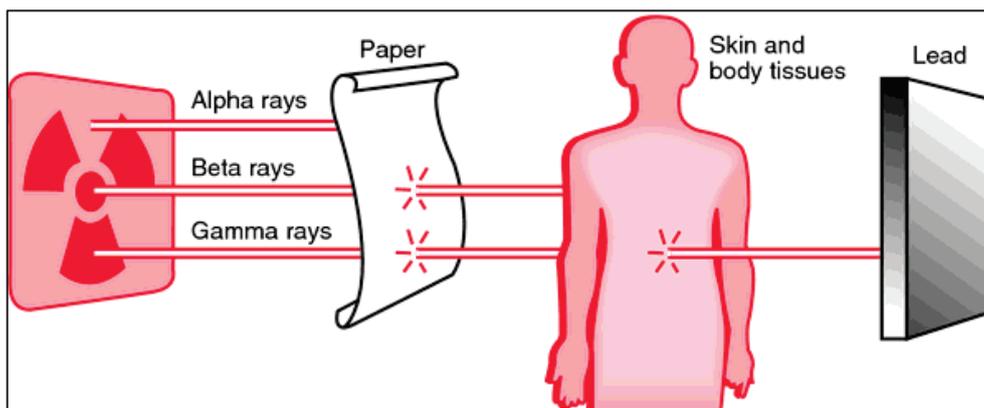
**Figure 8:** Les principaux types des rayonnements ionisants émis par les actinides (Médiathèque CEA)

Les propriétés radiologiques des principaux isotopes du plutonium et de l'américium sont résumées dans le tableau I. Pour le plutonium, l'isotope 239 est le principal matériau fissible utilisé pour la production d'armes nucléaires. L'isotope 238 quant à lui est formé parallèlement au 239, par la chaîne du combustible commençant par <sup>235</sup>U fissible. Les isotopes 240 et 241 sont les deux principaux isotopes présents dans les réacteurs nucléaires. L'américium 241 est produit suite la désintégration du <sup>241</sup>Pu. Ils font tous deux partie de la liste d'éléments potentiellement utilisables lors d'actes malveillants sous forme de « bombe sale » ou RDD et IND (Shin and Kim, 2009; Bunn et al., 2016).

Isotope	Demi-vie (ans)	Activité massique (Bq.g <sup>-1</sup> )	Mode de désintégration	Emissions principales (MeV) (rendements d'émission %)
<sup>238</sup> Pu	88	6,34 x 10 <sup>11</sup>	α	5,499 (71,04) 5,457 (28,84)
<sup>239</sup> Pu	24110	2,30 x 10 <sup>9</sup>	α	5,156 (73,30) 5,144 (15,10) 5,106 (11,45)
<sup>240</sup> Pu	6561	8,40 x 10 <sup>9</sup>	α	5,168 (72,90) 5,124 (27,00)
<sup>241</sup> Pu	14	3,81 x 10 <sup>12</sup>	β-	0,021 (99,99)
<sup>241</sup> Am	432	1,27 x 10 <sup>11</sup>	α γ	5,49 (85) 5,44 (13) 0,06 (36)

**Tableau I:** Caractéristiques nucléaires des principaux isotopes du plutonium et de l'américium

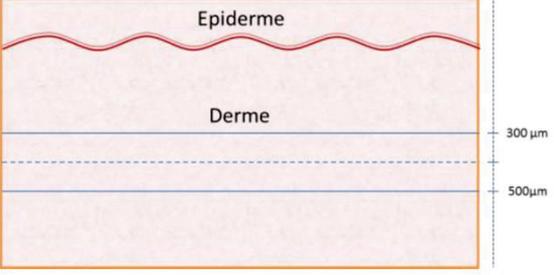
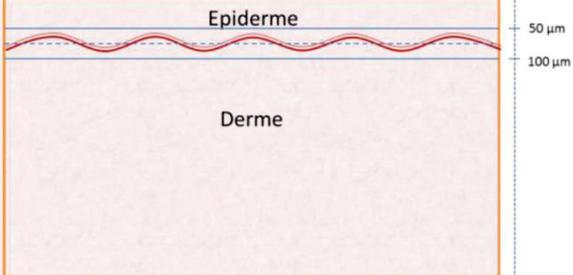
L'américium et le plutonium se désintègrent principalement par émission  $\alpha$ . Pour le plutonium, seul l'isotope 241 émet des rayonnements  $\beta$  lors de sa désintégration en Am-241. Ce dernier va d'autre part émettre environ 3% de rayonnements  $\gamma$  (59 keV) associés aux rayonnements  $\alpha$  (Tableau I). Les rayonnements  $\alpha$  sont très peu pénétrants et peuvent être arrêtés par quelques centimètres d'air ou une feuille de papier (Figure 9). Les rayonnements  $\gamma$ , très semblables aux rayons X, ont également une grande énergie et pénètrent le tissu plus loin que ne le font les particules  $\alpha$  ou  $\beta$ .



**Figure 9:** Schéma illustrant la capacité de pénétration des différents types de rayonnements (Ignatavicius and Workman, 2002)

### 2.3.2. Effets des rayonnements ionisants sur la peau

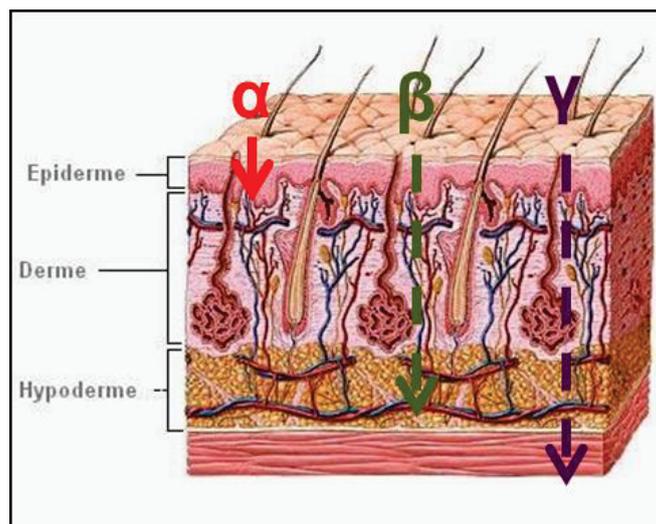
On caractérise les effets des rayonnements en deux types : les effets déterministes et les effets stochastiques (Tableau II). Les effets déterministes, aussi appelés réactions tissulaires, répondent à des seuils d'exposition spécifiques pour chaque tissu. La gravité et l'apparition de ces effets dépendent d'un seuil de dose reçue à ne pas dépasser. Les effets stochastiques correspondent à l'apparition de cancers ou de maladies héréditaires liés à une exposition aux rayonnements ionisants. Dans ce cas, il n'y a pas de notion de seuil de dose à partir de laquelle il est sûr que l'effet va apparaître compte tenu de l'incidence spontanée des cancers dans une population (Métivier, 2006).

Déterministes	Stochastiques
Seuil de dose	Sans seuil de dose (Aléatoire)
Réaction tissulaire / Brûlure radiologique	Cancers et malformations
Cellules cibles : Fibroblaste du derme à 300 – 500 $\mu\text{m}$ Référence : 400 $\mu\text{m}$	Cellules cibles : Couche basale de l'épiderme à 50 – 100 $\mu\text{m}$ Référence : 70 $\mu\text{m}$
	

**Tableau II:** Résumé des effets déterministes et stochastiques cutanés

Ces actinides pourraient présenter une forte toxicité chimique qui agit sur l'organisme (reins, système nerveux...). En effet, la toxicité chimique de l'uranium a été décrite dans de nombreuses études (Houpert et al., 2003 ; Dublineau et al., 2006 ; Poisson et al., 2014). Mais la toxicité du Pu et de l'Am est essentiellement liée à la radioactivité. La radiotoxicité se définit comme la toxicité due aux rayonnements ionisants émis par les radionucléides, sachant que les rayonnements  $\alpha$  sont les plus ionisants.

Suite à une contamination aux actinides, les couches superficielles de la peau (e.g. épiderme et derme) suffisent à arrêter les rayonnements  $\alpha$  mais pas les rayonnements  $\gamma$  qui traversent la peau jusqu'au derme (Figure 10). De ce fait, ils atteignent les cellules cutanées radiosensibles de la lame basale de l'épiderme (ICRP 59, 1992). Néanmoins leur dépôt d'énergie laisse une plus faible concentration d'énergie ionisante du fait qu'il sera réparti sur une plus grande distance. Cependant, l'isotope (241) de l'américium et du plutonium et certains de leurs descendants (Np) génèrent des rayonnements  $\beta$  ou  $\gamma$ , plus problématiques du fait de leur rayon d'émission. Les rayonnements  $\alpha$  sont donc arrêtés par la première couche de la peau (*stratum corneum*) mais du fait qu'ils sont hautement énergétiques, la dose locale n'est pas à sous-estimer.



**Figure 10:** Trajet des rayonnements ionisants dans la peau (adapté de la médiathèque CEA)

La peau étant un des organes les plus faciles à observer expérimentalement, les effets déterministes et stochastiques cutanés sont parmi les mieux décrits. On trouve dans le cas de forte exposition des desquamations et des ulcérations, particulièrement en cas d'exposition aux rayonnements  $\gamma$ . A plus faible dose peuvent être décrits des érythèmes (rougeur) et une épidermite sèche (ICRP 59, 1992). En effet, ces rayonnements vont atteindre la lame basale de l'épiderme dont une partie des cellules sont radiosensibles (Figure 10), pouvant potentiellement créer des effets comme un érythème ou une nécrose locale pour les cas les plus graves (ICRP 59, 1992).

Il existe trois types de cancer cutané, seulement deux ont été liés à l'exposition à des rayonnements ionisants. Le carcinome baso-cellulaire correspond à une prolifération de cellules tumorales dans la couche basale de l'épiderme. Le carcinome spinocellulaire (ou carcinome épidermoïde cutané) est un cancer de la peau développé à partir des kératinocytes. La mortalité des cancers cutanés radio-induits est très basse : 0,01 % pour les carcinomes baso-cellulaires et 1 % pour les spino-cellulaires (mortalité globale = 0,2 %). Néanmoins, le risque de cancer cutané radio-induit par unité de dose et de surface est beaucoup plus important dans le cas d'exposition aux rayonnements UV (Charles, 2004).

### 2.3.3. Propriétés Chimiques

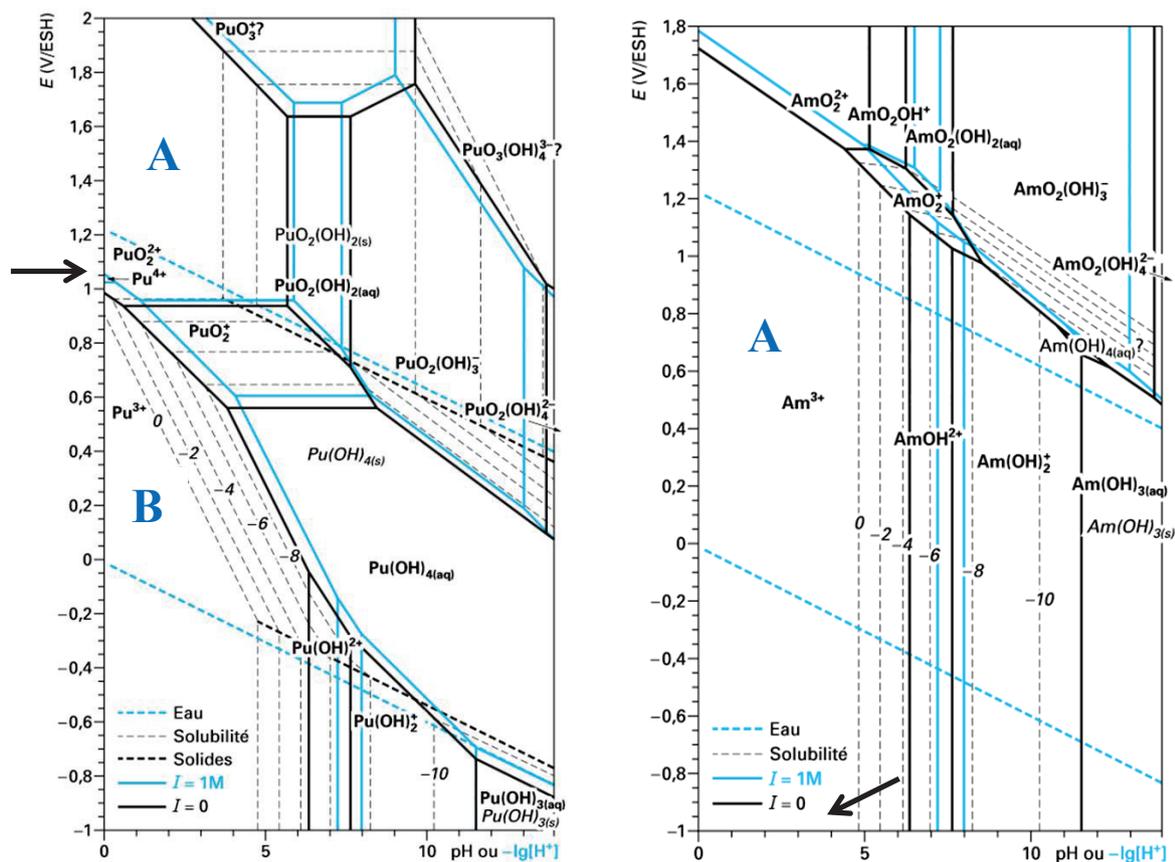
Les travaux de cette thèse portant sur la contamination cutanée par des solutions de plutonium et d'américium, ce paragraphe résume leurs principales propriétés en solution aqueuse afin de bien appréhender leurs comportements dans ce milieu. L'état d'oxydation prédominant ainsi que les espèces chimiques présentes en phase aqueuse peuvent être visualisés dans le

diagramme de Pourbaix. Ce dernier permet de définir les domaines de stabilité thermodynamique de chaque espèce en fonction du potentiel Redox (E) en Volt (V), mesuré avec une électrode standard à hydrogène (ESH), des couples oxydant-réducteur mis en jeu et du pH de la solution. Il représente donc la stabilité des différentes espèces en solution aqueuse. Les diagrammes présentés dans les prochaines sections (Figure 11 A et B) sont tracés à 25 °C, à force ionique nulle ( $I = 0$ , eau pure), avec un trait gras pour les espèces solubles et des tirets pour les solides ce qui correspond aux solubilités (tiret gris) dont le log est indiqué sur la figure. Le trait bleu ciel correspond à une force ionique 1M ( $I = 1 \text{ M ClO}_4^-$ ) uniquement pour les espèces solubles, en fonction de  $-\log [H^+]$  et non du pH. Les tirets bleu-ciel correspondent aux valeurs de potentiel redox de l'eau. Il faut également considérer que ce diagramme changera en fonction de la concentration d'actinides dans le milieu, ainsi qu'en présence d'autres ligands, qui vont modifier l'équilibre des espèces présentes en complexant des espèces spécifiques par affinité (Poinssot et Geickis, 2012).

- **Le plutonium**

Le plutonium possède une chimie redox particulière comparé à certains actinides. En effet, tous les états d'oxydations (+III à +VI) présentent un grand domaine de stabilité. De ce fait, différents états d'oxydation peuvent coexister dans les mêmes conditions et dans une même solution. Les formes chimiques les plus stables aux valeurs basses de pH sont le Pu (III) (zone B) et Pu (IV) (zone A) (Figure 11A) (Vitorges, 1999). Contrairement à une idée répandue,  $\text{Pu}^{4+}$  n'est pas extrêmement stable en milieu acide et n'apparaît pas à  $I = 0$ . Il est toutefois stabilisé par l'augmentation de la force ionique (flèche noire Figure 11A).

Sous fortes conditions réductrices, l'état (+III) est fortement présent. Les domaines d'existence d'actinides au degré d'oxydation (VII) correspondent à des estimations. En effet, l'état d'oxydation (VII) est extrêmement instable en solution et nécessite un milieu très fortement basique et oxydant (non représenté sur ce diagramme).



**Figure 11:** Diagramme de Pourbaix du Pu (A) et de l'Am (B) en milieu aqueux non complexant : concentration en Pu et Am égale à  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  et à  $25^\circ\text{C}$  avec  $I=0$  (force ionique nulle) et  $I=1$  (force ionique 1 M  $\text{ClO}_4^-$ ) (Vitorges, 1999)

L'hydrolyse du Pu(III) est fortement similaire à celle de l'Am(III). Cependant, l'hydrolyse du Pu(IV) se rapproche plus de celle du Th(IV) ou de l'U(IV). L'augmentation du pH de la solution favorise la dismutation et également l'hydrolyse du Pu(IV) (Figure 11A) si on considère que les concentrations dans le milieu ne permettent pas d'atteindre la saturation, ce qui est rarement le cas. L'hydrolyse correspond à la formation de complexes hydroxo, qui peuvent donner lieu à la formation d'un réseau macromoléculaire colloïdal, quasiment inerte à toute réaction chimique et donc plus susceptible de sédimenter (Morss et al., 2006). La formation de ces complexes solides va commencer à  $\text{pH} \geq 4$  (trait pointillé noir).

La dismutation est une réaction dans laquelle une espèce chimique initialement présente à un seul degré d'oxydation se trouvera après réaction sous deux formes : oxydée et réduite. Cependant, en milieu acide, le Pu(IV) se dismute en faible proportion. **Le plutonium sera donc retrouvé préférentiellement dans à l'état d'oxydation (+IV) pour la suite de nos études.** En effet, toutes les solutions de travail sont diluées dans l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ ) et les

différentes étapes de traitement des échantillons sont également réalisées en milieu acide ( $0 < \text{pH} < 3$ ).

- **L'américium :**

Pour l'américium en solution aqueuse (trait bleu ciel pointillé), seules les espèces trivalentes (III) (zone A, Figure 11B) sont présentes. Il est stable en solution sous forme  $\text{Am}^{3+}$ . Les valeurs obtenues à force ionique nulle correspondent à une plus grande stabilité de  $\text{AmO}_2^+$  et  $\text{AmO}_2^{2+}$ , ces deux espèces étant assez rapidement réduites en Am(III) par l'eau (Figure 11B). Les états de valence II à VI existent mais la chimie de l'américium est plus simple que celle du plutonium. Les espèces hydrolysées, des complexes mono, di ou trihydrique, peuvent se former à partir d'un  $\text{pH} > 3$  (Poinssot et Geickis, 2012). De ce fait, l'américium est peu soluble dès une augmentation du pH au-dessus de 4 (flèche, Figure 11B). Les formes pentavalentes (V) sont présentes en dehors du domaine de stabilité de l'eau, il n'est donc pas pertinent de les considérer dans nos études.

Pour l'américium et le plutonium, comme pour tous les actinides, les phosphates sont les ions avec lesquels ils ont tendance à former des complexes stables en fonction du pH et des 3 pK de l'acide phosphorique. Des études de spéciation ont été menées en incluant notamment l'interaction avec les ions citrates (Bion et al., 2005). Dans cette étude, la modélisation de la spéciation (excluant les phénomènes de précipitation) a amené à une prédominance des complexes avec les phosphates à  $\text{pH} < 3$  et des complexes avec les citrates de pH 3 à 8. Les actinides ont donc tendance à se complexer préférentiellement avec certains anions, comme les phosphates ou les carbonates (donneurs oxygénés), du fait de l'électronégativité de leurs groupements (interaction électrostatique) (Vitorges, 1999). Dépendant de l'affinité avec ces anions, la formation de ces complexes en solution d'actinides varie dans l'ordre :  $\text{PO}_4^{3-} > \text{CO}_3^{2-} > \text{OH}^- > \text{SO}_3^{2-} > \text{F}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Guillaumont et al., 2003).

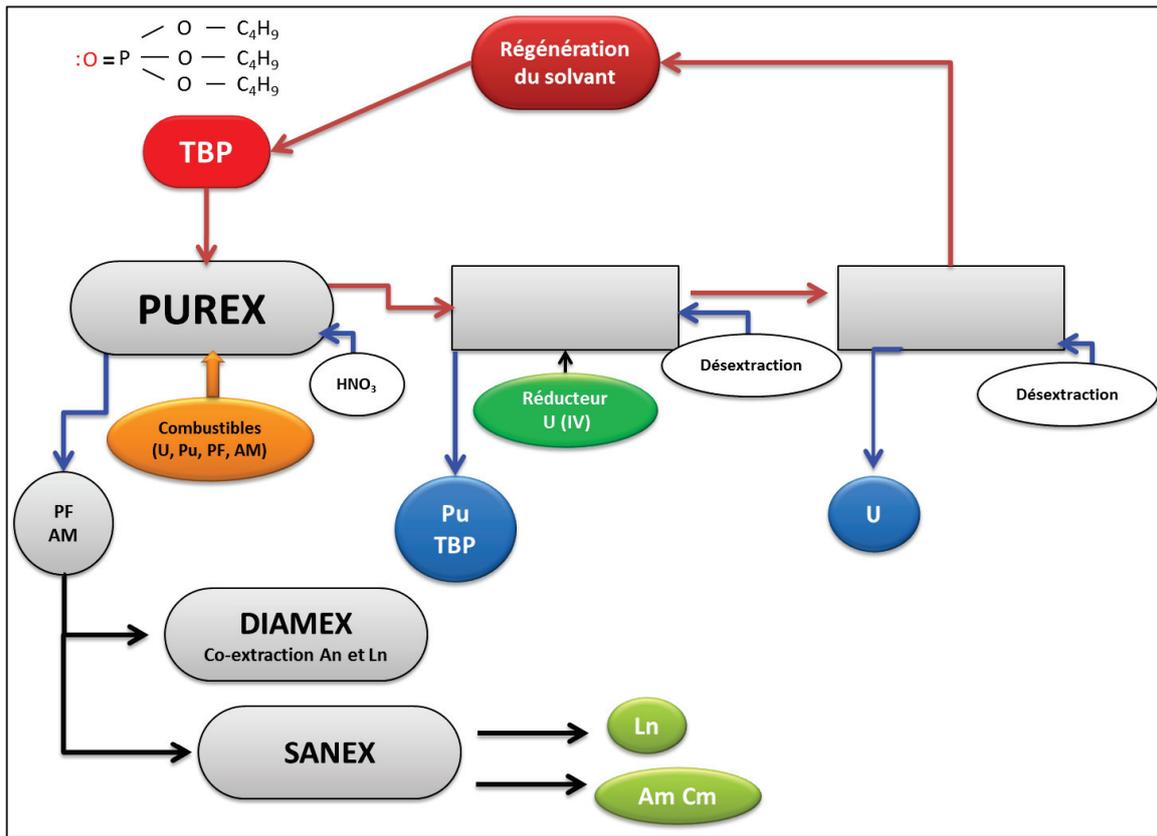
Aux différents pH biologiques, les composés de l'américium et du plutonium sont donc peu solubles et ont une forte tendance à l'hydrolyse à partir du pH 4, ce qui correspond au pH de la peau (4.5 à 5.5). **Les mêmes conditions (acides) que pour le plutonium seront utilisées lors de cette étude qui tend à favoriser l'état d'oxydation (+III) pour l'Am dans nos solutions.** Les pH des solutions de travail utilisées dans cette étude seront mesurés pour chaque expérimentation, permettant de connaître l'espèce stable majoritaire pour chaque actinide.

## 2.4. Les actinides rencontrés en milieu professionnel

### 2.4.1. Sources et mode de contamination

Comme il a été expliqué précédemment, le plutonium est un actinide qui se trouve dans divers états d'oxydation (III à VII), mais majoritairement dans l'état d'oxydation (IV) (ICRP 48, 1986). Il peut être rencontré dans une variété de formes chimiques et physiques comme le métal (Pu), les carbures (PuC et Pu<sub>2</sub>C<sub>3</sub>), les hydroxydes (PuOH)<sub>n</sub>, les oxydes (PuO<sub>2</sub>), les chlorures (PuCl<sub>3</sub>), les oxalates (Pu(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), les nitrates (PuNO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> ou encore dans le combustible nucléaire sous forme d'oxyde mixte avec l'uranium et l'américium (MOX). Le nitrate de plutonium en solution aqueuse est largement rencontré dans la fabrication et le retraitement du combustible nucléaire. Le dioxyde de plutonium est le produit final dans la fabrication de pastilles de combustible et il est présent dans le combustible d'oxydes mixtes (MOX) avec de l'oxyde d'uranium. Le MOX a été utilisé comme combustible dans certains réacteurs à eau sous pression. Les chlorures sont des formes beaucoup moins rencontrées. Les modes de contamination majoritaires de ces formes sont l'inhalation et la contamination cutanée.

On le trouve également sous forme de complexe électriquement neutre en phase organique avec le tributylphosphate (TBP) et le dodécane. Le TBP est utilisé comme agent d'extraction par les travailleurs lors du procédé PUREX (Figure 12), qui est une méthode utilisée depuis de nombreuses années dans la fabrication et le recyclage du combustible nucléaire (Goldschmidt et al., 1955). Cette méthode d'extraction a été retenue par le Dr Glenn T. Seaborg et son équipe de Metallurgical Project de Chicago (Projet Manhattan) comme la méthode la plus applicable à ce problème difficile qu'est l'extraction du plutonium de la matière nucléaire. Le principe repose sur la sélectivité du TBP (polarisation négative de l'oxygène libre du groupement phosphate) vis-à-vis des degrés d'oxydation (+IV) et (+VI) et donc de U(VI) et Pu(IV) (Figure 12; Patarin, 2002 ; Morss et al., 2006). Il forme un complexe avec Pu(IV) ou U(VI) en phase organique (en raison du caractère hydrophobe des groupements butyle du TBP) alors que les autres éléments, comme l'U(IV) et l'Am(III) restent dans la phase aqueuse (HNO<sub>3</sub>, 4M).



**Figure 12:** Schéma représentant différents moyen d'extraction du combustible usagé (adapté de Poinsot et Warin, 2009) Ln = Lanthanides ; PF = Produits de Fission ; AM = Actinides Mineurs

L'américium est un élément retrouvé dans l'industrie nucléaire principalement lié au vieillissement des combustibles nucléaires (issu de la décroissance du <sup>241</sup>Pu). On le trouve dans les états d'oxydation (III à VI), mais en majorité dans l'état d'oxydation (III) (ICRP 48, 1986). Les lanthanides tels que l'Eu(III) ou le Gd(III) sont des analogues chimiques de l'Am(III) (Cotton, 1991). Tout comme le plutonium, il peut être rencontré dans l'industrie dans une grande variété de formes chimiques et physiques comme les hydroxydes (AmOH)<sub>n</sub>, les oxydes (AmO<sub>2</sub>), les chlorures (AmCl<sub>3</sub>), les oxalates (Am<sub>2</sub>(C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)<sub>3</sub>), les nitrates (AmNO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, les citrates (Am(C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>14</sub>)<sup>3-</sup>), et conjointement avec le plutonium et l'uranium dans le MOX. Tout comme le plutonium, les formes nitrates et MOX de l'américium sont les plus rencontrées en industrie, avec également un risque d'exposition par inhalation et contamination cutanée supérieur à l'ingestion. De plus, l'américium représente un risque d'irradiation  $\gamma$  important du fait de l'augmentation d'américium en industrie issue du vieillissement du combustible nucléaire.

#### 2.4.2. Cas de contamination et données expérimentales

Les études de pénétration ou de décontamination cutanées ont majoritairement été réalisées dans les années 70 et suite à l'accident de Tchernobyl en 1986. Cependant, un regain d'intérêt est survenu ces dernières années, majoritairement pour l'uranium et le plutonium. L'américium reste un élément peu étudié dans ce domaine, du fait de son comportement similaire à celui du curium et du plutonium. En général, les données sur la perméabilité cutanée des radionucléides chez l'homme ont été obtenues à l'occasion d'études *in vivo* ou d'accidents survenus en milieu professionnel. Cette partie présentera donc différents cas de contamination par l'américium et le plutonium chez l'homme ou l'animal. Elle sera divisée en deux sections : les études sur la peau saine et les études sur la peau lésée.

- **La peau saine :**

Les différents travaux menés sur l'étude de l'absorption cutanée de l'américium et du plutonium à travers la peau saine indiquent que la peau constitue une bonne barrière contre leur entrée dans l'organisme. Cependant, des études ont montré que dans certaines situations, ce passage percutané peut être augmenté et qu'une quantité significative d'activité restait piégée au niveau des couches cutanées profondes. La publication 48 de la CIPR (ICRP 48, 1986) réunit différentes études (des années 50 à 80) de pénétration cutanée de l'américium et du plutonium sur différents modèles *in vivo* (porc, rat, lapin) dans différents milieux (acide, organique) et sous différentes formes chimiques (nitrate, citrate...). La fraction d'actinide qui pénètre ainsi que les différents facteurs influençant cette pénétration sont présentés. Les résultats sont résumés dans les tableaux III A et B.

Il en ressort que le profil d'absorption cutanée des formes nitrates du plutonium ( $^{239}\text{Pu}$ ) de l'américium ( $^{241}\text{Am}$ ) et du neptunium ( $^{237}\text{Np}$ ) sont assez similaires chez le porc (0.01-0.02% en 6h). Une augmentation de cette absorption est observée à 48h, correspondant à 0.02-0.04%. Cette activité est retrouvée dans les os, le foie ou les muscles de l'animal. Les actinides absorbés par voie percutanée suivent la même distribution et répartition dans l'organisme que par les autres voies d'entrée dans le corps (inhalation, ingestion).

A	Chemical form	Species	Total absorption (% × 10 <sup>2</sup> )							
			0.25 h	1 h	3 h	6 h	1 day	3 days	5 days	
	<sup>239</sup> Pu nitrate 0.1 M HNO <sub>3</sub>	Rat								30
	<sup>239</sup> Pu nitrate 10 M HNO <sub>3</sub>	Rat		5						200
	<sup>239</sup> Pu nitrate 0.1 M HNO <sub>3</sub>	Rat		0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.1 ± 0.2	1.7 ± 0.4			
	<sup>239</sup> Pu nitrate 1 M HNO <sub>3</sub>	Rat		1.2 ± 0.1	2.0 ± 0.5	3.3 ± 0.1	5.8 ± 0.1	7.9 ± 0.8		
	<sup>239</sup> Pu nitrate 2.5 M HNO <sub>3</sub>	Rat		0.7 ± 0.1		2.6 ± 0.6	3.8 ± 0.1	10.2 ± 2.6		
	<sup>239</sup> Pu nitrate 10 M HNO <sub>3</sub>	Rat		0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.5 ± 0.4	2.9 ± 0.5	4.7 ± 0.8		
	<sup>239</sup> Pu nitrate polymer pH 1	Rat		0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.3		
	<sup>239</sup> Pu tributylphosphate	Rat	4	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	1.4 ± 0.4	4.3 ± 1.4			
	<sup>239</sup> Pu tributylphosphate	Rabbit								15*
	<sup>239</sup> Pu nitrate	Pig (8-10 w)				1-2				
	<sup>239</sup> Pu nitrate	Pig (8-10 w)			11.5	18.5	26.0	18.7		
	<sup>239</sup> Pu citrate	Man		0.2						
	<sup>239</sup> Pu 0.4 M HNO <sub>3</sub>	Man		1						
	<sup>239</sup> Pu 9% HCl	Man								
	<sup>239</sup> Pu tributylphosphate in CCl <sub>4</sub>	Man	4							

B	Chemical form	Species	3 h	6 h	1 day	5 days
	<sup>241</sup> Am nitrate in 0.05 M HNO <sub>3</sub>	Rat			3.1	
	0.5 M HNO <sub>3</sub>	Rat			18	
	1 M HNO <sub>3</sub>	Rat			22	
	2.5 M HNO <sub>3</sub>	Rat			14	
	4 M HNO <sub>3</sub>	Rat			14	
	8 M HNO <sub>3</sub>	Rat			32	200
	<sup>241</sup> Am nitrate pH 1-1.5	Pig (8-10 w)		1-2		
	<sup>241</sup> Am nitrate	Pig (4-6 w)		0.8 ± 0.1		
	<sup>241</sup> Am nitrate dried solution	Pig (4-6 w)		5.4 ± 0.6		
	<sup>241</sup> Am nitrate + tributylphosphate	Pig (4-6 w)		32 ± 5		
	<sup>237</sup> Np nitrate pH 1	Pig (4-6 w)		2.1 ± 0.6		
	<sup>237</sup> Np nitrate dried solution	Pig (4-6 w)		5.2 ± 0.5		

**Tableau III:** Résumé des études d'absorption percutanée du plutonium (A) et de l'américium (B) in vivo (ICRP 48, 1986)

\*résultats obtenus à 14 jours

w = âge des porcs en semaine

Contamination dorsale in vivo, surface et activité non indiquée.

L'application d'une préparation sèche de nitrate d'américium sur la peau de porc augmente de 2 à 7 fois l'absorption percutanée comparée à une solution aqueuse de nitrate. Cela peut être expliqué par une possible interaction de ces sels de nitrates anhydres, plus solubles dans la peau, avec les lipides cutanés (Khodyreva et al., 1977). Les composés complexes hydrosolubles, comme les citrates, peuvent pénétrer la peau de porc plus facilement (10 à 20 fois plus qu'une forme nitrate). En rapport avec une exposition professionnelle potentielle, il est important de comprendre le comportement du plutonium après contamination de la peau avec divers acides et solvants organiques. Ainsi, le taux d'absorption du  $^{239}\text{Pu}$  en présence de TBP chez le rat était 2.5 fois plus grand que celui d'une forme nitrate (0.1 M,  $\text{HNO}_3$ ) avec une excrétion urinaire augmentée 10 fois chez l'animal (résultats non exposés dans le tableau). Une diminution du pH de la solution contaminante de  $^{239}\text{Pu}$  a mis en évidence une augmentation du taux d'absorption de 0.3% (0.1 M,  $\text{HNO}_3$ ) à 2% (10 M,  $\text{HNO}_3$ ) chez le rat. Cette augmentation liée à la diminution de pH a également été constatée pour l'américium (tableau III B).

D'autres études *ex vivo* en cellule de Franz sur des explants de peau congelés ont mis en évidence une pénétration du plutonium à travers la peau. Dans leurs travaux, Tymen et al. (Tymen et al., 2000a) ont étudié la diffusion d'une solution de nitrate de plutonium (modérément soluble) de pH = 1 à travers des explants de peau dorsale de rat et de peau abdominale humaine. Après 2 heures de contamination, 0,1 % et 0,02 % de plutonium déposé ont été mesurés dans les fluides des compartiments receveurs, respectivement pour la peau de rat et la peau humaine. Le fait que 5 fois plus d'activité est mesurée chez le rat comparé à l'homme s'explique par la différence de structure et de physiologie de la peau de rat, qui n'est pas le modèle le plus représentatif de la peau humaine. Cependant, une activité significative est mesurée dans l'épiderme (95 %) et ainsi que le derme (4%), ce qui pourrait être problématique. En effet, cette activité piégée pourrait être libérée sur le long terme au niveau systémique avec un impact des rayonnements  $\alpha$  sur les cellules de l'organisme.

A titre d'exemple lors d'un accident de contamination cutanée, un travailleur (Harold McCluskey) a reçu une quantité importante d'Am-241 sur le visage, suite à l'explosion d'une boîte à gants, en 1976 sur le site de Hanford. La complexité de ce cas a été causée par l'association d'un passage percutané, de débris de verre ainsi qu'une brûlure chimique au niveau de l'œil, ayant contribué à un transfert important de l'américium par l'œil et les blessures liées au verre. Dix ans après l'incident, de grandes quantités d'activité ont été

mesurées à différents niveaux : 110 kBq au niveau de la peau, 350 kBq au niveau du squelette ainsi que 19 kBq dans le foie (Breitenstein et Palmer, 1989). Les études histologiques de ce cas seront traitées dans la partie dédiée aux effets physiologiques d'une contamination aux actinides (§2.5).

Plus récemment, un cas de contamination a été rapporté en France dans le secteur universitaire. Deux étudiants ont été contaminés sur les mains, à partir d'une source d'américium dont l'activité était de 1,4 MBq (RELIR OTHEA). Après plusieurs lavages successifs à l'eau et au savon, la contamination restait fixée. Cette persistance de contamination a été traitée par le port de gants en latex (environ une heure). Un examen radio toxicologique des selles au lendemain de la contamination a mis en évidence une contamination de 0,25 et 0,0045 Bq. Après 60 jours, un deuxième examen a été réalisé et négatif.

Les travaux discutés dans cette partie dédiée à l'étude de la pénétration cutanée de l'américium et du plutonium à travers la peau intacte sont résumés dans le tableau IV. D'après ces différentes études, la diffusion de ces actinides à travers la peau non lésée est faible mais non nulle pour la forme simple de type nitrate modérément soluble. Elle peut être suffisamment importante en cas de contact prolongé. De plus, il existe de nombreuses formes plus complexes (mélange de produits de fission, acide, solvant organique...) qui pénètrent beaucoup plus à travers une peau saine. C'est pourquoi il est nécessaire de ne pas omettre cet aspect en cas de contamination, où souvent celle-ci n'est pas immédiatement avérée et où la source n'est pas identifiée. Ainsi, les accidents de contamination sur une peau saine ne doivent pas être négligés car s'ils ne sont pas pris en charge, ils peuvent conduire à une exposition interne des victimes. La décontamination d'une peau saine est donc une étape cruciale dans la prise en charge des individus contaminés. Peu d'études sur la peau saine sont actuellement menées, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à ce modèle.

Référence	Objectif de l'étude	Techniques utilisées	Modèle d'étude	Elément	Activité initiale	Traitement	Durée	Résultats
ICRP 48, 1986	Synthèse des études sur la pénétration cutanée des actinides	ND	Rat, porc et homme ( <i>in vivo</i> )	<sup>241</sup> Am <sup>239</sup> Pu	ND	ND	15 minutes à 6 jours	*0,02 % d'absorption à travers la peau saine chez le porc * TBP, acide et citrate : ↑ de l'absorption
Breitenstein et Palmer, 1989	Suivi de l'accident de contamination d'Hanford (1976)	ND	Homme ( <i>in vivo</i> )	<sup>241</sup> Am	11.1 MBq sur le visage	DTPA (Ca et Zn)	De l'accident jusqu'au décès	*Mise en évidence de contamination dans les organes (foie, squelette) *Traitement intensif au DTPA a permis l'excrétion de 41 MBq
Tymen et al., 2000a	Etude de pénétration et de décontamination de la peau saine sur 2 modèles	Cellule de Franz + Autoradiographie	Homme et rat ( <i>ex vivo</i> ) rat ( <i>in vivo</i> )	<sup>239</sup> Pu	2 kBq	DTPA EHBP	2 H	*DTPA et EHBP : forte efficacité de décontamination *EHBP >DTPA (3 et 21 % de l'activité initiale dans l'épiderme) *Activité retrouvée dans l'épiderme (95 %) et le derme (4%) et dans le compartiment récepteur après 2 h (0,02%)
Tymen et al., 2000b	Etude de décontamination <i>in vitro</i> et de la peau avec détermination des constantes de répartitions	Cellule de Franz + Spectrométrie α	Poudre de SC ( <i>in vitro</i> ) biopsies humaines ( <i>ex vivo</i> )	<sup>239</sup> Pu	2 kBq	Eau DTPA EHBP	2 H	* <i>in vitro</i> : Détermination des constantes de répartitions : Eau peu d'efficacité de décontamination contrairement au DTPA et EHBP avec DTPA>EHBP * <i>ex vivo</i> : résultats similaires
RELIR OTHEA	Contamination de deux étudiants en laboratoire universitaire	Examen radiotoxicologique + comptage externe	Homme (main)	<sup>241</sup> Am	1,4 MBq	Eau +savon DTPA	ND	*Décontamination répétée à l'eau peu efficace, DTPA retire la contamination sur les mains * J+1 = 0,25 et 0,0045 Bq dans les selles * J+60 = examen négatif.

**Tableau IV:** Résumé des études d'une contamination sur peau saine de l'Am ou du Pu

- **La peau lésée :**

En cas d'accident, une blessure cutanée peut être de différentes natures : une coupure, une piqûre, ou encore une brûlure chimique (acide ou base), menant à de nombreux scénarii d'exposition aux radioéléments. Différents travaux visant à étudier le comportement de l'américium et du plutonium dans ces différents types de blessures ont été menés afin d'estimer l'activité dans la blessure ou l'exposition interne.

Une étude d'Harrison et al. (Harrison et al., 1993), a suivi les effets d'une implantation sous cutanée de différentes particules d'américium et de plutonium chez le rat. Après six mois d'exposition, les observations montrent que les particules les plus transférables (plus solubles) étaient les ferromagnétiques (acier et carbone) et la poussière (TM 101) et les moins transférables (moins solubles) étaient les oxydes et les organiques. Les autoradiographies (après 1 an) ont mis en évidence une fibrose entourant chaque particule ainsi que de nombreux macrophages. Le comportement des différents matériaux varie considérablement. Cependant, les résultats ont montré que seulement une faible fraction de l'activité était transférée à d'autres tissus pour la majorité des particules. Leur mouvement est généralement faible vers les ganglions lymphatiques régionaux et le foie, mais significativement plus élevé pour les particules d'oxydes.

Un modèle de plaie contaminée a été mis au point par Griffiths et al. (Griffiths et al., 2012, 2014a ,b) sur le rat. La première étude compare les différentes techniques de traitements de la plaie, par excision simple ou associée à un traitement en intraveineuse à l'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA). L'excision seule permet de retirer environ 16% de l'activité initiale du site de la plaie. La combinaison des deux traitements ainsi que l'injection seule ont été plus efficaces que l'excision seule, indiquée par une augmentation de l'excrétion urinaire et une diminution de l'activité dans les tissus (foie, squelette). Cependant, les résultats ont montré que le DTPA en intraveineux (IV) reste le plus efficace dans l'excrétion urinaire. Le marquage  $\gamma$ H2AX de la plaie a mis en évidence des foci de l'ADN, qui sont des biomarqueurs représentatifs des cassures doubles brins radio-induites. Ces résultats témoignent d'une potentielle irradiation des cellules immunitaires ou des fibroblastes cutanés. La deuxième étude s'est intéressée à la répartition des actinides dans les organes de rétention (foie, reins et squelette). Les résultats montrent que l'activité mesurée dans les reins est 10 fois plus grande en cas de contamination à l'américium comparé au plutonium. L'estimation

des doses équivalentes aux reins de l'américium est 1,5 fois plus grande que celui du plutonium (environ 90 mSv contre 60 mSv). Cela s'explique par les rayonnements  $\gamma$  émis par l'américium, en plus des particules  $\alpha$ .

L'article de Bailey et al. (Bailey et al., 2003) analyse le cas d'une blessure par piqûre du pouce (à travers un gant) suite à un nettoyage d'un local potentiellement contaminé par l'américium et le plutonium. Une procédure de décontamination cutanée a donc été réalisée. Après différents lavages, il n'y avait aucun signe de contamination en surface. Cependant, un prélèvement sanguin révéla une contamination systémique qui engendra un traitement par voie intraveineuse au DTPA (30 min après la découverte de la plaie) et une excision chirurgicale (8 jours après l'incident). Environ 70% de l'activité de la plaie initiale a été éliminée par les procédures chirurgicales.

L'étude de Khokhryakov et al. (Khokhryakov et al., 2003) revient sur le cas d'un travailleur contaminé au plutonium ( $^{239}\text{Pu}$  estimé à 530 kBq) et associé à une brûlure acide au tibia. Différentes biopsies de la peau nécrosée ont été réalisées et au 7<sup>ème</sup> jour, environ 37 kBq ont été mesurés dans ces tissus. Deux jours après avoir retiré ces tissus nécrosés, ils ont pu observer une diminution par 2 du plutonium excrété. Dans ce cas, le travailleur a consulté le médecin uniquement le lendemain de l'incident, résultant en un traitement tardif. Une absorption systémique a été estimée à 4,3%. Malgré ce délai, le traitement décorporant recommandé (DTPA sur un mois) s'est avéré efficace avec une diminution de plutonium systémique et de l'excrétion urinaire du 9<sup>ème</sup> jusqu'au 33<sup>ème</sup> jour. Cependant, 13 ans après l'incident, une faible activité est toujours mesurée dans les urines ( $10^{-2} \text{ Bq.L}^{-1}$ ).

Le suivi d'un cas de contamination 24 ans après (48 kBq) de l'index au plutonium et à l'américium est présenté par Carbaugh et al. (Carbaugh et al., 2010). L'individu a été traité par administration en intraveineuse (IV) de DTPA, ainsi que deux chirurgies (une semaine après) afin de retirer la majorité de l'activité sur le site de la plaie. Ces excisions ont permis de réduire la contamination résiduelle de la plaie à 5.4 kBq. La chélation s'est étalée sur 17 mois, résultant en un total excrété d'environ 7 kBq dans les urines. Une légère anomalie tissulaire, caractérisée par un tissu cicatriciel apparent au niveau du site d'excision, reste toujours visible 24 ans plus tard. Le sujet a également signalé une sensibilité au froid dans ce tissu, sans altération de la fonction complète du doigt. Cela semble résumer les seuls effets cliniques directement attribuables à l'excision de la plaie contaminée. Des examens médicaux annuels n'ont pas mis en évidence d'effets néfastes sur la santé associés à la contamination.

L'ensemble des travaux menés sur l'étude du passage de l'américium et du plutonium à travers des blessures est résumé dans le tableau V. Les études menées *ex vivo* et *in vivo* sur des modèles de blessure ont permis de mettre en évidence le rôle de barrière joué par la peau en cas de contamination par l'américium et le plutonium. En effet, en cas de blessure, leur diffusion est plus importante et plus rapide que dans le cas de la contamination d'une peau intacte. En plus de la rupture physique de la barrière cutanée, la mise en place de la cicatrisation (inflammation, angiogenèse...) peut potentiellement influencer la pénétration et la fixation sur le site de la plaie, du fait de la structure singulière du tissu cicatriciel.

La contamination suite à l'insertion de particules sous cutanées est très préoccupante du fait qu'elles constitueraient un réservoir, permettant une potentielle libération de ces actinides au niveau systémique. Le rôle du traitement est crucial du fait qu'il va éliminer la majeure partie du contaminant disponible et diminuer les effets des rayonnements. Cependant, du fait de leur longue durée de vie et des quantités engagées, le contaminant reste dans le corps durant des dizaines d'années avec un impact radiologique.

Référence	Objectif de l'étude	Techniques utilisées	Modèle d'étude	Elément	Activité initiale	Traitement	Durée de l'étude	Résultats
Harrison et al., 1993	Etude biocinétique après l'implantation sous cutanée de particules sur le rat	Histologie autoradiographie radiochimie	rat ( <i>in vivo</i> )	<sup>241</sup> Am <sup>239</sup> Pu	0,5 à 537 kBq en fonction des particules	-	1 et 6 mois après implantation	*Dissolution des particules vers les organes cibles pour toutes les formes *↑ transfert avec particules ferromagnétiques et poussières
Bailey et al., 2003	Comparaison entre les données d'excrétion suite à une blessure d'un travailleur et une simulation	Cartographie à l'aide d'un détecteur à germanium analyse des excréta et plasma	Homme (pouce)	<sup>239</sup> Pu <sup>240</sup> Pu <sup>241</sup> Am	3 kBq	DTPA (Ca sur la plaie et Zn pour IV) + Excision du tissu contaminé	suivi sur 1000 jours	*L'excision des tissus retire la majorité de la contamination (70%) et le reste s'est fait par excrétion (1%) *Résultats de simulation proche des faits : encourageant pour une complémentarité des deux techniques
Khokhryakov et al., 2003	Evaluation de l'efficacité du traitement au DTPA (rinçage et IV) après une brûlure par acide nitrique et contamination au Pu	Analyse tissulaire, plasmatique et de l'excrétion urinaire	Homme (tibias)	<sup>239</sup> Pu	530 kBq	DTPA	traitement sur 33 jours  suivi jusqu'à 13 ans après	*Absorption systémique estimée à 4,3% * DTPA 1 jour après l'accident : ↑ excrétion * après 20 jours : ↓ excrétion * Pu retrouvé jusqu'à 13 ans après l'incident
Carbaugh et al., 2010	Suivi 24 ans après blessure contaminée	Analyse des excréta	Homme (index)	<sup>239</sup> Pu <sup>240</sup> Pu <sup>241</sup> Am	48 kBq	DTPA + Excision du tissu contaminé	24 ans après l'incident	* Traitement au DTPA (17 mois) excrétion de 7 kBq *sensibilité au froid suite à l'excision des tissus contaminés qui a retiré 5.4 kBq

Référence	Objectif de l'étude	Techniques utilisées	Modèle d'étude	Elément	Activité initiale	Traitement	Durée de l'étude	Résultats
Griffiths et al., 2014a	Effet de la combinaison de l'excision et du traitement au DTPA sur une plaie contaminée	Histologie, autoradiographie, immunohistochimie analyse tissus et urine	rat ( <i>in vivo</i> )	<sup>238</sup> Pu	2-4 kBq	DTPA + excision	14 jours	*Synergie de l'IV et excision plus efficace que l'excision seule *DTPA IV reste le plus efficace dans l'excrétion *pas de différences dans les organes de rétention entre IV et synergie *marquage $\gamma$ H2AX : foci biomarqueurs des cassures doubles brins radio-induites irradiation possible des cellules immunitaires ou fibroblastes
Griffiths et al., 2014b	Comparaison d'activité dans les organes de rétention suite à blessure à l'Am et le Pu	Comptage externe (NaI), analyse des excréta et des organes par radiochimie et scintillation liquide	rat ( <i>in vivo</i> )	Am et Pu (nitrate) MOX (U et Pu)	6 à 15 kBq	-	90 jours	* Am s'accumule + dans les reins que Pu et MOX *Pu et MOX plus retrouvés dans les autres organes (foie, squelette)

**Tableau V:** Résumé des études de contamination sur peau lésée ou blessure de l'Am ou du Pu

## 2.5. Effets physiologiques d'une contamination aux actinides

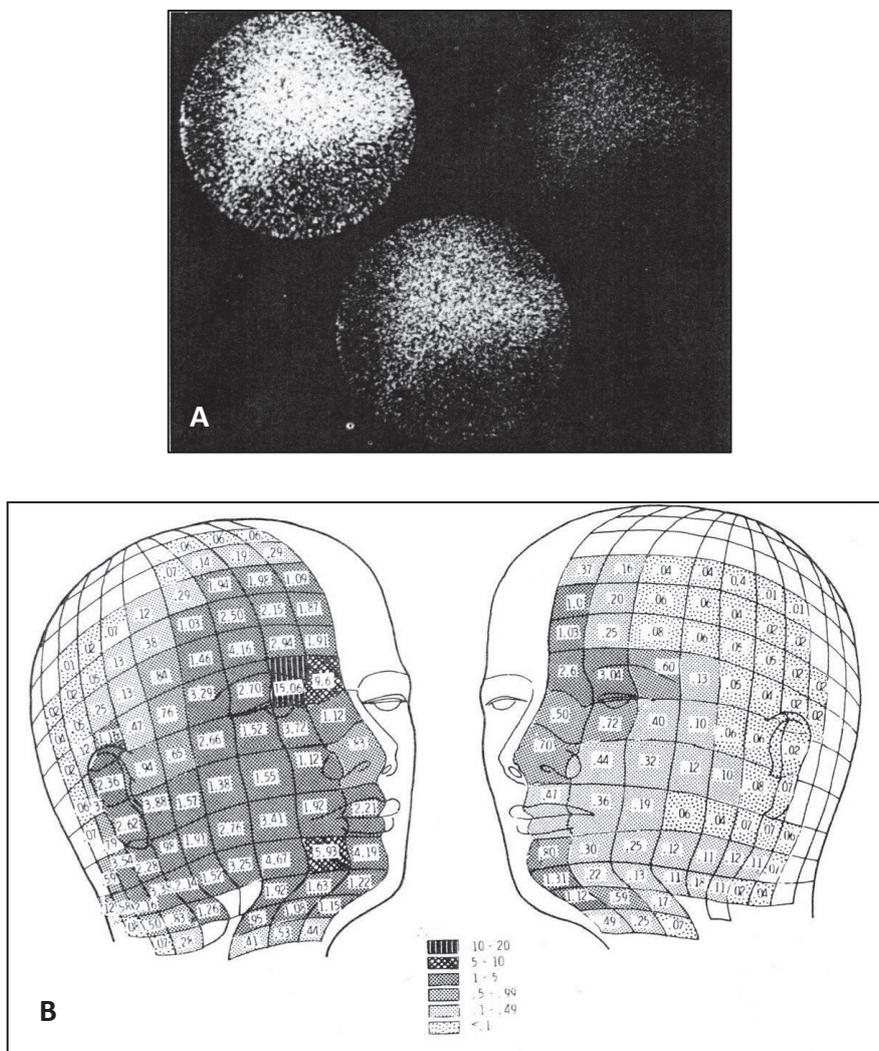
Le plutonium, ayant une période radioactive et une demi-vie biologique longue, va rester dans le corps durant un certain nombre d'années (50 ans). Durant ce temps, il induira différents dommages cellulaires et tissulaires qui se traduiront par différentes pathologies. En effet, certaines expérimentations *in vivo* ont montré qu'une exposition à une forte quantité de plutonium sous différentes formes (oxydes, nitrates...) peut provoquer des maladies respiratoires et des cancers au niveau des organes cibles (os, foie, ganglions lymphatiques) après ingestion et inhalation (Taylor, 1989; Ansoborlo et al., 2009; ATSDR, 2010; Cuttler and Feinendegen, 2015).

Une possible relation entre l'exposition chronique au plutonium et le taux de mortalité a été examinée dans de nombreuses études sur des travailleurs de l'industrie nucléaire (Hanford (U.S), Mayak (Russie) (Gilbert al., 1993; Suslova et al., 2003). Des études sur les travailleurs de Mayak ont démontré que les charges corporelles de plutonium étaient associées à l'augmentation de la mortalité par cancer (foie et du squelette), avec un risque plus élevé chez les femmes par rapport aux hommes (Shilnikova et al., 2003 ; Sokolnikov et al., 2008 ). L'augmentation de fibrose pulmonaire a également été mise en évidence chez les travailleurs exposés au plutonium (Newman et al., 2005). De plus, le risque de mortalité par cancer des poumons a été lié linéairement à la dose de rayonnement au plutonium (Gilbert et al., 2004) .

Trois isotopes de l'américium sont préoccupants du fait de leur demi-vie assez longue, dont l'isotope 241 qui est le plus répandu. Sa demi-vie est de 430 ans et il se désintègre en émettant une particule  $\alpha$  et un rayonnement  $\gamma$ . Les deux autres isotopes (242 et 243) représentent généralement un faible pourcentage de l'américium total sur un site nucléaire.

Le cas d'Harold McCluskey (USTUR Cas 0246), précédemment exposé, constitue une source de données précieuses par les effets cutanés et systémiques rapportés. Dans les années 70, une boîte à gant contenant une colonne échangeuse d'ion, pour le retraitement de l'Am, contenant environ 100 g d'Am-241 explosa au visage de cet agent (ATSDR, 2004). Différentes études, publiées dans une édition spéciale du journal *Health Physics*, ont été réalisées afin d'étudier le contexte, le traitement et le suivi de l'accident (Breitenstein, 1983 ; Jech et al. 1983; McMurray 1983; Robinson et al. 1983, Palmer et al., 1983; Breitenstein et Palmer 1989). De cet accident résulta à une forte contamination cutanée (peau saine et blessée par le verre) et une contamination par inhalation. Une énorme quantité d'activité a été mesurée sur ses vêtements (37–185 GBq), réduite à 37 MBq après une journée de décontamination.

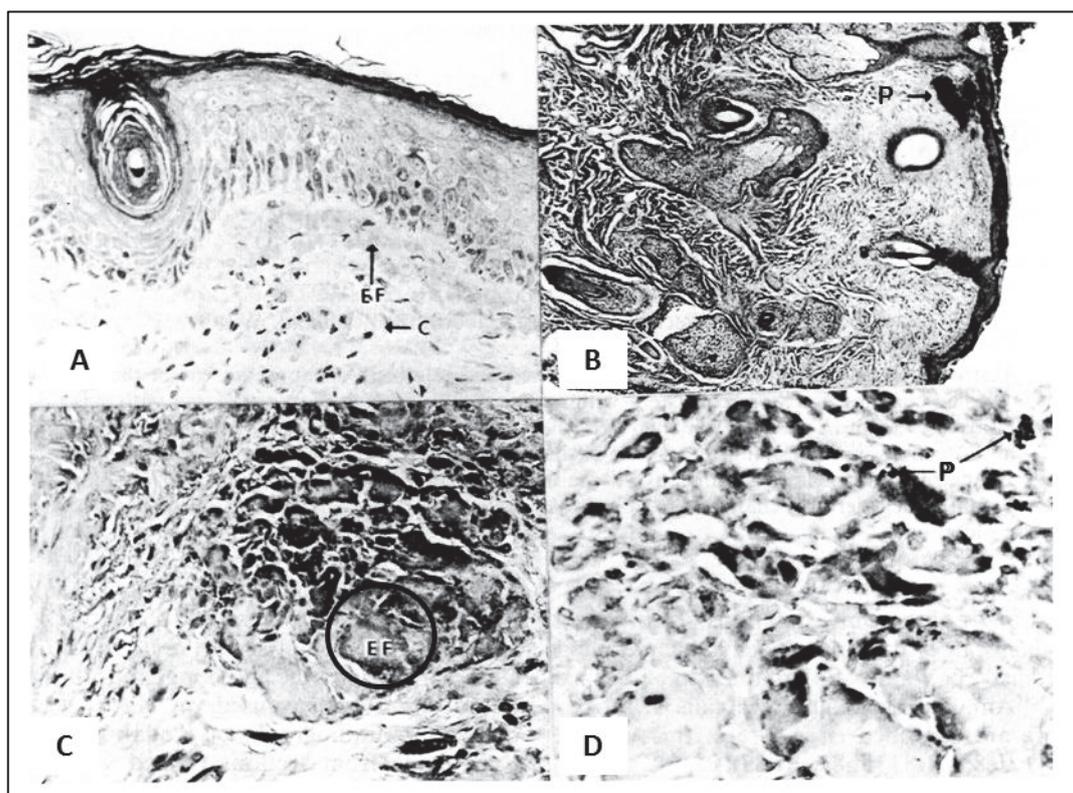
La contamination a été évaluée au cours du temps par différentes techniques : frottis pour le visage (comptage  $\alpha$ ) et comptage direct de 19 points de contrôle sur le corps entier. L'estimation d'activité dans les organes a été réalisée par une méthode par sonde NaI, mesurant les émissions  $\gamma$  et X de l'américium. Ces techniques ont mis en évidence la forte contamination du visage et au niveau du foie (Figure 13, Palmer et al., 1983).



**Figure 13:** Photographie obtenue par  $\gamma$  caméra du foie à trois intensités (A) et répartition de l'activité de l'Am sur le visage (B) ( $\mu\text{Ci}/6.5 \text{ cm}^2$ ) (Palmer et al., 1983)

Des effets significatifs ont été constatés sur l'érythropoïèse avec une diminution de concentration des érythrocytes et donc en hémoglobine. Une carence en leucocytes (neutrophiles et lymphocytes) et en plaquettes perdura 5 ans après l'accident avec des effets cytogénétiques. Différents changements structuraux cutanés ont été également observés. En effet, une hyperplasie des fibres élastiques (Figure 14C), comparé au contrôle (Figure 14A) ainsi qu'un affinement général de l'épithélium ont été observés, majoritairement du côté droit

(Figure 14, B, C et D). Les autoradiographies des tissus du visage contaminés ont révélé de nombreuses particules d'américium (*P*) dans la région sous-épithéliale (Figure 14, D) ainsi que des macrophages chargés de particules dans le derme (Hampton, 1983). Ces observations ont également été relevées dans la plaie contaminée au plutonium chez le rat *in vivo* (Griffiths et al., 2014a). Un nombre important de cellules immunitaires comme des mastocytes et des éosinophiles ont été retrouvés des deux côtés du visage. Mais certains dommages cutanés ont probablement été provoqués par la multitude de facteurs associés à la contamination à l'américium (acide nitrique, résine de la colonne, traitement répétitif au DTPA).



**Figure 14:** Images de la peau d'un témoin (A) et du patient contaminé (B,C,D)

A. Histologie d'un patient avec le même historique = contrôle (âge, exposition UV...) (Hampton, 1983) avec *EF* : Fibre élastique ; *C* : vaisseau sanguin

B, C et D. Autoradiographie par émulsion des tissus cutanés sous différents grossissements (Hampton, 1983) (x250 et x750) avec *P* : particules

L'homme décéda 11 ans après l'accident et l'autopsie révéla des fibroses osseuses ainsi qu'une atrophie de la moelle osseuse (Priest et al., 1995). Cependant, ces modifications n'ont pas formellement été associées à la dose estimée durant l'accident (Filipy et al., 1995).

## 2.6. Radioprotection - Risque radiologique

Suite à une contamination par des actinides, une fraction de ces composés radioactifs est retenue au niveau de la voie d'entrée (poumons, peau ...) et le reste est transféré dans le sang ou la lymphe. Bien que la peau constitue une barrière efficace contre l'entrée de nombreuses substances dans le corps, certaines formes physico-chimiques de radiocontaminants diffusent assez rapidement à travers la peau selon leur forme physico-chimique (ICRP 48, 1986), comme exposé précédemment (§2.4).

Les actinides sont distribués dans l'organisme par la circulation générale et se déposent dans certains organes de rétention, majoritairement le foie et l'os pour l'Am et le Pu, qui sont alors exposés aux rayonnements émis par ces derniers. Une partie de ces radionucléides incorporés est excrétée par les voies naturelles (urine et fèces). Il est donc essentiel d'évaluer le risque sanitaire potentiel lié à cette exposition. Cette évaluation est réalisée par l'estimation de la dose efficace engagée en sievert (mSv ou  $\mu$ Sv). Cette grandeur dosimétrique a été définie par la Commission Internationale de Protection Radiologique (CIPR) (ICRP 54, 1989; ICRP 60, 1991; ICRP 103, 2007) et quantifie l'exposition de l'organisme entier.

Cette dose est calculée à partir de l'interprétation des mesures spectrométriques externes des rétentions d'activité tissulaires et/ou des mesures radiotoxicologiques d'activité dans les excréta. Ce calcul utilise les modèles biocinétiques de la CIPR qui décrivent le comportement des radionucléides dans l'organisme et les modèles dosimétriques qui sont une représentation approchée du corps humain (fantômes) (ICRP 67, 1993; ICRP 110, 2009). La biocinétique des radioéléments est décrite par des compartiments biologiques avec différentes cinétiques de transfert de l'un à l'autre. Un compartiment peut correspondre à un tissu, un organe, plusieurs organes, un état métabolique du contaminant ou une fraction de l'activité dans un organe. Ces modèles biocinétiques sont développés à partir des données expérimentales et humaines. Ils permettent de prédire la distribution tissulaire et l'excrétion des radionucléides en fonction de leur voie d'entrée et de leur forme physico-chimique. Les modèles biocinétiques sont classifiés en deux catégories :

- (i) les modèles d'entrée décrivant le comportement du radionucléide jusqu'à son transfert dans la circulation, en fonction de la forme physico-chimique du radiocontaminant
- (ii) les modèles systémiques décrivant le comportement après transfert et fonction de la nature de l'élément

En cas de contamination de la peau saine ou lésée, une estimation de la dose équivalente en sievert (dose locale) aux cellules basales est réalisée (ICRP 59, 1992). Cette grandeur dosimétrique quantifie l'exposition d'un tissu, d'un organe ou région d'intérêt biologique.

#### 2.6.1. *Peau saine*

Il n'existe pas de modèle d'entrée représentant l'absorption des actinides à travers la peau en raison du large éventail de scénarii d'exposition possibles (aérosols, liquides...). La forme physico-chimique du contaminant tout comme le pH sont des facteurs importants dans le profil de pénétration ainsi que dans l'évaluation de la dose équivalente (ICRP 130, 2015). En effet, comme décrit précédemment certaines formes organiques ou des solutions au pH acide vont pénétrer plus profondément dans la peau. La législation française qui découle des recommandations de la CIPR a fixé la limite annuelle de dose équivalente à la peau à 500 mSv. Selon la publication 60 de la CIPR, il est recommandé d'évaluer la dose peau uniquement lorsque celle-ci est susceptible d'atteindre ou de dépasser 50 mSv à la couche basale de l'épiderme pour le cm<sup>2</sup> le plus contaminé (ICRP 60, 1991; ICRP 103, 2007).

#### 2.6.2. *Blessure*

Dans le cas d'une plaie contaminée, la brèche vasculaire permet le transfert direct de l'agent radioactif dans la circulation sanguine et ainsi sa distribution rapide dans les organes et tissus de rétention. La National Council on Radiation Protection & Measurements (NCRP) a mis au point un modèle d'entrée pour décrire ce transfert en fonction de la forme physico-chimique (NCRP, 2007 ; Guilmette et al., 2007). En raison du manque de données humaines, les valeurs des paramètres du modèle reposent essentiellement sur les données d'expérimentations animales. Ce modèle distingue quatre formes physico-chimiques (soluble, colloïde, particulaire, fragment) et quatre catégories de rétention en cas de composé soluble (faible, modérée, forte et avides). Cinq compartiments sont utilisés pour décrire les états physico-chimiques du contaminant sur le site de la plaie : soluble ; colloïde et matériau intermédiaire ; particules, agrégats et formes liées; particules piégées et agrégats et fragments. Par exemple, la libération de l'actinide du site de la plaie s'effectue par le sang pour les formes solubles et via les ganglions lymphatiques pour les particules.

Après son passage dans la circulation, le comportement de l'élément dépend majoritairement de sa nature et sa fixation dans les organes de rétention peut être rapide. Pour prédire la rétention dans les tissus, le modèle d'entrée est couplé au modèle systémique.

Ce dernier prédit qu'après l'arrivée dans le sang après une injection, correspondant le plus à une voie d'entrée cutanée, le plutonium se répartit majoritairement (80%) dans deux organes : le foie (50%) et le squelette (30%) (ICRP 48, 1986; Leggett, 2003; Ansoberlo et al., 2006). Ces modèles sont dynamiques et évolutifs mais fournissent les outils pour appréhender la problématique de la radioprotection.

En conclusion de cette partie, il apparaît que l'étude de la physiologie de la contamination cutanée par l'américium et le plutonium est complexe. Elle dépend de nombreux facteurs tels que l'activité déposée, la forme chimique, le véhicule (solution aqueuse, organique, particule), le pH, la durée d'exposition, l'étendue de la zone cutanée contaminée, la présence et le type de lésion. Chaque contamination cutanée peut donc être considérée comme un cas particulier, mais certaines tendances peuvent être dégagées. Par exemple, peu importe le scénario, la préoccupation sera d'estimer l'activité fixée (et la dose correspondante) dans la peau et l'activité transférée au niveau systémique. La pénétration systémique sur peau saine reste faible pour ces actinides pour les formes modérément solubles (nitrate) et insolubles (oxydes), mais elle est considérablement augmentée en cas de formes solubles (citrate, solution organique) et en cas de lésions, quelle que soit la forme.

### 3. La décontamination cutanée radiologique et nucléaire (NR)

#### 3.1. La décontamination cutanée : généralités

##### 3.1.1. *La contamination interne, externe et l'irradiation : généralités*

Il subsiste une grande confusion dans le public lorsque l'on parle de contamination externe, interne et d'exposition aux rayonnements ionisants  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (irradiation). Les deux phénomènes sont liés mais il est important de les distinguer. En effet, la contamination correspond au dépôt d'un matériel radioactif sur la peau, les cheveux ou les vêtements d'une personne (contamination externe) ou à son incorporation dans l'organisme par inhalation, ingestion ou à travers une blessure (contamination interne) (Hendee, 1986). Les victimes contaminées requièrent une attention particulière car elles conservent la source de rayonnement qui doit être retirée pour limiter la propagation de la contamination et diminuer l'exposition de la personne aux rayonnements (Bushberg et al., 2007). Une personne n'est pas contaminée si elle a seulement été irradiée. L'exposition signifie que le corps a absorbé l'énergie de particules pénétrantes ou de photons émanant d'une source radioactive qui peut être externe. A la fin de l'exposition, la personne irradiée ne présente pas de risque pour les autres personnes et les précautions de radioprotection ne sont pas nécessaires (REAC/TS, 2013). Cependant, l'irradiation peut également résulter du rayonnement issu des solutions ou des particules radioactives, contaminant les vêtements et le corps ou internalisés dans l'organisme (Jarrett et al., 2007).

##### 3.1.2. *La décontamination cutanée nucléaire et radiologique (NR) : historique*

Dans la littérature, on retrouve plusieurs travaux sur la décontamination cutanée nucléaire et radiologique, provenant en majorité de l'Europe de l'Est et du Japon (Stajić et al., 1965 et 1966; Nishiyama et al., 1980). Cependant, le manque d'information technique dans les protocoles (rarement traduits en anglais) ainsi que l'ancienneté des travaux rendent l'utilisation des données presque impossible. Les études utilisables ont été réalisées pour la plupart d'entre elles sur souris ou sur rat, qui ne sont pas les modèles les plus pertinents au niveau de la structure et physiologie cutanée. La décontamination chimique est quant à elle beaucoup plus étudiée, en particulier pour les acides et les agents chimiques de guerre (CWA) (Wagner et al., 2007; Bjarnason et al., 2008 ; Salerno et al. 2016; Rolland et al., 2013).

Les données récoltées ne sont plus suffisantes au vu des besoins actuels. Cependant, ces dernières années, on a pu voir un regain d'intérêt pour cette problématique, notamment grâce à la découverte de nouvelles formules ou de nouveaux produits de décontamination (Abergel et al., 2010; Spagnul et al., 2010; Rana et al., 2012).

### *3.1.3. La décontamination cutanée NR : principe général*

La décontamination correspond à l'élimination sans risques d'une substance dangereuse sur les surfaces où elle est fixée ou à sa transformation en substance inoffensive (Khan et al., 2012). Plus précisément, cette action vise à éliminer et/ou à neutraliser, partiellement ou totalement, un ou des agents NRBC présents à la surface cutanée, sans renforcer les effets délétères de ces agents éventuellement présents sur et dans la peau au moment de la mise en œuvre du dispositif de décontamination (AFNOR, 2016). Pour le volet NR, la mise en œuvre de cette procédure consiste à nettoyer la peau par des lavages à l'eau ou par l'action de produits décontaminants plus spécifiques, afin d'éviter les brûlures radiologiques (émetteur  $\beta$  ou  $\gamma$ ), une éventuelle contamination interne et la dispersion de la contamination dans l'environnement.

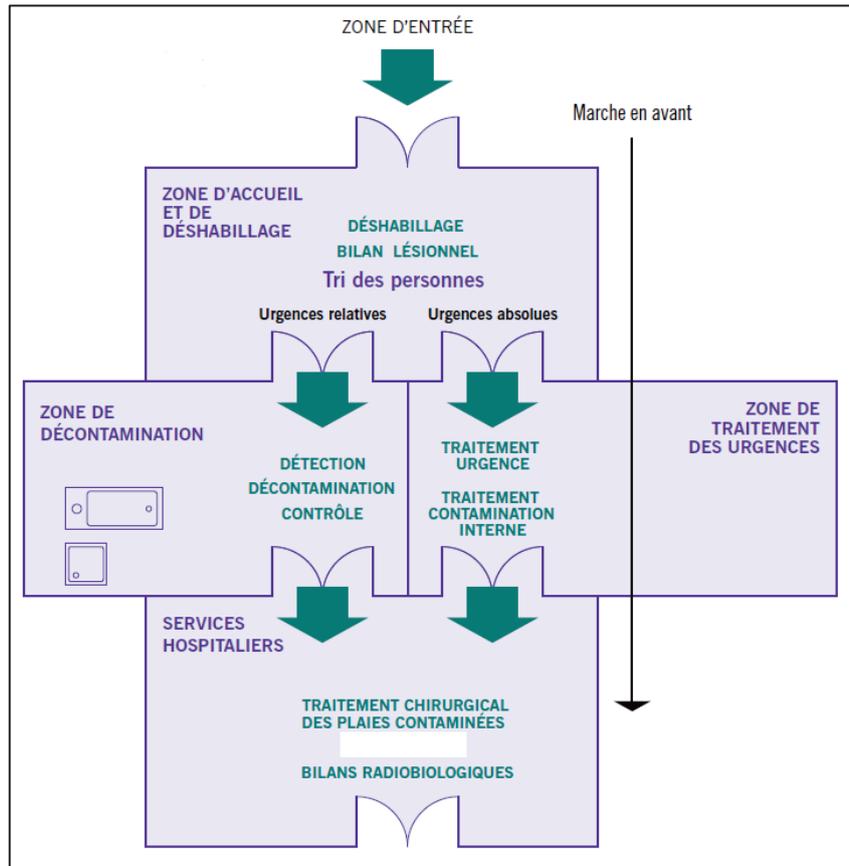
Il existe de nombreux protocoles et guides indiquant la démarche à suivre pour la décontamination des radioéléments de la peau (TMT handbook, ASN...) avec l'utilisation de produits différents en fonction de l'établissement, du corps de métier ou du pays. En effet, le service médical d'une industrie nucléaire n'aura pas les mêmes besoins et la même procédure qu'un pompier sur les lieux d'un accident de masse. Cependant, tous ont des points communs qui sont énumérés dans la prochaine section et nous nous focaliserons uniquement sur les actinides (Pu, Am).

## **3.2. Gestion sur le terrain**

Quel que soit l'endroit et le contexte, le premier geste à adopter en cas de contamination radioactive est d'enlever le vêtement (si présent) et le lavage à l'eau et au savon (si accessible). En cas d'incident impliquant une ou plusieurs personnes dans le cadre de l'industrie, le service médical prendra par la suite en charge les patients avec application des procédures recommandées par l'ASN en cas de contamination interne et externe par administration d'acide diéthylène triamine penta acétique (DTPA) (ASN, 2008).

Dans le cadre d'un incident de masse, ce cadre est bouleversé car aucune structure n'existe et elle doit être installée. Les primo intervenants doivent s'équiper en fonction du contaminant

(aérosols, radioélément diffusible par voie transcutanée...) et une zone de triage en fonction de l'urgence vitale doit être mise en place (blessure, irradiés, contaminés...) (Figure 15). Il est préférable de pouvoir récupérer les eaux contaminées, mais cela impose un dispositif particulier de cuve, souvent peu réalisable. La contamination radioactive n'engage pas immédiatement le pronostic vital. C'est pourquoi l'urgence médico-chirurgicale avec stabilisation des paramètres vitaux prime avant la procédure de décontamination externe (ASN, 2008).



**Figure 15:** Schéma illustrant le principe de marche avant pour les 2 grandes catégories d'urgences à considérer après le tri (ASN, 2008)

Néanmoins, il est nécessaire de prendre en compte et d'appliquer la procédure de décontamination notamment par le fait que la contamination radioactive a un impact psychologique considérable sur la victime en raison du manque de connaissances et de la peur de contaminer les autres. Une fois identifiée comme potentiellement contaminée, la victime va passer par trois points de contrôle : détection, décontamination et détection de contrôle. Des dispositions sont prises pour que dans la zone de décontamination, les actions de

détection et de contrôle soient géographiquement séparées afin de confiner et restreindre une éventuelle dispersion de la contamination.

Elles doivent permettre dans tous les cas une intervention médicale rapide, en cas d'aggravation secondaire d'une victime (arrêt cardiaque, difficulté respiratoire...). La décontamination doit être effectuée le plus rapidement possible, mais n'a pas le caractère immédiat de la décontamination chimique ou biologique, sauf dans les cas extrêmes où la contamination est suffisante pour causer des effets déterministes (TMT, 2009).



**Figure 16:** Procédure de déshabillage et de traitement d'une victime debout (TMT, 2009)

Pour toute personne suspectée de contamination, un traitement d'urgence doit être mis en œuvre (ASN 2008). Un déshabillage codifié de la victime en roulant les vêtements sur eux-mêmes de l'intérieur vers l'extérieur permet de limiter la dispersion des radionucléides présents sur ses habits (Figure 16). Une décontamination générale (douche, lavages non agressifs) de la personne et un traitement au DTPA sera administré dès lors que le ou les 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. Pour la voie cutanée, il est recommandé de verser sur la peau saine ou sur les plaies contaminées une à plusieurs ampoules de DTPA (ASN, 2008). Pour une contamination interne chez l'adulte, l'ASN recommande l'injection intraveineuse lente ou en perfusion en 15 minutes, d'une demi-ampoule de Ca-DTPA (soit 0,5 g) diluée dans 100 à 200 ml de sérum isotonique (NaCl ou glucosé à 5 %). Chez l'enfant, la dose à ne pas dépasser est de 0.5g/jour.

### 3.3. Protocoles et produits utilisés

#### 3.3.1. *Les recommandations nationales et internationales*

Lors d'une contamination cutanée aux actinides, la principale méthode de décontamination consiste en un rinçage de la zone contaminée à l'eau tiède additionnée de savons, neutres ou acides, non agressifs qui peuvent être combinés à des chélateurs. Un nettoyage trop abrasif doit être évité car il peut nuire aux barrières de protection naturelle de la peau et ainsi augmenter l'absorption percutanée par le « wash-in effect » (Moody et Maibach, 2006; NCRP 65, 1980). Cependant, ces recommandations peuvent différer selon les organisations de références (tableau VI).

Par exemple, le guide national de l'ASN préconise en tant que traitement de verser localement une ampoule de DTPA ( $\text{CaNa}_3\text{DTPA}$ , 25 % dans l'eau) sur peau saine ou plaie (ASN 2008). Ce traitement utilisant un chélateur peut être administré uniquement par le corps médical car il est initialement prescrit pour une injection. Ainsi les procédures de décontamination proposées par la majorité des guides (dont l'ASN) restent très générales, et ne prennent pas en compte de façon spécifique le type de radionucléide à l'origine de la contamination.

Pour les orifices et le visage, il faudra alors appliquer des techniques douces afin d'éviter une ingestion ou une inhalation accidentelle. Le rasage des poils est fortement déconseillé car il provoque des micro-lésions cutanées qui favorisent la fixation des radionucléides rendant la décontamination particulièrement difficile (Bérard et al., 2010; Tazart et al., 2013). Après chaque traitement, un séchage rigoureux et une mesure de radioactivité résiduelle seront réalisés afin d'évaluer l'efficacité du traitement, et recommencer le lavage jusqu'à 3 fois maximum s'il reste une contamination résiduelle.

Guides ou recommandations	Peau saine	Peau lésée ou blessure	Visage et orifices	Yeux	Remarques
NCRP 65 (1980) Management of persons accidentally contaminated with radionuclides	Eau + savon Chélateur (EDTA/DTPA) Javel (0.1%) KMnO <sub>4</sub> + bisulfite de sodium	<i>Blessure</i> : eau/sérum physiologique  <i>Abrasion</i> : Détergent + anesthésiant local (lidocaïne 4%)	-	-	*Choix large mais non spécifique
WHO/IAEA (2002) Medical preparedness and response	Eau tiède + savon  détergent légèrement acide	-  <i>Région pharyngale</i> : H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)  <i>Oreille/nez</i> : Sérum physiologique	Sérum  Sérum physiologique	Sérum	*Méthode non spécifique mais ciblée pour certains éléments
ASN (2008) Guide national d'intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique	Eau + savon DTPA (25%) pour contamination résiduelle	DTPA (25%)	-	DTPA 10%	* plus axé sur la décorporation
SCK-CEN, NRP, HPA, WHO, STUK, Enviro and CLOR (2009) (TMT handbook)	Eau tiède + savon ou détergent KMnO <sub>4</sub> + réducteur Javel (1%) Pate abrasive (farine ...)	Sérum physiologique	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)  Sérum physiologique  dentifrice + acide citrique (3%)	Eau stérile  Sérum  physiologique	*très complet avec traitement spécifique en fonction de l'élément

**Tableau VI:** Recommandations nationales et internationales des protocoles de décontamination cutanée des radioéléments

3.3.2. Les produits non spécifiques

Différents produits spécifiques, à utiliser si on a identifié l'élément contaminant, sont également recommandés dans la Figure 17. Les recommandations ne précisent pas un savon spécifique à utiliser lors de la procédure. Certains services médicaux ou de médecine nucléaire utilisent le savon HP derme, TFD peau ou encore la gamme Trait (rouge, bleu, jaune) dont le rouge est spécifiquement recommandé pour la décontamination radiologique. Leur composition est similaire (majoritairement des tensioactifs), mais le pH du trait rouge est plus acide (5.5 contre 6 pour le reste de la gamme). On suppose que sa spécificité pour les contaminations radiologiques réside dans son acidité, permettant de dissoudre les contaminants, et qu'il est plus concentré en tensioactif. D'autres entreprises utilisent quant à elle un savon simple Anios. Pour le lavage au savon, une application d'eau tiède est préférable car l'eau froide aura tendance à resserrer les pores et piéger le contaminant tandis que l'eau chaude va localement accélérer le flux sanguin et donc favoriser une absorption locale (Bérard et al, 2010). L'utilisation de compresses ou de lingettes en mouvement circulaire est conseillée. Cependant, le lavage à l'eau savonneuse peut également contribuer au « wash-in effect » par l'élévation du taux d'hydratation cutanée et une perturbation de l'organisation du *stratum corneum* par les tensioactifs constitutifs des savons (Tymen, 2002a).

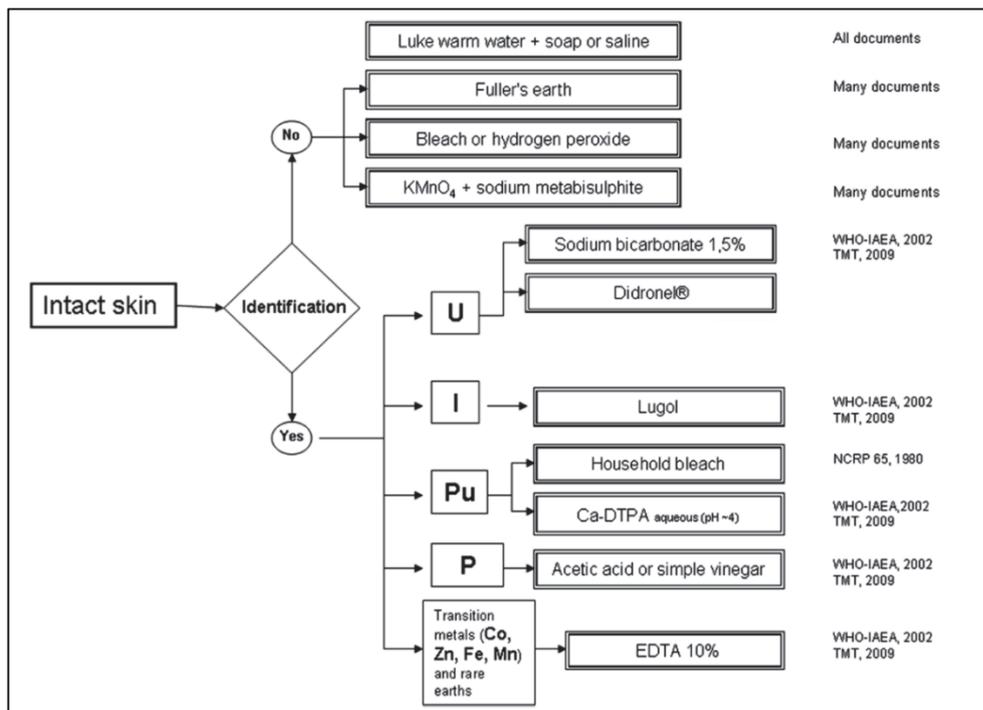


Figure 17: Schéma des décontaminants à utiliser en fonction du scénario de contamination

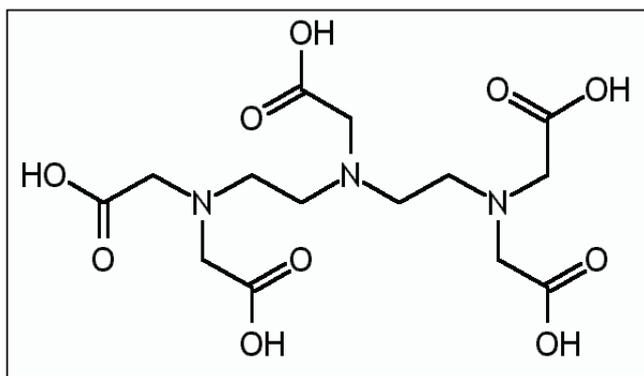
(Tazart et al ., 2013)

La terre à foulon (Fuller's earth) est une terre argileuse se composant principalement de silicates d'aluminium hydratés (minéraux argileux) de composition variable comme la bentonite de calcium (principalement de la montmorillonite). Cette poudre est utilisée majoritairement dans la décontamination chimique (Bjarnason et al, 2008 ; Taysse et al., 2011). Son efficacité sur les radioéléments n'a cependant pas été démontrée dans la littérature.

L'eau de javel ( $\text{NaClO}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sont des solutions oxydantes pour la désinfection et la décoloration. Ils sont recommandées pour une contamination non spécifique mais restent tout de même très irritantes pour la peau et peuvent l'endommager. Le permanganate de potassium ( $\text{KMnO}_4$ , 5%) est recommandé par différents guides en association avec un réducteur comme le métabisulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), du fait du fort pouvoir oxydant du  $\text{KMnO}_4$ . L'agressivité du permanganate de potassium même associé au métabisulfite n'est pas à sous-estimer, c'est pourquoi il est contre indiqué sur peau sensible et/ou fine (visage). De nos jours, ces traitements ne sont plus ou très rarement utilisés.

### 3.3.3. Les chélateurs

Si les lavages avec ces produits non spécifiques ne fonctionnent pas, il est nécessaire de passer à la décontamination par l'utilisation de produits plus spécifiques comme des chélateurs de métaux.



**Figure 18:** Structure du DTPA (Durbin, 2008)

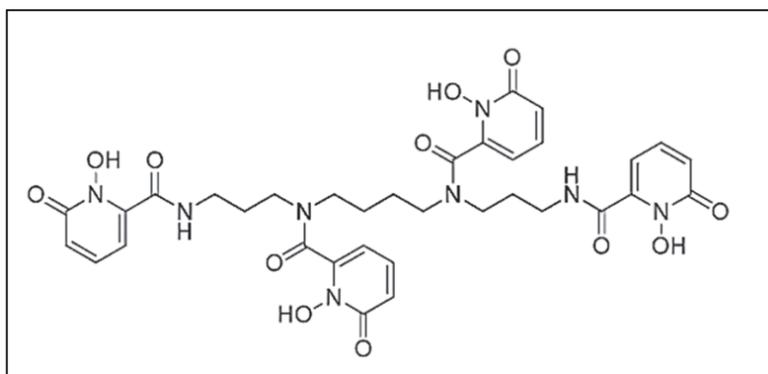
Le Ca-DTPA est un chélateur de métaux comme l'EDTA. Il possède une autorisation de mise sur le marché (A.M.M) et il est prescrit en cas de contamination interne (par inhalation accidentelle, par passage cutané ou plus rarement par ingestion) par le plutonium, l'américium ou le curium. Ces éléments seront naturellement excrétés par l'organisme mais le DTPA (Figure 18) favorise leur excrétion (majoritairement urinaire).

Son efficacité dépend de son affinité avec les actinides. En milieu biologique, il est en compétition avec des complexants endogènes tels que les lipides du *stratum corneum* ou la transferrine systémique (Ansoborlo et al., 2006; ANSM, 2010). Une fois les complexes Actinide:DTPA formés, ils sont éliminés par la filtration glomérulaire rénale. Il est donc crucial que le décontaminant utilisé ne soit pas métabolisable, de sorte que le complexe actinide-décontamination ne se dissocie pas et ne libère pas le radionucléide dans la circulation sanguine et que le décontaminant ou décorporant soit éliminé rapidement.

Différentes expérimentations de toxicologie ont été effectuées durant la procédure d'obtention de l'A.M.M et ont montré que le DTPA n'était pas toxique *in vivo* par intraveineuse. Cependant, son administration en intraveineuse peut mener à l'apparition de carences en métaux essentiels tels que le zinc ou le magnésium en cas de traitement de longue durée (Grappin et al., 2007). De plus, il existe une certaine limite au DTPA. En effet, il n'est pas efficace pour tous les actinides notamment l'uranium et le neptunium. L'efficacité du DTPA a été prouvée pour des formes solubles (nitrate ou chlorure) mais il reste très peu efficace pour des formes insolubles comme les oxydes ou les complexes organiques (TBP). De plus, la période biologique du Ca-DTPA est courte. Au bout de 12 heures après son administration, il est presque entièrement excrété (REAC/TS, 2013). Les connaissances acquises en décorporation conduisent à l'employer en cas de contamination cutanée (peau saine ou plaie) le plus tôt possible après une contamination, en excès pour en obtenir une concentration suffisante afin de piéger chaque radioélément sous forme disponible. Cependant, ce traitement est peu adapté à une situation de terrain en raison du potentiel risque d'étalement de la contamination lorsque l'on déverse l'ampoule. C'est pourquoi il est nécessaire d'explorer d'autres formes galéniques ne nécessitant pas forcément un rinçage à l'eau. De ce fait, il est nécessaire de travailler sur d'autres formes galéniques du DTPA comme une forme gel, afin de faciliter la prise en charge de la décontamination.

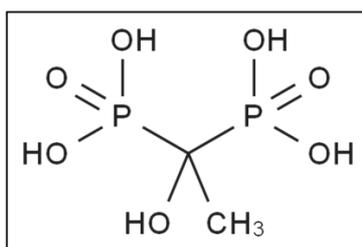
D'autres chélateurs comme LIHOPO (3,4,3-LI(1,2-HOPO)), l'acide carballyl amido bisphosphonique (CAPBP) et l'acide catechol-3,6-bis-méthyliminodiacétique (CBMIDA) ont été à l'étude. Les deux derniers ont été évalués sur des contaminations à l'uranium (plaie ou *in vivo*). Ils se sont avérés tous deux chélateurs de l'uranium avec une efficacité supérieure du CAPBP sur l'excrétion et la rétention (Fukuda et al., 2005, 2007). Le LIHOPO est issu de la famille des sidérophores (synthétisés chez la bactérie) qui peut piéger 6 à 8 moles de Pu contrairement au DTPA qui lui peut fixer uniquement 1 mole de Pu, laissant supposer une

efficacité supérieure du LIHOPO comparé au DTPA (Durbin, 2008). Des études *in vivo* sur des rats contaminés au neptunium ont montré l'efficacité de décorporation du LIHOPO (Figure 19) sur le site de la plaie mais pas après passage systémique, avec même une tendance à favoriser la rétention à fortes doses (Paquet et al., 2000). L'administration de LIHOPO chez le rat par intraveineuse s'est avérée plus efficace dans la décorporation du plutonium que le DTPA (Ramounet-Le Gall et al., 2003). Ce traitement ne possède pas d'A.M.M en France et ne peut donc pas être appliqué en cas de contamination pour le moment, mais reste prometteur (Gorden et al., 2003 ; Abergel et al., 2010 ; Kullgren et al., 2013).



**Figure 19:** Structure du 3,4,3-LI(1,2-HOPO) (Durbin, 2008)

L'acide éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP) (Figure 20), commercialisé sous le nom de didronel®, est un médicament utilisé pour le traitement des résorptions osseuses de la maladie de Paget. Cependant, il s'avère que l'EHBP a une application en radiotoxicologie. En effet, il pourrait être un décontaminant et un décorporant potentiel de l'uranium et du plutonium (Henge-Napoli et al., 1999; Sawicki et al., 2008). Il a été démontré par des études *ex vivo* et *in vivo* qu'il présentait une efficacité de décontamination plus importante que le DTPA après traitement local suite à une contamination au plutonium ou à l'uranium (Tymen et al. 2000b; Ubios et al. 1994). Si la peau n'est pas rincée après application, il est apparu que les complexes actinide-EHBP semblent diffuser davantage vers les couches inférieures de la peau, et plus que les complexes radionucléide-DTPA pouvant alors potentiellement être distribués dans la circulation sanguine (Tymen et al. 2000a).



**Figure 20:** Structure de l'EHBP (Fattal et al., 2015)

Cependant, il reste un problème majeur à ces produits décontaminants car ils nécessitent un rinçage à l'eau. En effet, à Fukushima, les victimes n'ont pas pu être décontaminées sur place du fait que toute l'eau à disposition était contaminée. C'est pourquoi il est nécessaire d'explorer d'autres modes de décontamination et notamment les formes galéniques des chélateurs comme le DTPA.

#### *3.3.4. Mesures en cas de contamination fixée*

Si après les 3 lavages la contamination ne diminue pas ou s'il y a suspicion de pénétration, il faudra alors appliquer un traitement plus spécifique ou appliquer d'autres techniques de décontamination comme la sudation à l'aide de gant ou de pansement occlusif.

Dans le cas d'une contamination fixée, un pansement occlusif avec de l'osmogel peut être appliqué. Il s'agit d'un hydrogel ayant une A.M.M pour le traitement de traumatisme bénin (entorse). Ce traitement n'est pas recommandé mais est appliqué dans certains services médicaux, notamment au CEA. Du fait qu'il est hypertonique, il permet d'établir un gradient osmotique de la concentration la plus élevée en contaminant (intérieur de la peau) vers la concentration la moins élevée (l'extérieur de la peau). Il présente une double action : il va donc promouvoir la décontamination par ce flux et contribuer à la réduction d'une éventuelle inflammation et douleur par son contenu en anesthésique local (lidocaïne 4%).

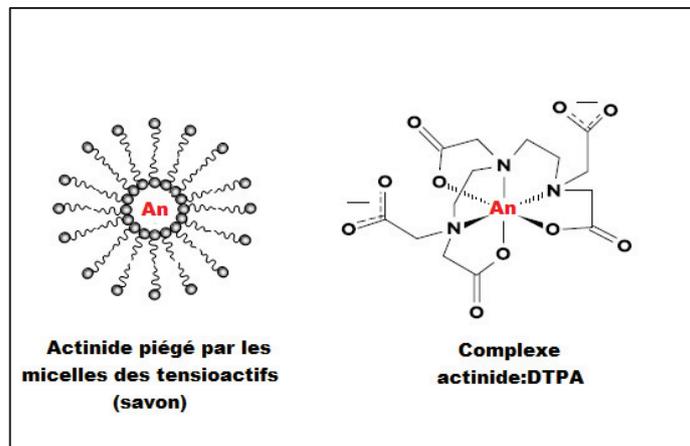
Cependant, il ne peut pas être appliqué sur une plaie. Le pansement occlusif sans aucun traitement peut également être appliqué par simple effet de sudation. Toutefois cette technique est employée dans les cas de contamination difficile avec des formes peu solubles car le pansement étanche empêche l'évaporation, augmente la température et la circulation locale, pouvant potentiellement favoriser une pénétration plus importante. Dans certains cas extrêmes, blessure ou cas de contamination fixée avec une décontamination inefficace, une exérèse des tissus contaminés et cicatriciels peut être réalisée afin de diminuer la dose locale cutanée et éviter la libération de contaminant du site de la plaie au niveau systémique (Figure 21).



**Figure 21:** Cas de contamination cutanée et d'exérèse (Laroche et al., 2010)

### 3.3.5. Mode d'action

Le mode d'action du rinçage à l'eau est simple : le radioélément va diffuser de la surface de dépôt (la peau) dans l'eau de lavage qui est à concentration nulle en radioélément. Cette action est souvent associée à des savons ou des détergents, du fait des tensioactifs qui les composent. En effet, ils possèdent une extrémité hydrophile chargée et une extrémité hydrophobe apolaire constituée par une longue chaîne aliphatique. Les tensioactifs sont donc des molécules amphiphiles capables de former des micelles, par auto-association en tournant leurs extrémités hydrophobes vers l'intérieur et leurs extrémités ioniques vers l'extérieur (Figure 22). Ces dernières piègent le contaminant et seront éliminées au rinçage. La plupart de ces savons ont des pH plus élevés (6.5) que le pH acide cutané (4.5 à 5.5). En effet, ce pH va altérer la couche cornée par un phénomène de dénaturation des lipides, facilitant la décontamination par le décrochage du contaminant et du *stratum corneum* (Tymen, 2002a).



**Figure 22:** Mode d'action du savon et des chélateurs (Exemple du DTPA)

La chélation est l'interaction entre un métal ionisé ou complexé pour le piéger dans son réseau tridimensionnel afin d'empêcher sa fixation à des ligands biologiques potentiels (Figure 25). Le chélateur (EDTA, DTPA) peut disposer de plusieurs sites donneurs et les différences d'efficacité entre chélateurs peuvent s'expliquer entre autres par le nombre de ces sites donneurs. L'utilisation des chélateurs en thérapeutique est basée sur la formation de complexes métalliques difficilement métabolisables mais facilement éliminables (excrétés spontanément dans la circulation sanguine et les liquides interstitiels par exemple). Pour la décontamination des radioéléments, l'EDTA a été délaissé au profit du DTPA plus efficace dans un cadre plus général.

### 3.3.6. *Tests et efficacité des produits*

Il n'existe pas de protocoles et tests officiels montrant l'efficacité de ces produits, excepté pour le DTPA qui possède une A.M.M. La conformité incertaine des tests d'efficacité et le manque d'essai restent un problème majeur. En effet, la plupart des produits sont utilisés et recommandés suite à un retour d'expérience sur un incident isolé où la personne contaminée a utilisé ce dont elle disposait.

Récemment, la norme AFNOR NF X52-122 (AFNOR, 2016) définit des méthodes d'essais permettant d'évaluer l'efficacité d'un dispositif de décontamination de la peau humaine saine après exposition à un agent contaminant de nature NRBC. Ce document d'application volontaire ne vise pas à définir un niveau d'exigence de l'efficacité d'un dispositif de décontamination, mais uniquement à fournir un protocole uniforme permettant une analyse et une comparaison aisée des différents dispositifs. Les protocoles d'essai proposés dans le cadre de cette norme sont issus des guides de recommandations internationales et des pratiques classiquement utilisées par les laboratoires du domaine. Les contextes d'exposition de la peau saine aux agents NRBC cités dans cette norme se limitent aux expositions sur un théâtre d'opérations militaires, en milieu civil (actes malveillants) ou suite à des accidents industriels (explosion, incendie ...), ou à des accidents naturels (séisme). Il exclut la décontamination des muqueuses, des cheveux et de la peau lésée.

Cette norme recommande l'utilisation d'explants cutanés (humains ou animaux) d'environ 1 mm en cellules de diffusion, conformément à la recommandation n° 428 de l'OCDE (OCDE n° 428, 2004). L'intégrité de chaque échantillon de peau utilisé doit être évaluée juste avant la contamination (perte insensible en eau).

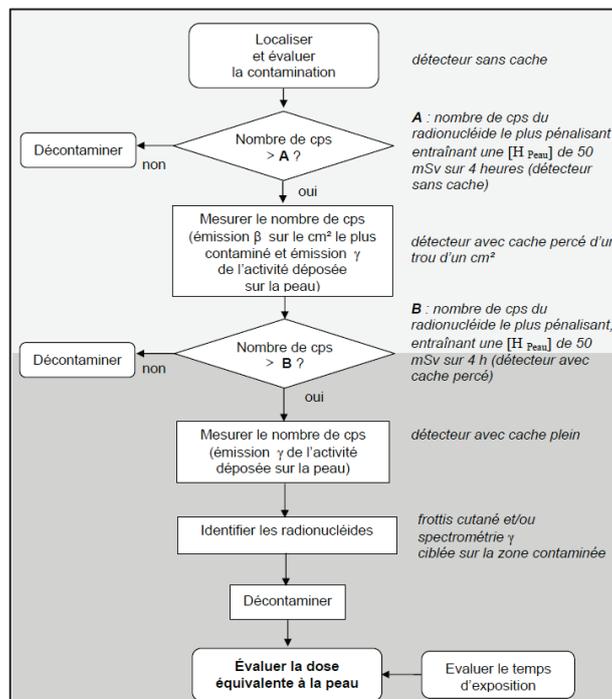
Le nombre d'échantillons cutanés doit être au moins égal à 6, soit provenant de 3 animaux différents avec 2 échantillons par animal. La surface de l'échantillon cutané décontaminé doit être supérieure ou égale à 0.6 cm<sup>2</sup>.

Pour le volet NR, la quantité d'agent déposée sur la peau peut être comprise entre 1 et 10 000 Bq.cm<sup>-2</sup> et doit couvrir de façon homogène la totalité de la surface cutanée exposée (AFNOR, 2016). Les essais d'évaluation de l'efficacité doivent être réalisés conformément au mode d'emploi préconisé par le fournisseur. S'il n'est pas fourni, un protocole présentant plusieurs étapes successives pourra être appliqué avec par exemple lavage, rinçage et séchage.

Dans le cadre de nos travaux, nous suivons les recommandations de cette norme dans les différents tests de décontamination cutanée de l'américium et du plutonium. L'efficacité de décontamination sera confrontée aux résultats obtenus chez les témoins (peau non décontaminée).

### 3.4. Procédure après la décontamination

Les éléments à recueillir avant ou après décontamination pour évaluer une contamination résiduelle ainsi que la dose équivalente à la peau (H<sub>peau</sub>) sont l'activité déposée par cm<sup>2</sup> de peau, le temps d'exposition et l'identification du ou des radionucléides.



**Figure 23:** Recommandations pour évaluer la dose et la contamination résiduelle cutanée (SFRP, 2003)

Deux techniques sont proposées avant décontamination pour identification des radioéléments : une spectrométrie  $\gamma$  ciblée sur la zone contaminée et/ou un frottis de la peau contaminée (Figure 23 ; SFRP, 2003). Pour faciliter cette procédure, un logiciel appelé VARSKIN a été mis au point afin de calculer la dose des radioéléments émetteurs de photons,  $\beta$  et  $\gamma$  (Hamby et al., 2013). Il permet de caractériser la contamination en réglant de nombreux paramètres (isotopie, activité initiale, vêtements ...).

### 3.5. Etudes de décontamination cutanée

Il existe différents cas de décontamination dont les protocoles appliqués ont été décrits au moment de l'incident. Par exemple, dans le cas de contamination de deux étudiants (précédemment décrit), la première méthode employée consista en plusieurs lavages successifs à l'eau et au savon. Cependant, la contamination restait fixée et cette persistance de contamination a été traitée par le port de gants en latex (environ une heure). Après ce traitement, plusieurs compresses imbibées de DTPA en solution aqueuse ont été appliquées. Néanmoins, la contamination persistait toujours et il a donc été décidé d'appliquer le port de gant en latex durant 24 h, afin de provoquer un effet de sudation et d'isoler la contamination. Après retrait du gant et un dernier lavage, la contamination n'était plus présente (RELIR OTHEA).

Pour le cas d'Harold McCluskey, l'activité initiale était plus importante puisqu'elle a été estimée à 11,1 MBq sur le visage. De ce fait, le travailleur a été immédiatement traité par administration de DTPA en intraveineuse (Ca- et Zn-DTPA). Il a également été opéré afin de retirer les corps étrangers issus de l'explosion. Sur le lieu de l'incident, de simples lavages à l'eau ont été réalisés du fait de ses blessures extensives. Sur le site de décontamination d'urgence, le patient a été baigné dans des détergents doux. Durant ces bains quotidiens, deux procédures de décontamination cutanée (rinçage avec 1/3 DTPA + 2/3 sérum physiologique) par jour ont été réalisées pendant la première semaine après l'incident. De plus, les cheveux et les sourcils du patient ont été rasés car la décontamination ne fonctionnait pas. La décontamination a ensuite été par une procédure par jour jusqu'à sa sortie après 5 mois d'hospitalisation (Breitenstein et Palmer, 1989). Le traitement intensif au DTPA en intraveineuse (583g de 1976 à 1980), 2 fois 1g par jour les deux premières semaines puis modulation avec la diminution d'activité, a contribué à diminuer les effets de l'irradiation sur les organes. Ce traitement a permis de délocaliser l'américium de la peau, qui a ensuite été retrouvé au niveau du foie et du squelette. Il a été le premier patient à recevoir un traitement

au Zn-DTPA à titre exceptionnel, dont l'usage n'était pas encore approuvé par la FDA, mais qui est maintenant largement utilisé en tant que contre-mesure médicale de contamination radiologique externe (décontamination) et interne (décorporation).

Une synthèse de Grappin et al., (Grappin et al., 2007) compile les cas de 548 contaminations étalées sur une période de 34 ans au sein des centrales AREVA-CEA. Les auteurs se sont plus particulièrement intéressés au traitement sur le long terme de l'administration en intraveineuse du DTPA suite à une inhalation et/ou à une blessure contaminée. Sur le total de 1168 injections sur 469 cas, uniquement un cas d'effet secondaire a été observé sous forme d'une réaction allergique cutanée, qui se résorba rapidement sans conséquences sur le long terme. Au vu de la toxicité rénale du traitement au DTPA en forte dose chez l'animal, différents paramètres comme la créatinine ont été suivis. Aucun changement des paramètres représentant la fonction rénale n'a été observé. Pour la majorité des cas, l'efficacité maximale du traitement au DTPA se situe entre 15 et 20 jours. Cela s'explique par le cycle du contaminant qui devient de nouveau disponible au niveau systémique, après un certain temps de rétention dans les différents organes cibles. Cette étude a permis de mettre en évidence l'efficacité de certains traitements (dosage, nombre d'injection...) afin d'améliorer concrètement le traitement des individus contaminés dans les services médicaux de ces entreprises.

Dans les travaux de Tymen et al., l'efficacité de décontamination du DTPA et de l'acide éthane-1-hydroxy-1,1-biphosphonate (EHBP) a été déterminée expérimentalement en cellule de Franz sur le plutonium. Les auteurs montrent une forte efficacité de décontamination de l'EHBP, supérieure à celle du DTPA. Après cette étape, il reste de l'activité dans la peau (4%). Dans une autre étude (Tymen et al., 2000b), l'efficacité des précédents décontaminants a été testée sur une poudre de couche cornée, issue de pied humain. La détermination des constantes de répartition a montré que l'eau possède un faible pouvoir de décontamination *in vitro* contrairement au DTPA et l'EHBP. Ces constantes reflètent de l'équilibre de répartition du radioélément entre la solution contaminante et le milieu adsorbant (peau) représenté par la poudre de *stratum corneum* (SC). L'ajout d'un décontaminant sur la peau va modifier cet équilibre de répartition du contaminant avec le SC. Dans ce cas, les constantes montrent une affinité supérieure du DTPA comparé à l'EHBP pour le plutonium, indiquant donc le potentiel de décontamination supérieur du DTPA.

Dans nos travaux, nous avons décidé de tester l'efficacité d'une liste restreinte et sélective de produits excluant ceux possiblement irritants et moins efficaces. C'est pourquoi l'eau, l'eau complémentée d'un savon radiodécontaminant (Trait rouge) et le DTPA ont été choisis car ce sont les traitements les plus recommandés. Ensuite, il a été décidé de tester une forme de décontamination sèche par la terre à foulon, qui n'a pas été testée sur les actinides. L'EHBP et le LIHOPO ont été sélectionnés du fait des données d'efficacité sur l'animal dans la littérature. L'osmogel a été choisi en tant que point de comparaison pour une formulation d'hydrogel contenant du DTPA, qui sera également testée.

## Conclusions

La contamination cutanée représente un mode de contamination très préoccupant dans l'industrie nucléaire ou en cas d'accident de grande ampleur puisqu'elle peut conduire à une exposition interne des individus. Les études menées sur l'américium et du plutonium ont montré que leur absorption à travers la peau intacte se fait en faible quantité dans le cas de forme simple (nitrate), mais peut être beaucoup plus rapide dans le cas de formes plus complexes telles que les formes organiques (mélange de solvants) et plus solubles (citrate). Elle dépend de nombreux facteurs tels que l'activité déposée, la forme chimique, le véhicule (aqueuse, organique, particule) le pH, la durée d'exposition, l'ampleur de la zone contaminée, la présence et le type de blessure. En cas de peau lésée, la barrière cutanée est rompue donc ce passage mènera systématiquement à une contamination interne avec une forte activité au site de la blessure, constituant un réservoir de contamination pour l'organisme.

La prise en charge actuelle des contaminations cutanées par les actinides débute par une décontamination par un rinçage à l'eau savonneuse. Si cette étape ne suffit pas, une solution de DTPA est alors administrée par le service médical (verser localement et/ou en intraveineuse en cas de suspicion de pénétration cutanée) afin d'éliminer la contamination résiduelle de la surface cutanée. Ce traitement n'est pas efficace pour certaines formes fixées sur la peau et pour tous les actinides tels que l'uranium et le neptunium. Il est également peu adapté à une situation de terrain avec un potentiel risque d'étalement de la contamination (ampoule à verser). De plus, le coût de traitement des déchets contaminés, une potentielle pénurie ou une contamination de l'eau sur le site de l'incident, montre le besoin d'un traitement adapté et spécifique pour une situation de terrain.

Dans un premier temps, il a été décidé d'étudier la pénétration de l'américium et du plutonium sous formes aqueuses (nitrate) ou organiques (DMSO et TBP) peu étudiées. Dans un second temps, ces travaux de thèse ont exploré la distribution de la contamination dans la peau ainsi que les éventuels effets de ces différentes formes de solutions d'actinides sur la structure cutanée. Enfin, la décontamination d'une sélection de différents produits a été étudiée afin d'établir un protocole rapide, adaptable à une situation de terrain et de tester une nouvelle forme galénique du DTPA afin de répondre à la problématique de la pénurie ou de la contamination de l'eau.

### Références bibliographiques:

Abergel R.J., Durbin P.W., Kullgren B., Ebbe S.N., Xu J., Chang P.Y., Bunin D.I., Blakely E.A., Bjornstad K.A., Rosen C.J., Shuh D.K., Raymond K.N. Biomimetic actinide chelators: an update on the preclinical development of the orally active hydroxypyridonate decorporation agents 3,4,3-LI(1,2-HOPO) and 5-LIO(Me-3,2-HOPO). *Health Phys.* 2010; 99(3):401-407.

AFNOR (NF X52-122) Sécurité et protection du citoyen - NRBC-E - Protocoles d'évaluation des performances de technologies de décontamination de la peau saine - Janvier 2016.

Agache P. *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*. Editions Médicales Internationales, 2000.

ANSM. Agence Nationale de la Sûreté du Médicament. Groupe de travail Piratox/Piratome. Fiche piratome n°4: Ca-DTPA. (2010) Mise à jour le 23 janvier 2014.

Ansoborlo E., Prat O., Moisy P., Den Auwer C., Guilbaud P., Carriere M., Gouget B., Duffield J., Doizi D., Vercouter T., Moulin C., Moulin V. Actinide speciation in relation to biological processes. *Biochimie.* 2006; 88(11):1605-1618.

Ansoborlo E., Paquet F., Den Auwer C., Moulin V., Gilbin R., Van der Meer A., Bérard P. Chapitre 24 : Plutonium. *Toxicologie nucléaire environnementale et humaine*; Ménager, M.-T.; Garnier-Laplace, J.; Goyffon, M., Eds.; Lavoisier, 2009. p 445-464.

ASN. Guide national d'intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. 2008. [www.asn.fr/index.php/Sinformer/Publications/Guides-pour-lesprofessionnels/Situation-d-urgence/Guide-national-d-intervention-medicaleen-cas-d-evenement-nucleaire-ou-radiologique](http://www.asn.fr/index.php/Sinformer/Publications/Guides-pour-lesprofessionnels/Situation-d-urgence/Guide-national-d-intervention-medicaleen-cas-d-evenement-nucleaire-ou-radiologique). Consulté le 16/10/16

ATSDR. Toxicological profile for americium. 2004. U.S. department of health and human services, Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

ATSDR. Toxicological profile for plutonium. 2010. U.S. department of health and human services, Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Bailey B.R., Eckerman K.F., Townsend L.W. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2003; 105(1-4):509-512.

Barbero A.M. et Frasch H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: A quantitative review. *Tox. in Vitro*. 2009; 23:1-13.

Bauerová K., Kassai Z., Koprda V., Harangozó M. Contribution to the penetration of radionuclides across the skin. Concentration dependence of strontium through the skin in vitro. *J. Appl. Toxicol.* 2001; 21(3):241-243.

Benson Heather A.E., Watkinson Adam C. *Topical and Transdermal Drug Delivery: Principles and Practice*. 2012. Chapitre 1, 3 et 5.

Bérard P., Michel X., Ménétrier F., Laroche P. Medical management of a cutaneous contamination. *Health Phys.* 2010; 99(4) :572-576.

Bion L., Ansoborlo E., Moulin V., Reiller P., Collins R., Gilbin R., Février L., Perrier T., Denison F., Cote G. Influence of thermodynamic database on the modelisation of americium(III) speciation in a simulated biological medium. *Radiochim. Acta*. 2005; 93(11):715-718.

Bjarnason S., Mikler J., Hill I., Tenn C., Garrett M., Caddy N., Sawyer T.W. Comparison of selected skin decontaminant products and regimens against VX in domestic swine. *Hum. Exp. Toxicol.* 2008; 27(3):253-261.

Bjorklund S., Nowacka A., Bouwstra J.A., Sparr E., Topgaard D. Characterization of Stratum Corneum Molecular Dynamics by Natural-Abundance <sup>13</sup>C Solid-State NMR. *Plos one*. 2013; 8(4):1-11.

Bolzinger M.A., Bolot C., Galy G., Chabanel A., Pelletier J., Briançon S. Skin contamination by radiopharmaceuticals and decontamination strategies. *Int. J. Pharm.* 2010; 402(1-2):44-49.

Bolzinger M.A., Briançon S. et Chevalier Y. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2011; 3:463-478.

Bolzinger M.A., Briançon S., Pelletier J., Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr. Op. Coll. Inter. Sci.* 2012; 17:156-165.

Breitenstein B.D. 1976 Hanford americium exposure incident: Medical management and chelation therapy. *Health Phys.* 1983; 45(4):855-866.

Breitenstein B.D., Palmer H.E. Life follow-up of the 1976 americium accident victim. *Radiat. Prot. Dosim.* 1989 ; 26(1/4):317-322.

Buisson Y., Cavallo J-D., Kowalski J-J. et al. Les Risques NRBC, Savoir Pour Agir. Edition Xavier Montauban, 2004, 300 pages.

Bunn M., Malin M.B., Roth N., Tobey W.H. Preventing nuclear terrorism. (2016) Belfer Center. Page 4. <http://belfercenter.ksg.harvard.edu/files/PreventingNuclearTerrorism-Web.pdf>  
Consulté le 03/10/16

Bushberg J.T., Kroger L.A., Hartman M.B., Leidholdt E.M. Jr, Miller K.L., Derlet R., Wraa C. Nuclear/radiological terrorism: emergency department management of radiation casualties. *J. Emerg. Med.* 2007; 32(1):71-85.

Carbaugh E.H., Lynch T.P., Antonio C.L., Medina-Del Valle F. Twenty-four years of follow-up for a Hanford plutonium wound case. *Health Phys.* 2010; 99(4):483-494.

CDC. Radiation emergencies. Radioisotope Brief : Americium 241. 2004.

Charles M.W. The skin in radiological protection--recent advances and residual unresolved issues. *Radiat Prot. Dosimetry.* 2004; 109(4):323-330.

Cotton S. 1991, Lanthanides and actinides, Mac Millan Ed., Physical Science Series.

Crickx B., BonnetBlanc J.M., Guillaume J.C. Comprendre la peau. Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes. *Ann. Dermatol. Venereol.* 2005; 132:8S3-104.

Cuttler J.M., Feinendegen L.E. Commentary on inhaled <sup>239</sup>PUO<sub>2</sub> in dog — A prophylaxis against lung cancer? Dose-Response. 2015; 13(1).pii: dose-response.15-003.

Desai P., Patlolla R.R., Singh M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Mol. Membr. Biol.* 2010; 27(7):247-259.

DGS. Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes. Direction générale de la santé. 2014. Aide à l'organisation de l'offre de soins en situations sanitaires exceptionnelles. [http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/organisation\\_offre\\_de\\_soins\\_ok\\_bd.pdf](http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/organisation_offre_de_soins_ok_bd.pdf)  
Consulté le 28/11/16

Dublineau I., Grison S., Grandcolas L., Baudelin C., Tessier C., Suhard D., Frelon S., Cossonnet C., Claraz M., Ritt J., Paquet P., Voisin P., Gourmelon P. Absorption, accumulation and biological effects of depleted uranium in Peyer's patches of rats. *Toxicology*. 2006; 227(3):227-239.

Durbin P.W. Lauriston S. Taylor Lecture: the quest for therapeutic actinide chelators. *Health Phys*. 2008; 95(5):465-492.

Eucerin.fr. Structure et fonctions de la peau. <http://www.fr.eucerin.be/a-propos-de-la-peau/principes-de-base/structure-et-fonction-de-la-peau>. Consulté le 01/12/16

Farina R., Brandao-Mello C.E., Oliviera A.R. Medical aspects of  $^{137}\text{Cs}$  decorporation: the Goiania radiological accident, *Health Phys*. 1991; 60(1):63-66.

Fattal E., Tsapis N., Phan G. Novel drug delivery systems for actinides (uranium and plutonium) decontamination agents. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015; 90:40-54.

Filipy R.E., Toohey R.E., Kathren R.L., Dietert S.E. Deterministic effects of  $^{241}\text{Am}$  exposure in the Hanford americium accident case. *Health Phys*. 1995; 69(3):338-345.

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*. 2005; 89(1):81-88.

Fukuda S., Ikeda M., Nakamura M., Yan X., Xie Y. Effects of pH on du intake and removal by CBMIDA and EHBP. *Health Phys*. 2007; 92(1):10-14.

Gilbert E.S., Cragle D.L., Wiggs L.D. Updated analyses of combined mortality date for workers at the Hanford site, Oak Ridge National Laboratory and Rocky Flats Weapons Plant. *Radiation Res*. 1993; 136(3):408-21.

Gilbert E.S., Koshurnikova N.A., Sokolnikov M.E., Shilnikova N.S., Preston D.L., Ron E., Okatenko P.V., Khokhryakov V.F., Vasilenko E.K., Miller S., Eckerman K., Romanov S.A. Lung cancer in Mayak workers. *Radiat. Res.* 2004; 162(5):505-516.

Goldschmidt B., Regnaut P., Prévot I. Un procédé par solvant pour l'extraction du plutonium de l'uranium dans les piles irradiées. (1955) Rapport CEA n°397. 16 pages.

Gorden A.E., Xu J., Raymond K.N., Durbin P. Rational design of sequestering agents for plutonium and other actinides. *Chem Rev.* 2003 Nov;103(11):4207-82.

Gorman-Lewis D., Aryal B.P., Paunesku T., Vogt S., Lai B., Woloschak G.E., Jensen M.P. Direct determination of the intracellular oxidation state of plutonium. *Inorg. Chem.* 2011; 50(16):7591-7597.

Grappin L., Berard P., Ménétrier F., Carbone L., Courtay C., Castagnet X., Le Goff J.P., Neron M.O., Piechowski J. Treatment of actinide exposures: a review of Ca-DTPA injections inside CEA-COGEMA plants. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 2007; 127(1-4):435-439.

Griffiths N.M., Wilk J.C., Abram M.C., Renault D., Chau Q., Helfer N., Guichet C., Van der Meeren A. Internal contamination by actinides after wounding: a robust rodent model for assessment of local and distant actinide retention. *Health Phys.* 2012; 103(2):187-194.

Griffiths N.M., Coudert S., Wilk J.C., Renault D., Angulo J.F., Van der Meeren A. Combined drug and surgery treatment of plutonium-contaminated wounds: indications obtained using a rodent model. *Health Phys.* 2014a; 106(6):638-644.

Griffiths N.M., Coudert S., Molina T., Wilk J.C., Renault D., Berard P., Van der Meeren A. Increased retention of americium in kidneys as compared with plutonium in an actinide wound contamination model in the rat. *Int. J. Radiat. Biol.* 2014b; 90(11):1019-1024.

Grives S., Phan G., Morat G., Suhard D., Rebiere F., Fattal E. Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104(6):2008-2017.

Guillaumont R., Fanghanel T., Fuger J., Grenthe I., Neck V., Palmer D.A., Rand M.H. Update of the Chemical Thermodynamics of Uranium, Neptunium, Plutonium, Americium and Technetium. In Vol.5; OECD Publications: Paris, 2003.

Guilmette R.A., Durbin P.W., Toohey R.E., Bertelli L. The NCRP wound model: development and application. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2007; 127(1-4):103-107.

Hampton J.C. 1976 Hanford americium exposure incident: histologic and autoradiographic observation on skin. *Health Phys*. 1983; 45(4):933-935.

Hamby D.M., Lodwick C.J., Palmer T.S., Reese S.R., Higley K.A., Caffrey J.A., Sherbini S., Saba M., Bush-Goddard S.P. The new VARSKIN 4 photo skin dosimetry model. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2013; 154(3):356–363.

Harding C. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol Ther*. 2004; 17 Suppl 1:6-15.

Harrison J.D., Hodgson A., Haines J.W., Stather J.W. The biokinetics of plutonium-239 and americium-241 in the rat after subcutaneous deposition of contaminated particles from the former nuclear weapons site at Maralinga: implications for human exposure. *Hum. Exp. Toxicol*. 1993; 12(4):313-321.

Hendee W.R. Management of Individuals Accidentally Exposed to Radiation or Radioactive Materials. *Semin. Nucl. Med*. 1986; 16(3):203-210.

Henge-Napoli M.H., 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. *Int J Radiat Biol*. 1999 Nov;75(11):1473-1477.

Herkenne C., Naik A., Kalia Y.N., Hadgraft J., Guy R.H. Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man. *Pharm. Res*. 2006; 23:1850-1856.

Hoath S.B., Leahy D.G. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality, *J. Invest. Dermatol*. 2003; 121:1440-1446.

Houpert P., Muller D., Chazel V., Claraz M., Paquet F. Effect of DTPA on the nephrotoxicity induced by uranium in the rat. *Radiat. Prot. Dosimetry*. 2003; 105(1-4):517-520.

Hostynek JJ. Factors determining percutaneous metal absorption. *Food Chem. Toxicol.* 2003; 41(3):327-345.

ICRP, 1986. The Metabolism of Plutonium and Related Elements. ICRP Publication 48. *Ann. ICRP* 16 (2-3).

ICRP, 1989. Individual Monitoring for Intakes of Radionuclides by Workers. ICRP Publication 54. *Ann. ICRP* 19 (1-3).

ICRP, 1991. 1990 Recommendations of the ICRP. ICRP Publication 60. *Ann. ICRP* 5323 21 (1-3).

ICRP, 1992. The Biological Basis for Dose Limitation in the Skin. ICRP Publication 59. *Ann. ICRP* 22 (2).

ICRP, 1993. Age-dependent Doses to Members of the Public from Intake of Radionuclides - Part 2 Ingestion Dose Coefficients. ICRP Publication 67. *Ann. ICRP* 23 (3-4)

ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on 5359 Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Ann. ICRP* 37 (2-4).

ICRP, 2009. Adult Reference Computational Phantoms. ICRP Publication 110. *Ann. ICRP* 39 (2).

ICRP, 2015. Occupational Intakes of Radionuclides: Part 1. ICRP Publication 130. *Ann. ICRP* 44(2).

Ignatavicius D.D., Workman M.L. *Medical-surgical Nursing: Critical Thinking for Collaborative Care.* 2012. 4<sup>th</sup> edition. 1948 pages.

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 Res. Technol.* 2007; 13:19-24.

Jarrett D.G., Sedlak R.G., Dickerson W.E., Reeves G.I. Medical treatment of radiation injuries-current US status. *Radiat. Meas.* 2007; 42:1063-7104.

Jech J.J., Berry J.R., Breitenstein B.D. 1976 Hanford americium exposure incident: External decontamination procedures. *Health Phys.* 1983; 45(4):873-881.

Jensen M.P., Aryal B.P., Gorman-Lewis D., Paunesku T., Lai B., Vogt S., Woloschak G.E. Submicro har X-ray fluorescence imaging of synthetic elements. *Anal. Chim. Acta.* 2012; 722:21-28.

Jung E.C., Maibach H.I. Animal models for percutaneous absorption. *J. Appl. Toxicol.* 2015; 35:1-10.

Khan A.W., Kotta S., Ansari S.H., Sharma R.K., Kumar V., Rana S., and Ali J. Chemical, biological, radiological, and nuclear threats-Decontamination technologies and recent patents: A review. *J. Renewable Sustainable Energy.* 2012; 4(1):012704.

Khodyreva M.A., Sit'ko RIa., Simakov A.V., Andreeva N.A. Distribution of alpha-radionuclides in the skin and body in different types of contamination. *Gig. Sanit.* 1977; (8):57-61.

Khokhryakov V.F., Belyaev A.P., Kudryavtseva T.I., Schadilov A.E., Moroz G.S., Shalaginov V.A. Successful DTPA therapy in the case of <sup>239</sup>Pu penetration via injured skin exposed to nitric acid. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 2003; 105(1-4):499-502.

Lademann J., Richter H., Schaefer U.F., Blume-Peytavi U., Teichmann A., Otberg N., Sterry W. Hair follicles - a long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2006; 19(4):232-236.

Laroche P., Cazoulat A., Bohand S., Schoen V., Bey E., Roche H., Quesne B., Amabile J-C. 2010. The French armed forces health service and management of a plutonium- contaminated patient at Percy Military Hospital, France, 2010. In: Christensen DM, Sugarman SL, O' Hara FM, editors . The medical basis for radiation-accident preparedness. Medical management. Oak Ridge Associated Universities (ORAU) 12-1771. Oak Ridge, TN: ORAU.

Leggett R.W. Reliability of the ICRP's Dose Coefficients for Members of the Public. III. Plutonium as a Case Study of Uncertainties in the Systemic Biokinetics of Radionuclides. *Radiat Prot Dosimetry* 2003; 106(2):103-120.

Luciani A., Polig E., Lloyd R.D., Miller S.C. Americium in the beagle dog: biokinetic and dosimetric model. *Health Phys.* 2006; 90(5):459-470.

Magnusson B.M., Anissimov Y.G., Cross S.E., Roberts M.S. Molecular size as the main determinant of solute maximum flux across the skin. *J. Invest. Dermatol.* 2004; 122(4):993-999.

Mannis D., Brandl A. Efficacy of Common Decontamination Methods for Cleaning Contaminated Wounds. *Health Phys.* 2015; 108:S5-S12.

Martini M-C. Analyse biochimique des lipides épidermiques. *Pathologie Biologie* 2003; 51: 267-270.

Martini M-C. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. Seconde ed. Lassay-les-Châteaux: EMD S.A.S; 2006.

McMurray B.J. 1976 Hanford americium exposure incident: Accident description. *Health Phys.* 1983; 45(4):847-853.

Métivier H. L'Uranium - De l'environnement à l'homme. 2001. EDP Sciences-Collection IPSN. 340 pages.

Métivier H. Radioprotection et ingénierie nucléaire. 2006. EDP Sciences-Collection Génie atomique. 508 pages.

Métivier H. Plutonium : Mythes et Réalités. Chapitre 2 : Le plutonium, découverte et propriétés. 23-40. EDP Sciences. 2010. 23-40.

Moody R.P., Maibach H.I. Skin decontamination: Importance of the wash-in effect. *Food Chem. Toxicol.* 2006; 44:1783-1788.

Morss L.R., Edelstein N.M., Fuger J. The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements. third edition, published by Springer, The Netherlands. 2006.

Newman L.S., Mroz M.M., Ruttenber A.J. Lung fibrosis in plutonium workers. *Radiat. Res.* 2005; 164(2):123-131.

NCRP. Management of persons accidentally contaminated with radionuclides. Bethesda, MD: NCRP; NCRP Report 65; 1980. National Council on Radiation Protection and Measurements. 5481 Bethesda MD.

NCRP. Development of a Biokinetic Model for Radionuclide-Contaminated Wounds and Procedures for their Assessment, Dosimetry and Treatment. Report No. 156. 2007. National Council on Radiation Protection and Measurements, 5481 Bethesda MD.

Nishiyama H., Van Tunen R.J., Lukes S.J., Feller P.A. Survey of <sup>99m</sup>Tc contamination of laboratory personnel: hand decontamination. *Radiol.* 1980; 137(2):549-551.

OCDE. Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Absorption cutanée: méthode in vitro. 428 (2004) OECD, Paris.

Palmer H.E., Rieksts G.A., Icyan E.E. 1983. 1976 Hanford americium exposure incident: In vivo measurements. *Health Phys.* 1983; 45(4):893-910.

Paquet F., Montègue B., Ansoborlo E., Hengé-Napoli M.H., Houpert P., Durbin P.W., Raymond K.N. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for reducing neptunium retention in the rat after simulated wound contamination. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000; 76(1):113-117.

Patarin L. Le cycle du combustible nucléaire. Partie IV: Gestion du combustible utilisé par retraitement. Chapitre 9 : Eléments de chimie du retraitement. EDP Sciences. Collection : Génie Atomique. 2002; 89-99.

Petitot F., Gautier C., Moreels A.M., Frelon S., Paquet F. Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin. *Radiat. Prot. Dosimetry.* 2007; 127(1-4):125-130.

Poinsot C., Warin D. Le recyclage des actinides présents dans les combustibles nucléaires usés. *L'actualité chimique* - août-septembre 2009 - n° 333.

Poinsot C., Geckeis H. Radionuclide Behavior in the Natural Environment: Science, Implications and Lessons for the Nuclear Industry. 2012. Altmaier M. et Vercoouter T.: Aquatic chemistry of the actinides: aspects relevant to their environmental behavior. Chapitre 3, Pages 44-69.

Poisson C., Stefani J., Manens L., Delissen O., Suhard D., Tessier C., Dublineau I., Guéguen Y. Chronic uranium exposure dose-dependently induces glutathione in rats without any nephrotoxicity. *Free Radic. Res.* 2014; 48(10):1218-1231.

Polig E. Kinetic model of the distribution of  $^{239}\text{Pu}$  in the beagle skeleton. *Health Phys.* 1989; 57(3):449-460.

Priest N.D., Freemont A., Humphreys J.A.H., Kathren R.L. Histopathology and  $^{241}\text{Am}$  micro distribution in skeletal USTUR case 246. *Health Phys.* 1995; 69(3):330-337.

Pubmed health. Glossary: Skin. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022679/> National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine Bethesda MD, USA. Consulté le 09/01/17.

Ramounet-Le Gall B., Grillon G., Rateau G., Burgada R., Bailly T., Fritsch P. Comparative decorporation efficacy of 3,4,3-LIHOPO, 4,4,4-LIHOPO and DTPA after contamination of rats with soluble forms of  $^{238}\text{Pu}$  and  $^{233}\text{U}$ . *Radiat. Prot. Dosimetry.* 2003; 105(1-4):535-538.

Rana S., Bhatt S., Dutta M., Khan A.W., Ali J., Sultana S., Kotta S., Ansari S.H., Sharma R.K. Radio-decontamination Efficacy and Safety studies on Optimized Decontamination Lotion Formulation. *Int. J. Pharm.* 2012; 434(1-2):43-48.

REAC/TS (2013). Guidance for radiation accident management: The medical aspects of radiation incidents. Mise à jour en 2014 (Radiation Emergency Assistance Center / Training Site, Oak Ridge). <https://orise.orau.gov/files/reacts/medical-aspects-of-radiation-incident.pdf>. Consulté le 14/14/16.

Reddy M.B., Guy R.H., Bunge A.L. Does epidermal turnover reduce percutaneous penetration? *Pharm. Res.* 2000; 17(11):1414-1419.

RELIR OTHEA. Contamination radioactive à l'américium-241 dans un laboratoire universitaire. <http://relir.cepn.asso.fr/index.php/fr/fiches-recherche-a-enseignement-menu-cachour-les-pages-57/94-enseignement/57-contamination-radioactive-amcium-241-dans-un-laboratoire-universitaire.html> Consulté le 05/12/16.

Reuss P. L'énergie nucléaire. 2012. Collection: Que sais-je ? 128 pages.

Robinson B., Heid K.R., Aldridge T.L., Glenn R.D. 1976 Hanford americium exposure incident: Organ burden and radiation dose estimates. *Health Phys.* 1983; 45(4):911-921.

Rolland P., Bolzinger M.A., Cruz C., Josse D., Briançon S. Hairy skin exposure to VX in vitro: effectiveness of delayed decontamination. *Toxicol. In Vitro.* 2013; 27(1):358-366.

Rougier A., Dupuis D., Lotte C., Roguet R., Schaeffer H. The measurement of the stratum corneum reservoir. A predictive method for in vivo percutaneous absorption studies: influence of application time. *J. Invest. Dermatol.* 1985; 84:66-68.

Salerno A., Devers T., Bolzinger M.A., Pelletier J., Josse D., Briançon S. In vitro skin decontamination of the organophosphorus pesticide Paraoxon with nanometric cerium oxide CeO<sub>2</sub>. *Chem. Biol. Interact.* 2016; pii: S0009-2797(16)30165-X.

Sawicki M., Lecerclé D., Grillon G., Le Gall B., Sérandour A.L., Poncy J.L., Bailly T., Burgada R., Lecouvey M., Challeix V., Leydier A., Pellet-Rostaing S., Ansoborlo E., Taran F. Bisphosphonate sequestering agents. Synthesis and preliminary evaluation for in vitro and in vivo uranium(VI) chelation. *Eur J Med Chem.* 2008; 43(12):2768-2777.

Schaefer H., Redelmeier T.E. *Skin barrier-Principles of percutaneous absorption.* Karger; 1996.

Schneider M., Stracke F., Hansen S., Schaefer U.F. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermatoendocrinol.* 2009; 1(4):197-206.

Schulz R.K., Ruggieri M.R. 1981, Uptake and translocation of Neptunium-237, Plutonium-238, Plutonium-239,240, Americium-241 and Curium-244 by a wheat crop. *Soil Science.* 1981; 132(1):77-82.

SFRP, 2003. Evaluation de la dose équivalente à la peau en cas de contamination cutanée. Document EDF Groupe de travail « Dosimétrie cutanée ».

SGDSN. 2011. Secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale. Circulaire n° 800 relative à la doctrine nationale d'emploi des moyens de secours et de soins face à une action terroriste mettant en œuvre des matières radioactives. N° 800/SGDSN/PSE/PPS du 18 février 2011. [http://www.sgdsn.gouv.fr/IMG/pdf/2011\\_02\\_18\\_800-2.pdf](http://www.sgdsn.gouv.fr/IMG/pdf/2011_02_18_800-2.pdf). Consulté le 01/12/16.

Shilnikova N.S., Preston E., Ron E.S., Gilbert ES, Vassilenko E.K., Romanov S.A., Kuznetsova I.S., Sokolnikov M.E., Okatenko P.V., Kreslov V.V., Koshurnikova N.A. Cancer mortality risk among workers at the Mayak Nuclear Complex. *Radiat. Res.* 2003; 159:787-798.

Shin H., Kim J. Development of realistic RDD scenarios and their radiological consequence analyses. *Appl. Radiat. Isot.* 2009; 69:1516–1520.

Sokolnikov M.E., Gilbert E.S., Preston D.L., Ron E., Shilnikova N.S., Khokhryakov V.V., Vasilenko E.K., Koshurnikova N.A. Lung, liver and bone cancer mortality in Mayak workers. *Int. J. Cancer.* 2008; 123:905-911.

Simon G.A., Maibach H.I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations-an overview. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2000; 13:229-234.

Spagnul A., Bouvier-Capely C., Phan G., Rebiere F., Fattal E. New formulation containing calixarene molecules as an emergency treatment of uranium skin contamination. *Health Phys.* 2010; 99(3):430-434.

Spagnul A., Bouvier-Capely C., Phan G., Landon G., Tessier C., Suhard D., Rebière F., Agarande M., Fattal E. Ex vivo decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011; 79(2):258-267.

Stajić J., Milovanović A., Stojanović D., Ralević Z. Decontamination of the skin of laboratory animals by means of decontaminating agents without the use of water. *Vojnosanit. Pregl.* 1965; 22(9):541-543.

Stajić J., Stojanović D., Milovanović A. Decontamination of skin contaminated with artificial radioactive dust. *Vojnosanit Pregl.* 1966; 23(10):584-585.

Summerfield A., Meurens F., Ricklin M.E. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Mol. Immunol.* 2015; 66:14-21.

Suslova K.G., Khokhryakov V.F., Tokarskaya Z.B., Nifatov A.P., Sokolova A.B., Kudryavtzeva T.I., Miller S.C., Krahenbuhl P. The effect of state of health on organ distribution and excretion of systemic plutonium in the Mayak workers. *Radiat. Protect. Dosimetry.* 2003; 105(1–4):229–233.

Taylor D.M. The biodistribution and toxicity of Plutonium, Americium and Neptunium. *Sci Total Environ.* 1989; 83:217-225.

Taysse L., Dorandeu F., Daulon S., Foquin A., Perrier N., Lallement G., Breton P. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse (II): effects of some currently used skin decontaminants (RSDL and Fuller's earth) against liquid sulphur mustard and VX exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 2011; 30(6):491-498.

Tazart A., Bérard P., Leiterer A., Ménétrier F. Decontamination of radionuclides from skin: an overview. *Health Phys.* 2013; 105(2):201-207.

Teichmann A., Jacobi U., Weigmann H.J., Sterry W., Lademann J. Reservoir function of the stratum corneum : development of an in vivo method to quantitatively determine the stratum corneum reservoir for topically applied substances. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2005; 18(2):75-80.

Tfaily S., Gobinet C., Josse G., Angiboust J.F., Manfait M., Piot O. Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. *Analyst.* 2012; 137(16):3673-3682.

TMT handbook: Triage, Monitoring and Treatment of people exposed to ionizing radiation following a malevolent act, consortium members of a European Commission program, SCK-CEN, NRPA, HPA, WHO, STUK, EnviroS and CLOR Oslo, Norway: Lobo Media AS; 2009. <http://www.tmthandbook.org/>. Consulté le 14/12/16.

Tran Minh B., Crehange G., Cazoulat A., Laroche P., Schoulz D., Gerasimo P. Percutaneous absorption of metallic cations: uranium particulates. *Ann. Pharm. Fr.* 1999; 57(6):462-467.

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.* 2000a; 76(10):1417-1424.

Tymen H., Hoffschir D., Gerasimo P., Marty J.P. Efficiency of etidronic acid in the case of cutaneous radiocontamination by actinide elements: in vitro evaluation. *Ann. Pharm. FR.* 2000b; 58(6):405-413.

Tymen H. Contribution à l'étude de la contamination externe par des produits radioactifs : contamination cutanée par les cobalts radioactifs sous forme soluble et décontamination. Thèse de pharmacie. (2002a), 272 pages.

Ubios A.M., Braun E.M., Cabrini R.L. Lethality due to uranium poisoning is prevented by ethane 1 hydroxy 1.1. biphosphonate (EHBP). *Health Phys.* 1994; 66(5):540-544.

Vitorges P. Chimie des actinides. *Techniques de l'Ingénieur*; 1999. <http://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42457210-bn3520for.pdf>. Consulté le 14/12/16.

Wagner G.W., Sorrick D.C., Procell L.R., Brickhouse M.D., Mcvey I.F., Schwartz L.I. Decontamination of VX, GD, and HD on a surface using modified vaporized hydrogen peroxide. *Langmuir.* 2007; 23(3):1178-1186.

Wartewig S., Neubert R.H. Properties of ceramides and their impact on the stratum corneum structure: A review. Part 1: Ceramides. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2007; 20:220-229.

Weerheim A., Ponc M. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch. Dermatol. Res.* 2001; 293:191–199.

WHO/IAEA. World Health Organization and International Atomic Energy Agency. EPR medical/T. Medical preparedness and response, Module XV. 2002. Available at [www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/epmedt/StartFiles/Day\\_3-4.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/epmedt/StartFiles/Day_3-4.pdf). Consulté le 01/12/16.

Wilke K., Wepf R., Wittern K.P., Wenck H., Biel S.S. Are sweat glands an alternate penetration pathway ? Understanding the morphological complexity of the axillary sweat gland apparatus. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2006; 19(1):38-49.



## **CHAPITRE II**

---

### **Matériels et méthodes**

---



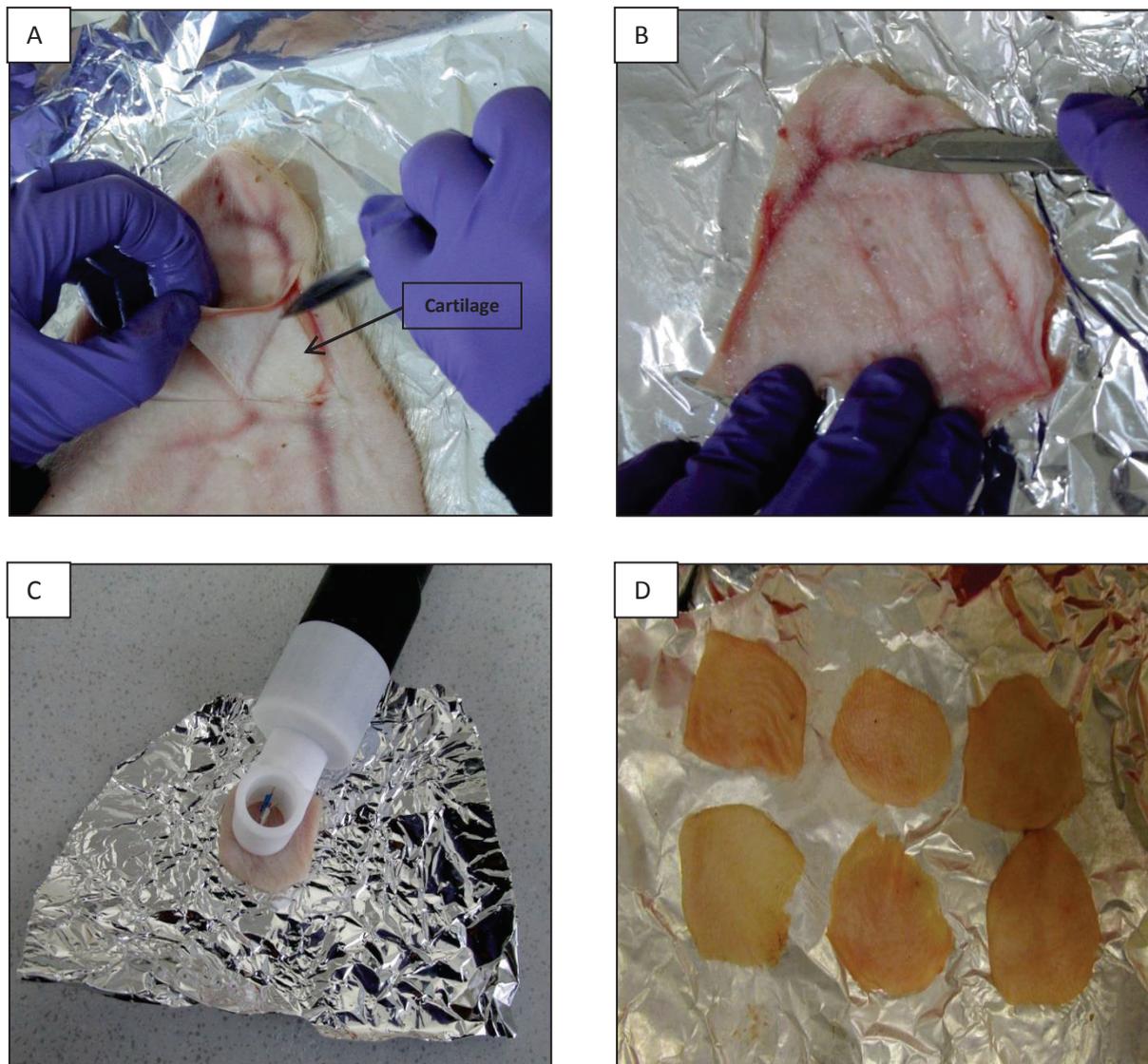
Dans le cadre de ces travaux de thèse, différentes techniques ont été utilisées et seront décrites dans chaque chapitre correspondant (III, IV et V). Afin de faciliter la compréhension de ces travaux, les conditions de travail ainsi que les protocoles de certaines techniques utilisées seront décrits plus en détails dans cette partie.

### **1. Préparation des explants de peaux**

Les études de pénétration et de décontamination ont nécessité la mise en place d'un modèle de peau de porc en cellule de Franz (*ex vivo*), décrit dans la prochaine section. Les oreilles de porcs ont été obtenues auprès des abattoirs Guy Harang (Houdan, 78). Le prélèvement et l'acheminement des oreilles de porc ont fait l'objet d'un contrat avec l'abattoir et un transporteur afin de garantir des conditions optimales d'acheminement jusqu'au laboratoire (température de conservation, délais de transport). Elles ont été récupérées juste après l'abattage des animaux. Les oreilles conservées pour l'étude ne devaient pas présenter de griffures ou de rougeurs. De plus, elles étaient demandées sans traitement d'échaudage préalable, nécessaire en cas de consommation. Une partie des oreilles va être congelée à -20°C pour une utilisation ultérieure (après décongélation) et une partie sera utilisée directement pour une expérimentation le matin même.

La préparation de ces explants a nécessité différentes étapes. Un lavage a été réalisé avec une solution moussante (Savon doux Anios, Laboratoire Anios, France) afin d'éliminer toute trace de boue ou de sang. Les soies ont été coupées à l'aide d'une tondeuse pour animal. Après lavage et rasage, un triangle est découpé sur la partie haute extérieure de l'oreille. Cette partie correspond à la peau la plus fine contenant le moins de graisse comparée à la base de l'oreille. Délicatement, la peau est séparée du cartilage à l'aide d'un scalpel (lame n°23) (Figure 1A). Les restes de cartilage ou de tissu sous cutané sont retirés en grattant délicatement également à l'aide du scalpel (Figure 1B). Une découpe des disques de peau est réalisée d'environ 0.9 cm de diamètre afin qu'ils soient adaptables à la cellule de Franz. La partie supérieure (compartiment donneur) de la cellule de Franz est déposée sur la peau pour être utilisé comme modèle. L'épaisseur de chaque disque est mesurée à l'aide d'un micromètre (Mitutoyo Corporation, France) et uniquement les peaux d'épaisseur de  $1 \text{ mm} \pm 0.2 \text{ mm}$  sont retenues afin d'uniformiser les expériences car l'épaisseur de la peau est un facteur influençant de façon non négligeable la pénétration cutanée. La perte insensible en eau (PIE) est également mesurée (Tewameter TM210, Monaderm, Monaco) car elle permet de déterminer l'intégrité

de la barrière cutanée et les peaux sont retenues si la valeur de PIE  $\leq 15 \text{ g.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  (Figure 1C).



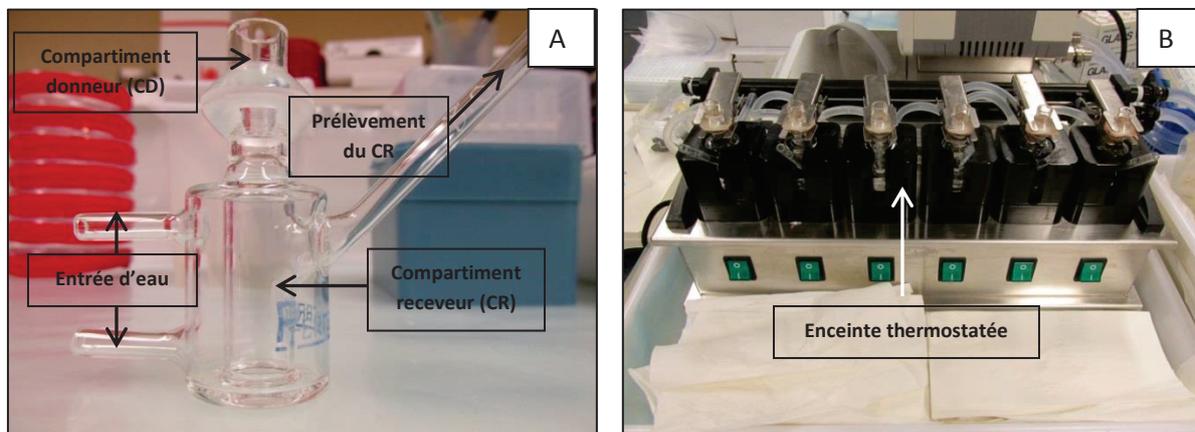
**Figure 1:** Etapes de préparation des explants de peau :

Séparation de la peau et du cartilage (A); Élimination des tissus sous-cutanés et des restes de cartilage (B);  
Mesure de la perte insensible en eau (PIE) (C); Explants prêts à être placés en cellule de Franz (D)

## 2. Contamination et étude de pénétration des actinides dans la peau

Une fois les explants de peau prêts, ils sont placés entre le compartiment donneur et le compartiment receveur de la cellule de Franz (Figure 2A), au préalable rempli de 8 mL de tampon phosphate salin de Dulbecco (PBS sans  $\text{MgCl}_2$  et  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4, Sigma-aldrich) et d'un barreau aimanté. La cellule est ensuite placée sous agitation magnétique dans une enceinte thermostatée à  $35^\circ\text{C}$  par la circulation d'un flux d'eau chaude autour du

compartiment receveur, pour avoir une peau à température physiologique de 32°C (Figure 2B). Après 30 minutes de mise en équilibre des explants à la température, la solution contenant le radioélément est ajoutée.



**Figure 2:** Cellule de Franz (A) et dispositif *ex vivo* et cellule de Franz (B)

Pour ces expériences de pénétration, différentes solutions contaminantes ont été préparées :

- Une solution d'américium ( $^{241}\text{Am}$ ) sous forme nitrate ( $\text{Am}(\text{NO}_3)_3$ ) ( $\text{HNO}_3$ , 2 M)  
*Activité spécifique* :  $1,27 \times 10^{11} \text{ Bq.g}^{-1}$
- Une solution de plutonium ( $^{238}\text{Pu}/^{239}\text{Pu}$ ) sous forme nitrate ( $\text{Pu}(\text{NO}_3)_4$ ) ( $\text{HNO}_3$ , 2 M)  
*Activité spécifique 238* :  $6,34 \times 10^{11} \text{ Bq.g}^{-1}$  *Activité spécifique 239* :  $2,3 \times 10^9 \text{ Bq.g}^{-1}$

A partir de ces solutions mères d'actinides, différentes solutions de travail ont été préparées par prélèvement d'un aliquote, séchage sur plaque chauffante et remise en solution :

- Une solution d'américium ou de plutonium remise en solution dans l'eau
- Une solution d'américium ou de plutonium remise en solution dans l'eau, additionnée de Ca-DTPA (Pharmacie Centrale des Armées (PCA), Fleury les Aubrais, France). Les solutions d'actinides complexés au DTPA ont été préparées pour avoir un rapport Actinide:DTPA de 1:10 afin que chaque radioélément soit complexé, correspondant à un ajout de 111  $\mu\text{l}$  de DTPA (500 mM) pour le plutonium et 16  $\mu\text{l}$  de DTPA (0.5 mM) pour l'américium.
- Une solution d'américium remise en solution dans l'eau et du Diméthyl Sulfoxyde (DMSO, 472301, Sigma-aldrich) (50:50)
- Une solution de plutonium remise en solution dans de l'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ , 4 M) complexée au Tributylphosphate (TBP, 240494, Sigma-aldrich). Pour cela, le TBP a été au préalable nettoyé des impuretés dans une ampoule à décanter avec de l'eau bidistillée, pour récupération de la phase organique et élimination de la phase aqueuse. Cette solution

de TBP pré-équilibré à l'eau a ensuite été utilisée pour préparer une solution à 30% de TBP et 70% de n-dodécane (Rectapur, VWR Chemicals) (v/v). La solution a ensuite été mise en contact avec de l'acide nitrique (4 M), la phase organique récupérée puis mise en contact avec la solution de Pu (4 M) (v/v) pendant au moins 20 minutes. Un aliquote a été récupéré pour comptage de Pu dans la solution organique (Pu-TBP) et aqueuse afin de déterminer le rendement d'extraction.

<b>Solution</b>	<b>Dépôt</b>	<b>Préparation</b>
Pu Nitrate	4 kBq	Evaporation de l'aliquote de la solution mère et remis en solution dans H <sub>2</sub> O
Am Nitrate	4 kBq	Evaporation de l'aliquote de la solution mère et remis en solution dans H <sub>2</sub> O
Pu DTPA	4 kBq	Evaporation de l'aliquote de la solution mère et remis en solution dans H <sub>2</sub> O + <b>111 µl de DTPA (500 mM)</b>
Am DTPA	4 kBq	Evaporation de l'aliquote de la solution mère et remis en solution dans H <sub>2</sub> O + <b>16 µl de DTPA (0.5 mM)</b>
Am DMSO	4 kBq	Evaporation de l'aliquote de la solution mère et remise en solution dans <b>50% DMSO</b>
Pu TBP	4 kBq	Evaporation de l'aliquote de la solution mère et remise en solution dans HNO <sub>3</sub> (4 M) Contact durant 20 min avec le <b>TBP (30% n-dodecane v/v)</b> <b>Récupération finale de la phase organique = Pu-TBP</b>

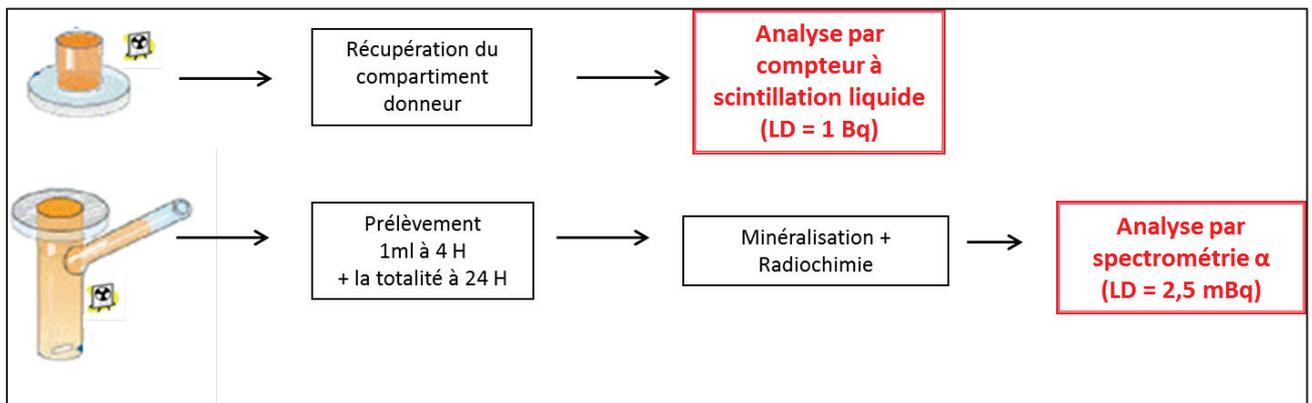
**Tableau I:** Préparation des solutions d'actinides

L'activité de chaque solution a été vérifiée par prélèvement d'un aliquote de 10 µl additionné de 15 mL de scintillant (Ultima gold AB, Perkin Elmer) et compté durant 3 minutes (Tri-Carb 2500, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Un dépôt de 4 kBq a été effectué par cellule pour chaque solution. Après contamination, le compartiment donneur est ensuite fermé par du parafilm. Le système était clôt afin d'éviter l'évaporation de la solution contaminante durant les 24 heures de l'étude, du fait de la forte dépression de la zone et du faible volume engagé (200 à 300 µl). Selon les lignes directrices de l'OCDE (OCDE, 428), les compartiments donneurs doivent être laissés sans occlusion pendant l'exposition. Toutefois, pour certains scénarios, l'occlusion du compartiment donneur peut être envisagée.

### 3. Traitement des compartiments donneur et receveur

Après 24 heures, le compartiment donneur a été récupéré dans un flacon contenant 15 mL de scintillant (Ultima gold AB, Perkin Elmer) pour ensuite être compté durant 3 minutes sur un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb 2500, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

Deux prélèvements du compartiment receveur ont été effectués à 4H et 24H (fin de l'expérimentation). Ils ont ensuite été évaporés sur une plaque chauffante (90-100°C) et minéralisés par ajout d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ , 2 x 2 mL, 2 M) et d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 2 x 1 mL, 30%) jusqu'à transparence de la solution pour être traités en radiochimie.



**Figure 3:** Schéma du protocole de traitement des compartiments de la cellule de Franz

#### 3.1 Analyse par radiochimie des compartiments receveurs

La technique de radiochimie couplée au comptage par spectrométrie  $\alpha$  s'applique à différents types d'échantillons (urines, fèces ...) mais dans notre cas, elle a été utilisée afin de compter l'activité contenue dans le compartiment receveur (CR) de la cellule de Franz après contamination de la peau. En effet, cette technique possède une limite de détection très basse de 2.5 mBq et nous permet de déterminer les faibles activités des actinides. Afin de connaître le rendement chimique de chaque phase et de pouvoir calculer les activités des radioéléments recherchés, des traceurs d'activité et d'émission connue sont ajoutés aux échantillons (Energie  $^{242}\text{Pu}$  : 4901 keV / Energie  $^{243}\text{Am}$  : 5275 keV). Ils ont été obtenus par dilution de sources certifiées (NIST, AEA Technology...).

Après minéralisation, l'échantillon contenant du Pu a été dilué dans 20 mL d'acide nitrique ( $\text{HNO}_3$ , 8 M), 200  $\mu\text{l}$  de traceur et 100 mg de nitrite de sodium ont été ajoutés pour réduire le Pu à la valence (IV). L'échantillon a été laissé sous agitation le plus longtemps possible et au repos durant une nuit afin d'éliminer les vapeurs nitriques. L'échantillon a ensuite été ajouté à une colonne TRU (Eichrom TRU, TrisKem) conditionnée avec de la résine anionique (AG 1-8, 200-400 chloride Bio-rad), suivi de 10 mL de  $\text{HNO}_3$  (8 M) et 10 ml d'acide chlorhydrique (HCl) (8 M).

L'élution de la colonne a été réalisée par ajout de 20 mL d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine ( $\text{HONH}_2$ ) préparée extemporanément (7  $\text{g.L}^{-1}$  dans HCl 0,2 M) et cet éluât a été récupéré dans un flacon séparément.

Pour l'américium, le principe est identique à celui du plutonium avec différents réactifs. L'échantillon a été repris dans 10 mL de solution de nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ , 0,5 M) avec 200  $\mu\text{l}$  de traceur ( $^{243}\text{Am}$ ). Une solution réductrice de sulfate ferreux (0,3 g ammonium-fer II sulfate hexahydraté + 0,3 g sodium formaldéhyde sulfoxylate dihydraté + 10 mL  $\text{HNO}_3$  2 M) a ensuite été ajoutée pour réduire l'Am à la valence (III). Après agitation durant 15 minutes, l'échantillon a été ajouté sur colonnes TRU (Eichrom TRU, TrisKem) conditionnées avec la même résine anionique que le plutonium. La colonne a ensuite été éluée par 5 mL de nitrate d'aluminium, et de 2 x 5 mL de  $\text{HNO}_3$  (1 M). Chaque éluât précédent a été éliminé. La dernière élution avec 10 mL de solution d'oxalate acide d'ammonium (0,1 M) a permis de récupérer l'américium dans un flacon distinct.

Après récupération du dernier éluât contenant l'élément, il a été complété à 50 mL avec de l'eau déminéralisée et le pH ajusté à environ 1.7 par ajout de  $\text{HNO}_3$  ou d'ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) sous agitation magnétique. Une fois le pH ajusté, 1 mL de chlorure de lanthane (100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) et 1 mL d'acide fluorhydrique (HF) à 40% ont été ajoutés. Après 10 minutes de contact, les échantillons ont été filtrés sous vide à l'aide d'une pompe sur filtre Millipore (Nitrocellulose) de porosité 0,22  $\mu\text{m}$  et séchés une nuit à température ambiante. Les filtres ont ensuite été comptés par spectrométrie  $\alpha$  (Ortec Octète PLUS Alpha Spectrometer, detectors ULTRA-AS BU-037-1200-AS) équipées de détecteurs silicium de 1200  $\text{mm}^2$  ou 450  $\text{mm}^2$  de surface durant 1200 minutes ou 4000 minutes pour les faibles activités.

### 3.2 Détermination de l'activité des échantillons

A la fin du comptage, les spectres d'émissions  $\alpha$  du traceur (A) et de l'échantillon (B) sont affichés sur le logiciel comme indiqué dans la figure 4.

L'activité contenue dans l'échantillon est ensuite déterminée grâce à cette formule :

$$A = \frac{N \times At}{Nt}$$

Avec :

N : Nombre de coups dans la zone du radio élément

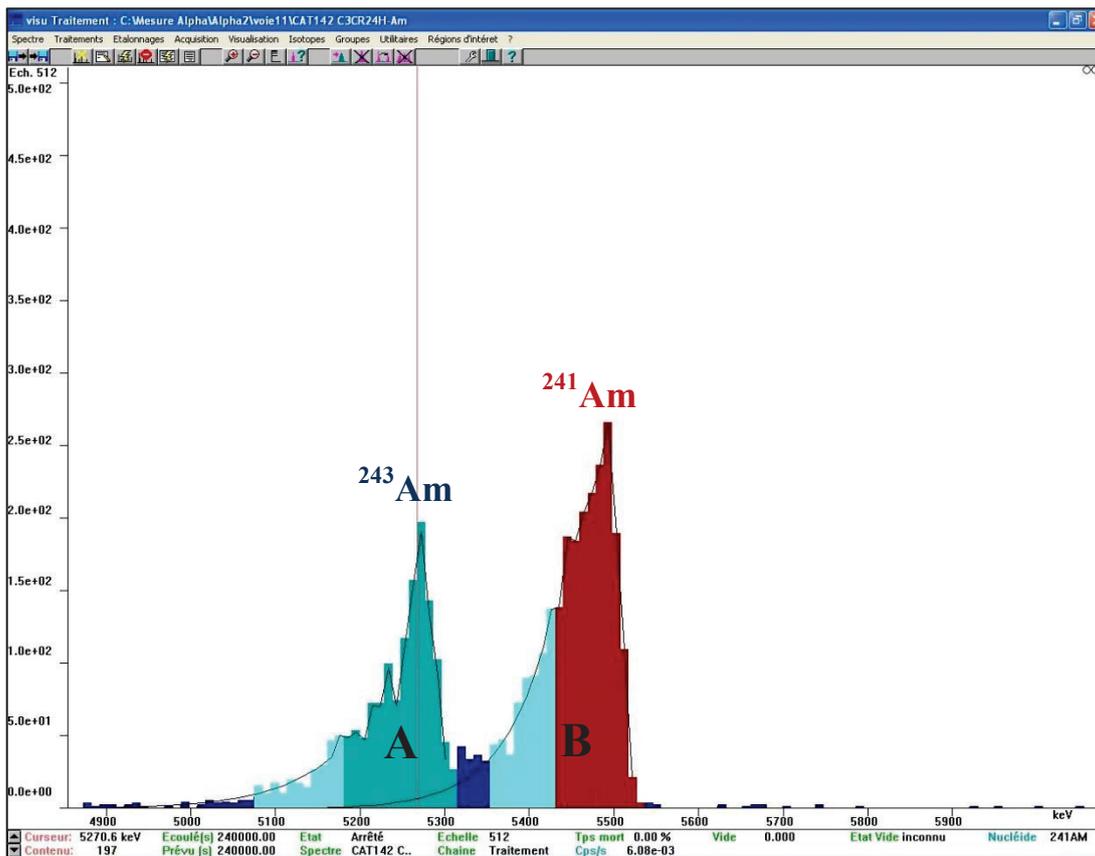
$N^{238}\text{Pu}$  = zone d'émission  $\alpha$  : 5499 keV ;  $N^{239}\text{Pu}$  = zone d'émission  $\alpha$  : 5156 keV ;  $N^{241}\text{Am}$  = zone d'émission  $\alpha$  : 5486 keV

A : Activité de l'échantillon

At : Activité du traceur Bq.mL<sup>-1</sup>

Nt : Nombre de coups dans la zone du traceur

$Nt^{242}\text{Pu}$  = zone d'émission  $\alpha$  : 4900 keV ;  $Nt^{243}\text{Am}$  = zone d'émission  $\alpha$  : 5276 keV



**Figure 4:** Spectre d'émission d'un filtre contenant de l'Américium avec le traceur (A) et l'échantillon (B)

Le calcul des rendements chimiques s'effectue suivant la formule :

$$Rdt (\%) = \frac{Nt \times 100}{t \times Eff \times At}$$

Avec :  
 Nt : Nombre de coups dans la zone du traceur  
 t : Temps de comptage en secondes  
 Eff : Efficacité du détecteur (%)  
 At : Activité du traceur dans l'échantillon en Bq.mL<sup>-1</sup>

#### 4. Traitement des échantillons de peaux :

Pour déterminer leur contenu en radioactivité après 24 heures, les échantillons de peaux ont été séparés en deux couches : le *stratum corneum* (SC) et l'épiderme + le derme (ED) en collant la partie extérieure de la peau sur une lame de verre avec du cyanoacrylate (Super Glue 3 liquide, Loctite) durant 10 minutes. L'épiderme et le derme ont ensuite été décollés à l'aide d'une pince et le *stratum corneum* décollé de la lame de verre à l'aide d'un scalpel (lame n°11). Chaque couche de peau a ensuite été calcinée à 500 °C dans un four (Carbolite GPC 1200) durant un cycle de 54 heures. Les résidus ont ensuite été minéralisés avec de l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>, 2 x 2 mL, 2 M) et de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 x 1 mL, 30%) jusqu'à transparence de la solution. Leur contenu en radioactivité a été déterminé par mesure en scintillation liquide (Tri-Carb 2500, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France) après ajout de 15 mL de scintillant.

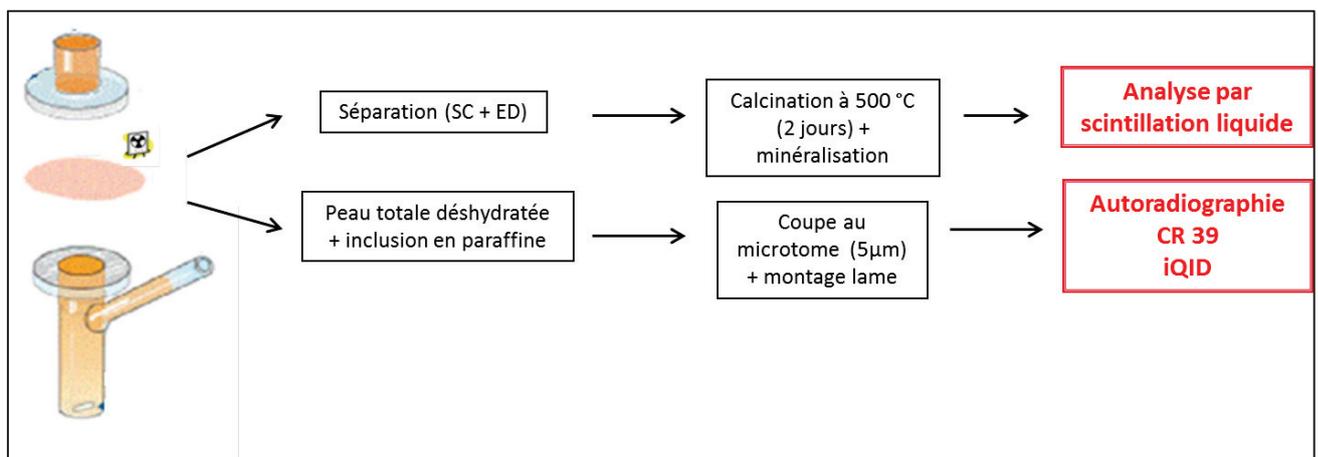


Figure 5: Schéma du protocole de traitement des explants de peau

## 5. Histologie des échantillons de peaux

Pour déterminer la localisation de l'activité dans la peau, les échantillons de peau sont récupérés entièrement après 24 heures sans étape de séparation pour être fixés dans le formol durant 48 heures. Ils ont ensuite été placés dans un automate de déshydratation (Automatic Tissue Processor TP020, Leica, Allemagne) suivant un cycle de 24H allant commençant par un bain d'eau et terminant dans un bain de xylène. Après déshydratation, les échantillons ont été placés en bloc de paraffine et mis au réfrigérateur au minimum 24 heures, jusqu'à refroidissement et solidification complète de la paraffine liquide. Afin de réaliser des coupes (5 à 10  $\mu\text{m}$ ), les blocs contenant les tissus ont été placés dans un microtome (Modèle 2030, Reichert-Jung, Allemagne). Ces coupes ont ensuite été placées dans une coupelle remplie d'eau avec une lame de verre poly-lysine placée au fond, permettant de récupérer les coupes en la remontant. Elles ont été étirées délicatement à l'aide d'une pince afin de retirer les plis. La lame est finalement séchée sur une plaque chauffante à gradient de température puis laissée à l'air libre durant une nuit pour ensuite être traitée par différentes autoradiographies décrites dans les prochains paragraphes.

### 5.1 Autoradiographie par émulsion

L'autoradiographie par émulsion permet la visualisation de la contamination dans la peau mais nécessite des étapes supplémentaires après la coupe et le montage sur lame. En effet, une étape de déparaffinage par différents solvants doit être réalisée afin de réhydrater l'échantillon (Tableau II).

Produits	Temps d'incubation
Xylène	2 x 5 min
Ethanol 100 %	2 x 5 min
Ethanol 95 %	2x 5 min
Ethanol 75 %	2 x 5 min
Eau	2 x 5 min

**Tableau II:** Protocole de déparaffinage des échantillons en paraffine

Une fois déparaffinée, la coupe peut être mise en contact avec une émulsion (Kodak N° 165 4433 Type NTB 2) contenant du nitrate d'argent, qui au contact de la particule  $\alpha$ , va se désintégrer et laisser apparaître une trace noire en fonction de la trajectoire de la particule. Les

étapes qui suivent doivent être réalisées dans une chambre noire afin de ne pas voiler l'émulsion et rendre les lames totalement opaques. L'émulsion a tout d'abord été fondue pendant 45 min à 42 °C puis diluée ½ (v/v) dans de l'eau distillée. Les lames ont ensuite été trempées une par une dans l'émulsion puis rapidement placées dans une boîte à lames opaque contenant du gel de silice. Les boîtes ont ensuite été stockées au réfrigérateur durant le temps de pose nécessaire (1 semaine ou 1 mois). Après ce temps de pose, les lames ont été révélées et fixées par différentes solutions suivant le protocole décrit dans le tableau III.

Produits	Temps de pose
Révéléateur Kodak D19 Cat 146 4593	4 min 30s
Solution Stop (Acide acétique 2%)	30 s
Fixateur Kodak Cat 197 1746	10 min
Rinçage à l'eau	10 min (à la lumière)

**Tableau III:** Protocole de révélation d'autoradiographie par émulsion

Afin d'observer les tissus au microscope et de distinguer les différentes couches cutanées, une coloration à l'hématoxyline de Harris et à l'éosine a été réalisée suivant le protocole décrit dans le tableau IV. Après le dernier rinçage, la lame a été placée sous une hotte à ventilation pendant 24 heures. Elle est ensuite montée entre lame et lamelle à l'aide d'un solvant (Eukitt) et observée sous un microscope (Nikon Diaphot 300 microscope, objectif x20 et x40) après une journée de séchage supplémentaire.

Produits	Temps de pose
Hématoxyline de Harris	15 min
Rinçage à l'eau	5 min
Carbonate de lithium	30 s
Rinçage à l'eau	5 min
Ethanol acide : 1% HCl + 70% EtOH	30 s
Rinçage à l'eau	5 min
Eosine	5 min
Rinçage à l'eau	5 min

**Tableau IV:** Protocole de la coloration à l'Hématoxyline de Harris et l'éosine

### 5.2 *Autoradiographie solide : TASTRAK*

Un détecteur solide plastique (TASTRAK, 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, TASL, Bristol, UK), similaire au CR-39, a également été utilisé pour visualiser l'activité contenue dans la peau. Les échantillons (5  $\mu\text{m}$ ) ont été protégés par un film de Mylar (3  $\mu\text{m}$ ) et exposés pendant 48 h au plastique. Après exposition, les échantillons de plastique TASTRAK ont été incubés dans de l'hydroxyde de potassium (KOH, 6 M) à 80 °C pendant une heure, rincés à l'eau et nettoyés à l'éthanol (96%). Les plastiques ont été observées sous un microscope Nikon Diaphot 300 (objectif x20, x40).

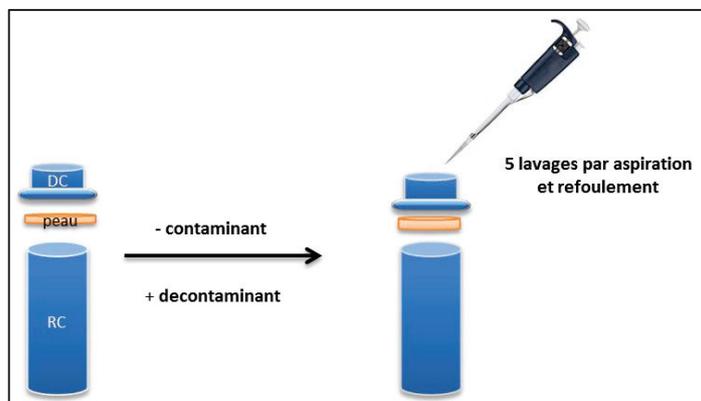
### 5.3 *Autoradiographie digitale : The ionizing-radiation Quantum Imaging Detector (iQID)*

Cette technique a été utilisée dans le cadre d'une collaboration avec Brian Miller (College of Optical Sciences, The University of Arizona, Tucson, AZ USA), qui l'a mise au point. Suite à sa visite au laboratoire, l'opportunité d'utiliser son dispositif pour les échantillons de nos expérimentations s'est présentée. Le principe de cette autoradiographie consiste en un système d'imagerie permettant de localiser et quantifier l'activité sur une coupe (organe, tissu ou cellule) en temps réel. Tout comme pour la technique du CR39, l'échantillon a été protégé par un film de Mylar (3  $\mu\text{m}$ ) et mis en contact avec un film de scintillateur solide (ZnS: Ag). L'interaction des particules  $\alpha$  dans le scintillateur produit un flash de lumière qui est amplifié et enregistré par une caméra CCD. Chaque événement a pu être visualisé en temps réel sur un écran d'ordinateur et son emplacement estimé à la région pixel ou sous-pixel la plus proche de la caméra. Le logiciel d'acquisition de l'iQID utilise une interface graphique développée avec LabVIEW™. Les événements recueillis pendant la durée d'exposition sont traités et compilés en une image. L'activité en Becquerels (Bq) a été calculée en partant de l'hypothèse que les particules  $\alpha$  émises dans un angle solide de  $2\pi$  sr sont récupérées pendant l'exposition de la coupe de peau (efficacité environ 100% d'efficacité de détection). Des lames contenant des coupes de peau contaminées à l'américium (10  $\mu\text{m}$ ) ont été exposées pendant 18 heures à l'iQID.

## 6. Etude de décontamination

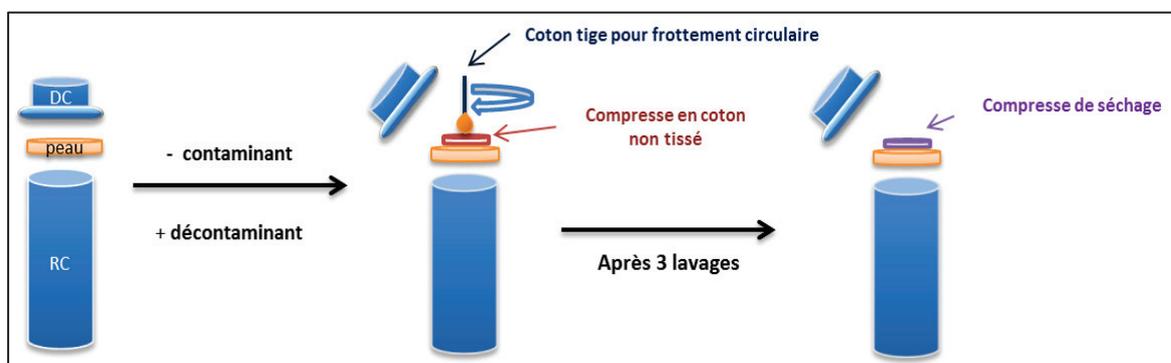
Pour les études de décontamination, deux protocoles ont été appliqués aux explants de peaux placés en cellule de Franz :

- Un protocole de 5 lavages successifs (refoulement et aspiration de la pipette) à l'eau (5 x 500 µl) ou au DTPA (500 mM, 5 x 500 µl) après 24 heures de contamination en cellule de Franz (Figure 6) :



**Figure 6:** Schéma du protocole de décontamination par lavage simple

- Un protocole de 3 lavages successifs supplémentés avec frottements doux à l'aide d'un coton tige en pivot sur une compresse en coton non tissées (Nessicare, 7.5x7.5, LCH) découpées à 1 cm<sup>2</sup> avec une étape finale de séchage avec le même type de compresse après 2 heures de contamination en cellule de Franz (Figure 7) :



**Figure 7:** Schéma du protocole de décontamination par lavage supplémenté de frottements

Les différents décontaminants utilisés pour ce second protocole sont :

- de l'eau bidistillée (3 x 500 µl)
- Du trait rouge (SORIFA laboratory, Ostwald, France) (3 x 500 µl) dilué ½ dans l'eau
- Du Ca-DTPA (PCA, Fleury les Aubrais, France) (3 x 500 µl, 500 mM)
- Du 3,4,3-LIHOPO dans un tampon NaCl (Laboratoire NovAliX, France) (3 x 500 µl, 500 mM)

- De l'acide étidronique (EHBP) (3 x 500  $\mu$ l, 500 mM)
- La Terre à foulon (3 x 7.2 mg)
- L'Osmogel (Merck, Darmstadt, Allemagne) (3 x 0.3g)
- Un hydrogel de DTPA (3 x 0.3g)

Le premier protocole a été testé sur l'Am (nitrate) (n=6) tandis que le second a été testé sur les formes nitrates de l'Am et du Pu ainsi que du Pu-TBP (n=8 pour chaque solution). Il a été décidé d'utiliser le premier protocole pour un cas de décontamination tardive et le deuxième pour un cas de contamination correspondant un scénario plus réaliste, correspondant à une compilation de différents protocoles utilisés dans différents services médicaux du CEA.

### 6.1. Formulation de l'hydrogel

Pour obtenir 1 g de gel, 0,030 g de Blanose™ (Carboxymethylcellulose 3%, Ashland) ont été ajoutés à 0,970 g de solution de Ca-DTPA (500 mM) dans un flacon contenant un barreau aimanté. Le mélange a été placé sous agitation magnétique pendant environ 30 minutes (300 tr/min) puis dans un bain marie à 50 °C, toujours sous agitation magnétique (300 tr/min) jusqu'à homogénéisation complète. La viscosité du gel a été mesurée après un temps de refroidissement et un repos de 24 heures. La viscosité de cette formulation est de l'ordre de 0,550 Pa.s<sup>-1</sup> (à 25°C et 300 s<sup>-1</sup>, au cône planLamy, mobile 4020) ce qui est proche de la viscosité de l'osmogel. Le gel n'a pas de conservateur et peut donc être conservé au réfrigérateur à 4 °C pendant deux à trois jours maximum. Cependant, pour éviter toute contamination bactérienne ou changements de viscosité, le gel a été systématiquement élaboré la veille de chaque expérience. Différentes formulations ont été préparées mais cette formule a été choisie pour sa viscosité et sa stabilité. La concentration finale est de 500 mM de Ca-DTPA/g de gel, similaire à celle de la solution aqueuse.

### 6.2. Traitement des lavages et des compresses

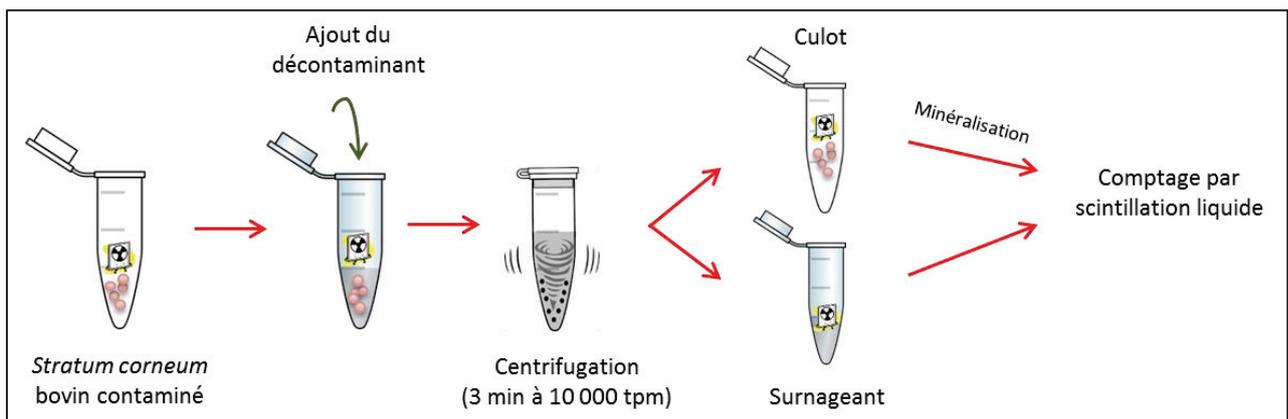
Les compartiments donneur, receveur ainsi que les explants de peau ont été traités de la même façon que décrit précédemment : par comptage en scintillation liquide ou par spectrométrie  $\alpha$ . L'activité contenue dans les compresses et les coton tiges a été estimée en mesurant le spectre d'émission du rayonnement  $\gamma$  et X (entre 5 et 1200 keV), en utilisant un détecteur de germanium à bas bruit de fond (modèle BEGe5030P, Canberra, Montigny-les-Bretonneux, France). Le détecteur de type BEGe utilisé (à large Bande Energie) est fabriqué à partir de cristal de germanium de haute pureté (GeHP) (Figure 7A). Le principe de la méthode repose

sur les interactions entre les photons émis par les radioéléments ( $X$  et  $\gamma$ ) et le cristal, qui entraînent des dépôts d'énergie dans le détecteur. La chaîne électronique permet ensuite de construire le spectre en énergie des photons détectés.

Après différentes manipulations sur le logiciel (Allumage de la haute tension du détecteur, mesure du bruit de fond, calibrage ...), les échantillons ont été centrés dans une boîte de Pétri proche de la surface du détecteur pour les mesures et durant 15 minutes. La limite de détection de cet appareil est de 1 Bq pour l'américium et 10 Bq pour le plutonium. Sur le même principe que la spectrométrie  $\alpha$ , le logiciel affiche ensuite le spectre d'émission l'échantillon et le calcul d'activité s'effectue de la même façon.

### 7. Modèle *in vitro*

Un modèle de poudre de couche cornée bovine (Bovine hide powder H0162, Sigma-Aldrich) a également été utilisé dans des expériences de cinétiques et de décontamination (*in vitro*). Environ  $10,6 \text{ mg} \pm 1.8$  ( $n=160$ ) ont été contaminés dans un tube Eppendorf en utilisant 1 mL contenant 200 Bq d'Am, de Pu ou de Pu-TBP. Les échantillons ont ensuite été placés sur un plateau tournant (8 tr/min) dans un incubateur ( $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ ). Chaque triplicat a été retiré de l'incubateur à différents temps d'incubation: 15, 30, 60, 90 et 120 min. Les tubes ont ensuite été centrifugés pendant 3 minutes (5000 tr/min), le surnageant retiré et le culot minéralisé en utilisant  $\text{HNO}_3$  (1 x 2 mL, 2 M) et  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1x1 mL, solution à 30%) et remis en suspension dans 1 mL de  $\text{HNO}_3$  (2 M). La teneur en radioactivité du surnageant et du culot a été déterminée en utilisant un comptage par scintillation liquide.



**Figure 8:** Schéma du protocole de décontamination de la poudre de couche cornée bovine

La même procédure a été utilisée pour les expériences de décontamination. Après un contact de deux heures de la poudre bovine avec le contaminant, les échantillons ont été centrifugés (5000 tpm) pendant 3 minutes, le surnageant a été retiré et compté par scintillation liquide. Différents produits de décontamination ont ensuite été ajoutés au culot (1 mL) :

- De l'eau distillée
- Du Ca-DTPA (250 mM) (PCA, Fleury les Aubrais, France)
- Du Trait rouge® (savon 1:1 dans l'eau) (laboratoire SORIFA, Ostwald, France),
- Du 3,4,3-LIHOPO (Laboratoire NovAliX, France) remis en suspension dans du NaCl (7 mM)

Chaque concentration a été adaptée à la faible quantité de peau et au faible niveau d'activité. Cette étape a été répétée trois fois, avec une centrifugation entre les ajouts. Après minéralisation, les culots et les lavages ont été comptés par scintillation liquide.

## **8. Mesures de radioprotection**

L'utilisation de matières radioactives, dans notre cas des émetteurs  $\alpha$  et  $\gamma$  est considérée comme une activité à risque. Pour nos différents protocoles (solution aqueuse de radioéléments), différentes mesures de radioprotection ont été appliquées afin de protéger l'opérateur tout comme l'environnement de travail. L'ensemble des manipulations réalisées au cours de ces travaux de thèse ont dû être effectués en zone surveillée et contrôlée (ventilation en dépression), garantissant un confinement en cas de contamination aérienne. Les critères de classification des zones surveillées ou contrôlées sont réalisés par rapport au taux d'activité avec différents niveaux pour chaque émetteur de rayonnements. Les délimitations de ces zones sont définies par des valeurs opérationnelles, en fonction de l'exposition externe et interne de l'organisme. En zone contrôlée et surveillée, le port d'un dosimètre est obligatoire car il permet de suivre l'exposition du travailleur. Des contrôles d'ambiance sont quotidiennement réalisés pour évaluer l'exposition externe, la contamination surfacique et les contaminations atmosphériques.

De plus, il a été nécessaire et obligatoire de suivre une formation en radioprotection, assurée par un agent du service de protection contre les rayonnements (SPR). Cette formation permet d'appréhender le travail avec des radioéléments, ainsi que d'adopter les bons réflexes comme un contrôle ponctuel des gants par des détecteurs à sondes mobiles, des pipettes ou de la surface de travail.

Au sein du laboratoire, pour toute manipulation de sources, un protocole opératoire doit être préalablement rédigé. Ce protocole doit mentionner entre autres le but de l'expérimentation, les radioéléments, leurs activités et la date de réalisation de l'expérience. Ce protocole doit être approuvé par le chef de laboratoire, le chef d'installation et un responsable du SPR.

Les manipulations de matières sont réalisées en boîtes à gants ventilées et le plan de travail est entièrement recouvert d'un film vinyle. Il est primordial de ne pas surcharger son poste de travail et de s'en tenir au strict nécessaire afin que le minimum de matériel soit contaminé en cas d'accident. Pendant chaque expérimentation, le port d'une cote intégrale, de doubles paires de gants et de lunettes est obligatoire. A la fin de chaque manipulation, un nettoyage et un contrôle minutieux du plan de travail sont réalisés afin de laisser une pailasse non-contaminée. En sortie de zone, un contrôle main-pied est réalisé et des prélèvements nasaux sont également effectués après chaque manipulation de matière nucléaire, demandés par le service médical dans le cadre de la surveillance du travailleur. Enfin, le dosimètre doit être encodé pour la sortie de zone, permettant l'obtention de la dose reçue lors de la manipulation.

## **CHAPITRE III**

---

# **Penetration and decontamination of Americium-241 ex vivo using fresh and frozen pig skin**

---



Comme cela a été précédemment exposé dans la revue de la bibliographie, la contamination cutanée par les actinides est l'un des risques les plus probables lors d'un accident de grande ampleur ou en industrie nucléaire. Cette voie d'exposition représente près de la moitié des accidents de contamination dans l'industrie nucléaire enregistrés en France entre 1970 et 2003 (Grappin et al., 2007). Différentes études ont évalué la pénétration et la décontamination cutanée des actinides comme l'uranium et le plutonium. Cependant, la majorité a utilisé des explants congelés et très peu ont étudié l'américium. Ainsi, nous avons choisi cet élément comme modèle dans nos travaux.

Un des objectifs de ce chapitre a été d'évaluer la pénétration de l'américium en utilisant des cellules de diffusion (Franz) avec des explants d'oreilles de porcs viables ou congelés. L'utilisation d'explants viables permet de mettre en évidence des mécanismes spécifiques modifiant éventuellement la pénétration, afin de se rapprocher des conditions *in vivo*. L'autre objectif consistait en l'évaluation de deux protocoles de décontamination préliminaire : (i) le premier consistant en de simples lavages à l'eau et au DTPA 24 heures après contamination, (ii) le deuxième avec des lavages à l'eau, au DTPA et à la Terre à Foulon avec frottements léger 2 heures après contamination. Finalement, la localisation de l'activité par des techniques d'autoradiographies solide et par émulsion a été réalisée sur des coupes de peaux contaminées.

Les résultats montrent qu'environ 90% de l'américium est récupéré dans le compartiment donneur de la cellule de Franz. Une différence significative a été constatée au niveau de l'activité mesurée dans la peau et le compartiment récepteur entre les peaux viables et congelées, suggérant un possible mécanisme de transport actif ayant lieu uniquement en condition viable. L'activité est majoritairement retrouvée au niveau de la couche cornée (*stratum corneum*), mais des traces d'activité sont retrouvées dans les couches profondes au niveau de l'épiderme et du derme. Les résultats obtenus par comptage d'activité concordent avec les résultats des autoradiographies des peaux. Pour la décontamination cutanée de l'américium, la terre à foulon ainsi que l'eau présentent une faible efficacité dans les deux protocoles comparés au DTPA, qui est le traitement recommandé en cas de contamination cutanée à l'américium.

Suite à ces résultats, il a été décidé d'utiliser uniquement des explants viables pour la suite de ces travaux de thèse, afin d'appréhender au mieux et se rapprocher d'une réelle situation de contamination.

## **Publication 1: Penetration and decontamination of Americium-241 *ex vivo* using fresh and frozen pig skin**

**Chemico-biological interaction, in press**

Anissa Tazart<sup>1,2,3</sup>, Marie-Alexandrine Bolzinger<sup>2,3</sup>, Agnès Moureau<sup>1</sup>, Thibaut Molina<sup>1</sup>, Sylvie Coudert<sup>1</sup>, Jaime-Francisco Angulo<sup>1</sup>, Stéphanie Briançon<sup>2,3</sup>, Nina M Griffiths<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Laboratoire de RadioToxicologie, CEA/DSV/iRCM, Bruyères le Châtel, Arpajon, France*

<sup>2</sup> *Université de Lyon, F-69008, Lyon, France*

<sup>3</sup> *Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS 5007, 8, Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France*

### **Highlights**

- Intact skin is a good natural barrier against americium contamination.
- DTPA is more efficient than water to decontaminate after a 24 H contamination.
- Fresh and frozen skin show different activity in the receiver compartment
- Americium is mainly fixed to the *stratum corneum*

## Abstract

Skin contamination is one of the most probable risks following major nuclear or radiological incidents. However, accidents involving skin contamination with radionuclides may occur in the nuclear industry, in research laboratories and in nuclear medicine departments. This work aims to measure the penetration of the radiological contaminant Americium ( $^{241}\text{Am}$ , nitrate) in fresh and frozen skin and to evaluate the distribution of the contamination in the skin. Decontamination tests were performed using water, Fuller's earth and diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), which is the recommended treatment in case of skin contamination with actinides such as plutonium or americium. To assess these parameters, we used the Franz cell diffusion system with full-thickness skin obtained from pigs' ears, representative of human skin. Solutions of  $^{241}\text{Am}$  were deposited on the skin samples. The radioactivity content in each compartment and skin layers was measured after 24 hours by liquid scintillation counting and alpha spectrophotometry. The Am cutaneous penetration to the receiver compartment is almost negligible in fresh and frozen skin. Multiple washings with water and DTPA recovered about 90 % of the initial activity. The rest remains fixed mainly in the *stratum corneum*. Traces of activity were detected within the epidermis and dermis which is fixed and not accessible to the decontamination.

**Key words:** actinides, decontamination, percutaneous penetration, CBRN, pig skin, radiological contamination.

## 1. Introduction

The skin represents an effective barrier to external aggressions with a surface area of about 2 m<sup>2</sup> in adults [1]. The skin and annexes (hair, nails and exocrine glands) have many essential functions such as protection against mechanical aggression, radiations, immune responses and thermoregulation.

Accidental skin contamination by radionuclides represents a major risk for workers of the nuclear industry, of medical and research laboratories as well as for first responders in the case of a major nuclear or radiological incident. A report concerning a follow-up of French nuclear industry workers indicated that there was an average of twenty cases per year of suspected skin contamination [2]. In these cases, skin contamination was by transuranic elements of nuclear fuels, either fabricated or reprocessed, such as uranium (U), plutonium (Pu) or americium (<sup>241</sup>Am). A more recent report demonstrates the need to treat actinide skin contamination to prevent internal contamination after penetration of the skin barrier [3-5].

Americium (<sup>241</sup>Am) is an actinide (half-life of 432 years) which emits mainly alpha particles and with a very small level of gamma ray emission (3%). Alpha particles have high energy radiation but have a very low range compared to beta and gamma radiation, which respectively have a range of a few meters and a hundred meters into the air [3]. This element is found in the nuclear industry and is mainly related to the aging of nuclear fuels resulting from the decay of <sup>241</sup>Pu. Skin contamination by Am has rarely been studied although it is on the list of potential sources for radiological dispersal devices (RDD) or improvised nuclear device (IND) [6,7] that can be used for malevolent acts (CBNR events). The actinides such as Am and Pu and their different isotopes are considered potentially usable radiocontaminants that display mainly radiological toxicity [8] due to the high energy of the alpha particles which can induce a local skin dose.

There are reports of experimental skin contamination, penetration and decontamination of actinides *in vivo* and *in vitro*. There are very few cases of skin contamination by Am reported in the literature. The most demonstrative case concerned a Hanford nuclear worker who received an intake of <sup>241</sup>Am by skin absorption and inhalation [9] which was later evaluated to approximately 37 MBq [10]. In this case because of the nature of the contaminant solution (7M nitric acid, resin beads, metal debris... contaminated with Am) penetration through the skin was the main pathway for the introduction of Am into the body. More recent cases of <sup>241</sup>Am contamination were a skin contamination of French workers during a dismantling

operation and students in a university laboratory [11]. For the student case, the contamination was persistent even after soap washes. The use of DTPA, recommended if soap washes are not efficient, removed the contamination on their hands, but radiotoxicological analyses of fecal excretion indicated residual activity even after sixty days [11]. Decontamination of  $^{241}\text{Am}$  from skin is important in order to avoid fixation and penetration which may lead to internal contamination with this alpha emitter. Skin decontamination also limits the spread of contamination and so decreases the potential local dose to the skin. There are also some case studies of incidents in humans, mainly from Eastern Europe and Japan [9,12,13]. However, the use of these data may be difficult due to the lack of technical information in the protocols (rarely translated into English) and the lack of access because the studies are mostly from the late seventies. Recent animal studies with actinides were conducted using different animal models such as dog and rat [14,15] mostly for decorporation and pig for skin decontamination and penetration of radiopharmaceutical elements [16], plutonium [17-19] and uranium [20,21].

The use of frozen pig ear skin placed in the Franz cell diffusion system [22,23] is deemed a suitable and representative model for human skin according to OCDE guidelines [22,24,25]. Indeed, both are extremely similar in terms of structure, immunology and physiology [26-28]. The major species difference is the exocrine gland system which is predominantly eccrine in humans and apocrine in pigs [29]. The OECD guidelines 428 [22] for *in vitro* absorption studies give no specific instructions in term of skin conditions. As cited in these guidelines, “Although viable skin is preferred, non-viable skin can also be used provided that the integrity of the skin can be demonstrated.” Thus as in the present study, the two skin conditions (viable and frozen) may be used to detect whether there is an effect of skin metabolism on actinide transcutaneous absorption. Frozen and fresh skin were compared to explore if americium could be transported through a facilitated transport through transporters or ion channels.

The purpose of this study was to investigate the penetration of  $^{241}\text{Am}$  in nitrate form, in frozen and fresh pig skin and to determine the distribution of the contamination in the skin in different conditions. In addition, different decontamination protocols were evaluated for removal of  $^{241}\text{Am}$ : 24h after contamination, using only washes, and 2h after contamination, using washes and swabbing to simulate real decontamination conditions during incidents cases.

## 2. Material and methods

### 2.1 Skin samples

Pig ears were obtained from a slaughterhouse with the veterinary department authorization (DDPP Essonne, France). Ears were collected and transported in a cool box for use the day of the experiment. The ears were washed and shaved using electric clippers. The cartilage and subcutaneous tissue were removed using a scalpel. Skin samples were then cut into samples that matched the Franz Cell diameter. The full-thickness pig ear skin samples were measured before assays using micrometer (Mitutoyo Corporation, France) and those of  $1 \pm 0.1$  mm of thickness were selected. The integrity of skin samples was determined by measuring the Trans Epidermal Water Loss (TEWL) (Tewameter TM210, Monaderm, Monaco). The TEWL was measured for 30 seconds and skin samples with TEWL values less than  $15 \text{ g.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  were retained. The frozen skin samples were prepared as for the fresh ones and stored at  $-20^{\circ}$  until required. Skin samples were thawed at room temperature before use and TEWL measured. Samples were used within one month after freezing. Frozen skin was used only for the 24 hour studies to compare Am transfer with fresh skin. For the 2 hour decontamination study, only fresh skin was used.

### 2.2 Contamination solution

A working solution containing  $^{241}\text{Am}$  (nitrate) was prepared by taking 80  $\mu\text{l}$  from a stock solution followed by evaporation and resuspension in water. The pH of this solution was around 2.5. It was then filtered and the activity was checked before and after filtration. The contamination solution is at a concentration of  $15 \text{ kBq.mL}^{-1}$  for a contamination deposit of around 270  $\mu\text{l}$  containing 4.1 kBq (activity per  $\text{cm}^2 = 6.4 \text{ kBq}$ ). These levels are high but are necessary to allow measurement of actinide transfer to the receiver compartment.

### 2.3 Skin contamination

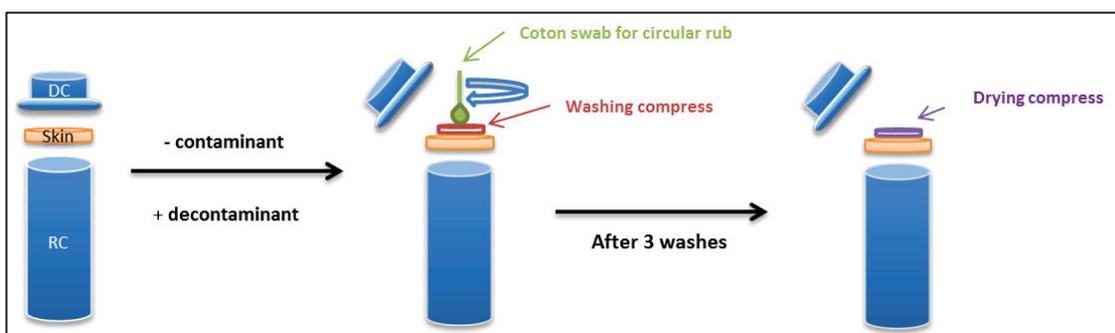
Skin samples ( $0.64 \text{ cm}^2$  surface area,  $n=8$ ) were placed in the Franz cell system, between the donor (DC) and receiver compartment (RC), which was filled with 8 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After 30 min at  $35^{\circ}\text{C}$  which corresponds to a skin temperature of  $32^{\circ}\text{C}$ , a deposit of 4.1 kBq (around 270  $\mu\text{L}$ ) per skin sample was made and each cell was covered with parafilm to avoid the evaporation of the contamination solution. Samples were collected from the RC at 4 hours (1 mL) and at 24 hours, the totality of the compartment was collected.

## 2.4 Skin decontamination at 24 hours

At the end of the 24 hour period, all the contaminant was removed from the DC and skin samples were rinsed with 5 successive washings of water or diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA, 500 mM) obtained from the Pharmacie Centrale des Armées (PCA, Fleury les Aubrais, France). The skin (fresh and frozen) was removed from the chamber and the *stratum corneum* (SC) was separated from epidermis + dermis (ED) using a reproducible cyanoacrylate stripping technique [30,31].

## 2.5 Skin decontamination at 2 hours

For these decontamination experiments, other conditions were selected to simulate practical decontamination recommendations in an incident situation. The Franz cell system was also used to assess the decontamination efficiency of water, DTPA and Fuller's Earth. After a contact time of two hours with fresh skin,  $^{241}\text{Am}$  solution was removed to test the different decontamination protocols of water (500  $\mu\text{l}$ ) and DTPA (500  $\mu\text{l}$  of DTPA 500 mM)) and 7.2 mg of Fuller's earth (dry powder). After the decontaminant is placed on the skin, a compress was added on top and a cotton swab was used to gently swab the skin with circular movement for 30 seconds (1 rotation per second). This procedure described figure 1, was repeated three times without delay between washings using the same cotton swabs but a different compress for every wash. The skin was dried with another compress (drying swab) after the third wash in order to assess if any contamination remained on the surface. This step also dries the skin for the separation step. As indicated previously after decontamination skin layers were separated using the cyanoacrylate stripping method.



**Figure 1:** Diagram representing the skin decontamination procedure

## 2.6 Radioactivity measurements

The receiver compartment fluid (4+24 hours) was recovered in glass vials and evaporated on a hot plate at 90°C. The residues were then wet-ashed in HNO<sub>3</sub> (2 x 2mL, 2M) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 x 1mL, 30% solution) until a clear solution was obtained. Dry residues were taken up into HNO<sub>3</sub> (2mL, 2M) and samples were analyzed for radioactivity by alpha spectrophotometry (Ortec Octète PLUS Alpha Spectrometer, detectors ULTRA-AS BU-037-1200-AS) following purification by anion exchange (TRU resin columns, Eichrom, Rennes, France).

The different skin samples (SC+ED) were calcinated in an oven (Carbolite GPC 1200) using a 54 hours cycle with a maximum temperature of 500°C. The residues were then wet-ashed as described for the RC. The DC, the skin samples and decontamination washes were analyzed for radioactivity by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2500, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The activity retained in the cotton swabs and compresses was estimated by measuring the  $\gamma$  and X radiation emission spectrum, using a low background germanium detector (BEGe5030P model, Canberra, Montigny-les-Bretonneux, France). The samples were centered in a Petri dish close to the detector surface for measurements. A count time of fifteen minutes was used. The detection limit of this device is 1 Bq for americium.

## 2.7 Distribution of contamination in the skin

Two techniques were used to localize the contamination in the skin: emulsion autoradiography and a solid track detector [32]. Skin samples were fixed in buffered formol (4%), dehydrated through a series of alcohols and embedded in paraffin. Samples (5  $\mu$ m) were cut, deparaffinized and rehydrated for autoradiography and histological analyses. Slide-mounted skin sections were incubated for a week with a photographic emulsion (NTB 2K-5, Kodak, France). Following autoradiography development and fixation, the slides were colored with Harris' hematoxylin-eosin.

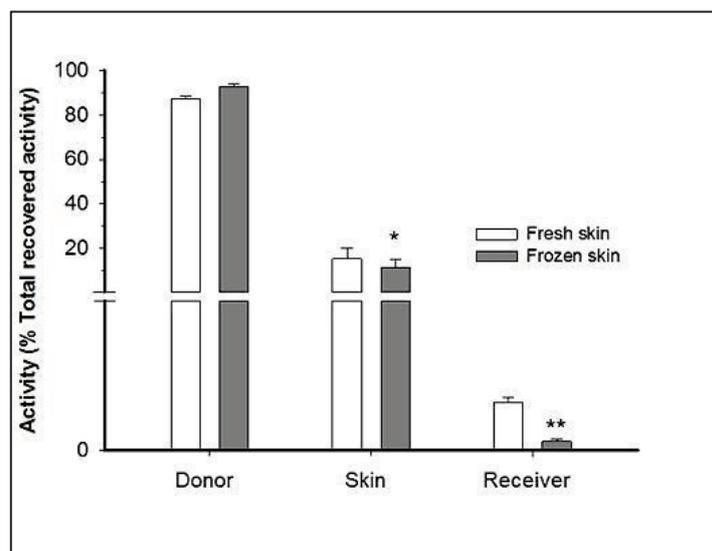
Solid nuclear track detector (CR39 like plastic, TASTRAK, TASL, UK) was also used to visualize the activity. The CR 39 like plastic was in contact with the sections protected by a mylar film (3  $\mu$ m) during 48 hours. After exposure, plastic samples were incubated in potassium hydroxide at 80°C for one hour, rinsed with warm water and cleaned with alcohol. Both autoradiography sections and the plastic slides were observed under a Nikon Diaphot 300 microscope (x20, x40 objectives).

## 2.8 Statistical analysis

Data are presented as the means  $\pm$  standard error (SEM) for each condition (N=8). Data are given as the fraction of the total recovered activity (DC + RC + skin + washes). These recovered values did not differ significantly from the initial activity deposited on the skin samples. Significant differences between the different conditions were compared using a two-tailed unpaired Student's t test with differences considered significant at the 0.05 level.

## 3. Results

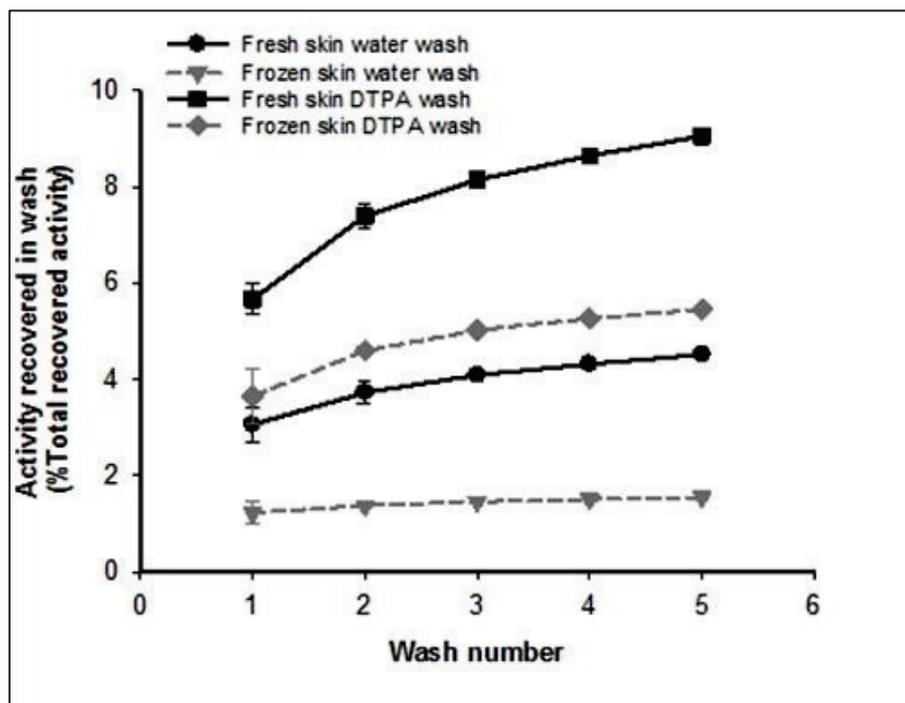
After the 24 hour contamination, around 90% of the initial activity deposited was recovered in the DC with no differences between frozen and fresh skin. Figure 2 shows the relative proportions recovered in the different compartments (RC, DC and skin) after 24 h for both fresh and frozen skin. It is evident that the skin is a very good barrier to Am since only 0.016% and 0.003% was found in the receiver compartment of fresh and frozen skin samples respectively. It appears that more activity is recovered in the skin ( $p < 0.05$ ) and in the receiver compartment ( $p < 0.01$ ) for fresh skin as compared with frozen.



**Figure 2:** Activity recovered in the different compartments after exposure of skin samples with  $^{241}\text{Am}$  during 24 h.

*Fresh or frozen skin samples were contaminated in presence of  $^{241}\text{Am}$  (4.1 kBq) for 24 h. The donor and receiver compartment solutions and skin samples were removed after 24 h and analysed for radioactivity as described. Data are the means  $\pm$  SEM, N=8. (Significantly different between fresh and frozen \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ ).*

As indicated, one of the aims of this work was to evaluate different types of classical decontamination/washing procedures. Figure 3 shows the activity recovered (cumulated values) with successive washes with water or with the chelator DTPA in both skin preparations. Irrespective of the skin treatment the first wash is the most efficient even if only 1 to 5% was recovered. Only a small fraction was recovered in the following washes. It was observed that DTPA was more efficient than water in both skin conditions and was most efficient on fresh skin compared to frozen skin ( $p < 0.05$ ).

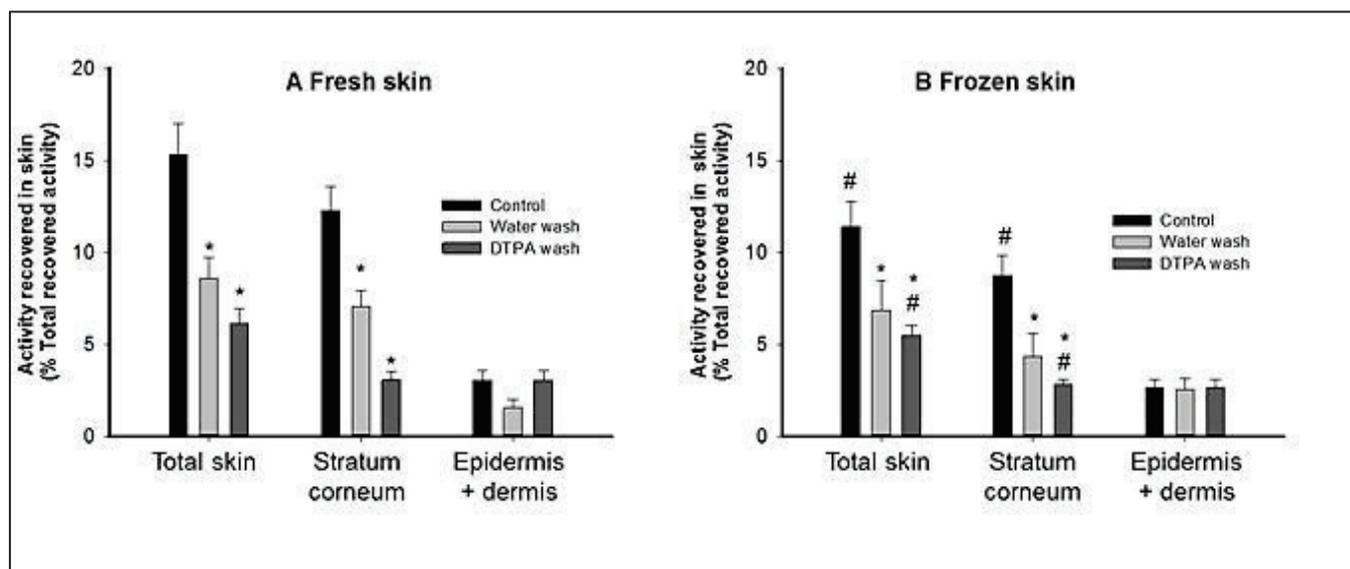


**Figure 3:** Effect of successive washes of Am-contaminated skin with water or DTPA

Fresh or frozen skin samples were contaminated in presence of  $^{241}\text{Am}$  (4.1 kBq) for 24 h. At the end of this period, the donor solution was removed and five successive washes with water or DTPA were carried out. Data are the means  $\pm$  SEM,  $N=8$ .

In addition to measurement of activity in the different wash solutions skin samples were also treated in order to measure the radioactivity remaining in the skin. The skin-associated activity (Fig. 4) highlights the fact that even after 5 washes of water or DTPA, some activity still remains fixed to the skin. The majority of this remaining activity was associated with the *stratum corneum* and was around of 8 to 10 % of the activity recovered for the skin washed with water and 3 to 5 % for the skin washed with DTPA.

There is slightly less activity in the *stratum corneum* of skin samples washed with DTPA as compared with water (Fig. 4,  $p < 0.05$ ). For water washes this difference is irrespective of whether the preparation is fresh or frozen tissue. However the difference is significant between fresh and frozen skin for DTPA washes and control in the *stratum corneum* and total skin ( $p < 0.05$ ). The results clearly show that less activity remains fixed to the skin (SC) after DTPA washes. However it appears that neither decontamination procedure has an effect on activity localized deeper than the *stratum corneum* as indicated by the similar activities in the epidermis and dermis (ED) whatever the treatment or skin preparation.



**Figure 4:** Skin-associated Am activity in fresh (A) or frozen (B) samples after water or DTPA washes

Fresh (A) or frozen (B) skin samples were contaminated in presence of  $^{241}\text{Am}$  (4.1 kBq) for 24 h. Skin samples were then either washed with water or DTPA or not as described. Skin samples were divided into the stratum corneum and epidermis-dermis and analyzed for  $^{241}\text{Am}$  activity. Data are the means  $\pm$  SEM,  $N=8$ . (\* significantly different from control and other decontaminant with  $p < 0.05$  and # significantly different from fresh skin with  $p < 0.05$ ).

Further decontamination experiments were carried out using only fresh skin and an incubation time with Am of two hours. Decontamination was with water, DTPA or Fuller's earth (Table I) (3 successive washes). In addition swabbing of the tissue was carried out as described in the section 2.4. The efficiency of compresses during decontamination procedure using three different products was then evaluated. As observed in the previous experiments with an incubation time of 24 hours with  $^{241}\text{Am}$ , DTPA and water remain the most efficient to remove Am contamination compared to Fuller's earth (after the first wash) ( $p < 0.05$ ) (Table I). However in our conditions, there is no statistical significant difference between the use of

water or DTPA. The first wash is the most efficient and so the most important in the three cases, not much activity is recovered after that.

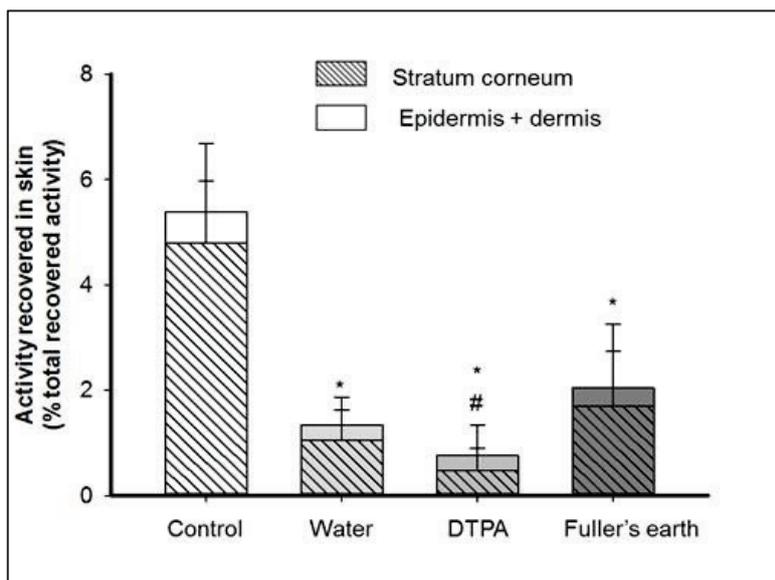
The dry decontamination protocol using Fuller’s earth is not that effective compared to its use with chemical warfare agent such as sulphur mustard or VX nerve agent [33]. The use of compresses increases the decontamination efficacy of water and DTPA compared to the first experiment (Fig.3) in terms of total activity recovered in the washes and in the skin. For the three decontaminants, the remaining activity was in the range of 1 to 2 %. This may be due to the mechanical action made with the compresses to dislodge loosely surface-bound Am.

	W1	W2	W3	Cotton swab	drying swab
<b>Water</b>	4.7 ± 0.4 #	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.03
<b>DTPA</b>	5.3 ± 0.5 #	1.1 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.2 ± 0.04
<b>Fuller's earth</b>	2.1 ± 0.4	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.09 ± 0.02	-

**Table I:** Percentage of activity recovered in the washes using compresses (W), the cotton swab and the drying swab after decontamination.

*Fresh or frozen skin samples were contaminated in presence of <sup>241</sup>Am (4.1 kBq) for 24 h. At the end of this period, the donor solution was removed and five successive washes with water or DTPA were carried out. Data are the means of the washes with each decontaminant ± SEM, N=8. (# significantly different from Fuller’s earth with p<0.05).*

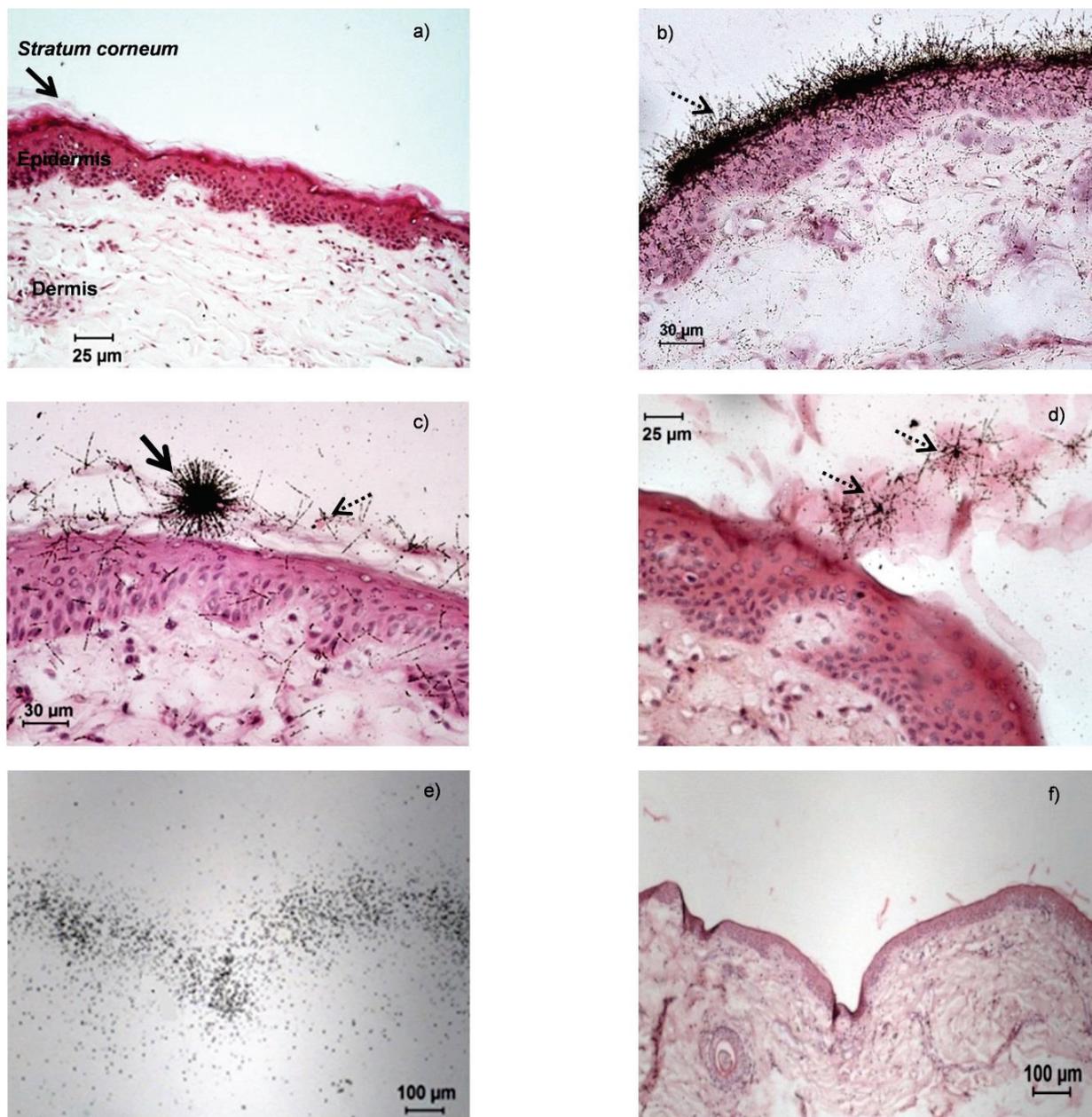
At 2 hours, skin decontamination is effective with all three products compared to controls (Fig. 5). These data are comparable to those obtained after 24 h incubation with Am although less Am is associated with the skin (15.3 ± 1.5 and 5.4 ± 0.5 after 24 and 2 h respectively). There was no measurable activity recovered in the RC. These results show that more <sup>241</sup>Am is associated with skin as a function of the contact time. As shown by figure 5, again the *stratum corneum* is the major binding element. These activity measurements are reflected in the distribution of Am in the skin layers as determined by autoradiography.



**Figure 5:** Activity recovered in the skin following decontamination using compresses at 2 hours after  $^{241}\text{Am}$  contamination

Fresh skin samples were contaminated in presence of  $^{241}\text{Am}$  (4.1 kBq) for 2 h. Skin samples were then washed with water, DTPA, Fuller's earth using compresses. Skin samples were divided into the stratum corneum and epidermis-dermis and analyzed for  $^{241}\text{Am}$  activity. Data are the means  $\pm$  SEM, N=8. (\* significantly different from control with  $p < 0.05$  and # significantly different from the other decontaminant with  $p < 0.05$ )

Different autoradiography techniques were used to evaluate the distribution of the contamination. This showed that  $^{241}\text{Am}$  is located throughout the different layers of skin but most of the activity is fixed to the *stratum corneum* (Fig. 6b). Exposure of skin sections to CR 39 like plastic provided a rapid evaluation of activity localization as shown by the impacts on the plastic (Fig 6.e) created by the alpha particle energy emitted by Am. However a greater precision is obtained by emulsion autoradiography after 1 week exposure time (Fig. 6c). Linear tracks and stars (Fig. 6.b,c,d) correspond to soluble and insoluble compounds respectively of  $^{241}\text{Am}$ . Less tracks were observed (Fig. 6.d) after the DTPA washes, which means that DTPA effectively removes some of the soluble activity in agreement with Fig. 3.



**Figure 6:** Autoradiographs of skin after water or DTPA washes.

Skin samples were contaminated with  $^{241}\text{Am}$  (4.1 kBq) for 24 h. Skin Samples were washed with water or DTPA. Samples were fixed and treated as described for autoradiography. Objectives x20 or x40. Scales bars are indicated. Arrows show particles ( $\Rightarrow$ ) or single tracks ( $\cdot\Rightarrow$ ).

a) No contamination; b) contamination; c) 1 week exposure (water wash); d) 1 week exposure (DTPA wash); e)f) CR-39 like plastic (48 h contact) and the corresponding stained section.

#### 4. Discussion

Among the medical recommendations to treat actinide skin contamination, some protocols include a maximum of 3 successive washes with DTPA or water with soap (acidic if possible) [5,34] to avoid any wash-in effect [35] or any abrasion of the skin that could lead to a deeper penetration of the contaminant. Consequently, REAC/TS [5] recommends the use of baby wipes. The decision to use compresses in this work is also justified because of easy accessibility and neutrality (pure cotton and absence of any other substances). These protocols also include two scenarios: early decontamination after 30 min and delayed decontamination after 6 hours. The choice of the 2 hour exposure in the present study was made based on the fact that the average decontamination time is often more than an hour due to contingencies on the ground. However, decontamination does not appear to exceed 6 hours in the majority of cases.

For other decontamination protocols, decontamination takes place right after contamination. This condition is achievable in case of a lone worker having quick access to decontamination and knowing that he is contaminated. But, many workers realize that they are contaminated only after a positive reading on radiation probe control when they finished their work. Actinide decontamination protocols have been applied for liquid contamination as well as cases of contamination by americium and plutonium dusts [36]. This mode of skin contamination has not been experimentally characterized given the major risk of inhalation. DTPA is the most efficient treatment for actinide contamination as indicated by the present data (Table 1, Fig. 4) and other publications [17-19]. Fuller's earth was chosen because of its proven efficacy as a chemical warfare agent decontaminant and its dry and absorbent nature which can be very useful in the field. In fact, the requirement for a dry decontaminant remains a major issue because of the possible lack or contamination of water at the incident site. Fuller's earth was not as efficient as the other decontaminants but it could be used as a last option or in case of lack of other treatments.

The *stratum corneum* (SC) is the outermost skin layer and an effective protective physiological barrier since it is able to stop and retain the majority of the activity (Fig 6. b). It is the major challenge for transdermal xenobiotic drug delivery or accidental entry of radioelements [37]. The results obtained from this study with the alpha-emitting actinide americium are in accordance with this fact. But, SC is also a tank for many elements which can fix to it due to the keratinocytes embedded in the lipid matrix [38, 39]. This matrix

includes ceramides, cholesterol and free fatty acids [37]. A particular binding specificity of actinides for such components associated with the *SC* has not been demonstrated. However it is assumed that two types of binding could coexist - ionic bonds as well as coordination bonds with the medium proteins such as keratin or collagen [40]. In the case of actinides the strong binding observed is more likely to be due to the coordination bond with proteins rather than ionic bonds.

This study demonstrated that some Am activity still remains in the skin even after washing. The majority is associated with the *SC*. Due to the high energy of alpha particles a skin deposit could have an impact on skin cells particularly on the basal cell layer [41]. The behavior of this fixed fraction has been rarely studied but the assumption that it could still diffuse into deeper skin layers and be released in the blood is conceivable [42]. This diffusion could be possible given the fact that the *SC* has an average turnover time of 14 days [43]. The *SC* is described as a reservoir where the substance can accumulate if it is rather lipophilic [44,45]. The substance can then diffuse in the underlying layers (the viable epidermis and dermis) and reach the bloodstream. The diffusion of a substance through the stratum corneum can occur through three main pathways: (i) the intercellular route through intercellular lipids, (ii) transcellular route and, finally (iii) by skin appendages [46]. The entry of exogenous elements in the skin depends on their size, their polarity. Moreover, an active transport through channels or exchangers could occur. Thus an element that remains fixed over this period of time can increase the probability of penetration as well as an increased of radiation dose. The fixation to the *SC* and the remaining activity after decontamination has been shown in other studies with other actinides such as uranium [20,47] or plutonium [18,19].

The present study demonstrated a good agreement between skin activity measurements and the histological analyses (autoradiography and CR 39 like plastic). Very few studies have used both techniques to support and correlate with the activity found in skin layers. In addition emulsion autoradiography showed that there was soluble activity as represented by single tracks (fig. 6) in the deeper layers. For comparison, results obtained after americium contamination of wounds or lungs show that the insoluble fraction is mainly retained either at the site of contamination (lungs, wound) or in the specific retention organs (bone, liver) in the organ and the soluble fraction is released in the systemic system [48,49].

Radionuclides are considered to be like xenobiotics with regard to passive skin diffusion through three ways: the intercellular, transcellular and appendage route [46]. In normal

healthy skin actinides such as americium do not cross this barrier easily as shown in this study and by others [17-19, 21, 50]. The activity differences in the receiver compartment between frozen and fresh skin (greater for fresh skin than for frozen) raises the issue of a possible specific transport of americium present in fresh tissue. Light microscopy did not show any major structural alterations. One main hypothesis is that freezing the skin induces structural changes in the lipids which facilitate a path through the skin [51]. In fact in the literature, the correlation between the structure of the skin and the percutaneous penetration after different storage conditions has rarely been studied [51], and never using actinides. Nielsen et al. showed that the amount of caffeine in the skin was clearly higher in fresh skin than in stored skin (-20°C) [52]. In our case, it was also found an increased penetration in fresh skin compared to frozen skin (Fig.4). Studies of Harrison et al., and Bronaugh et al., showed that storage at -20°C doesn't change skin permeability for a year [53,54], but the increased penetration of Am in fresh tissue observed in the present study merits further investigation. Indeed, the penetration mechanism is unknown and understanding it could be a foundation for new decontaminants. External decontamination with DTPA will not have a significant effect on this fraction of Am and so it is important to investigate this property further.

## 5. Conclusion

This study shows that the skin is a good protective barrier against moderately soluble actinides such as americium. Only a small percentage penetrated the intact skin layers to the receiver compartment. For the study of  $^{241}\text{Am}$  skin decontamination, both frozen and fresh pig skin can be used as a representative model close to human skin. It should be noted that there is an increased penetration in fresh skin compared to frozen skin. Decontamination with DTPA is particularly efficient but there is a fraction that remains fixed and difficult to remove from the skin. The reason for this strong fixation is unclear and further studies are underway. The use of autoradiography for localization is a useful adjunct. DTPA remains the most effective treatment in case of americium skin contamination after a long time contamination (24 h) but not after a short one (2 h). The need for a dry treatment is still relevant and must be developed for massive field event.

## Acknowledgement

The authors would like to thank Direction Générale de l'Armement (DGA) for their financial support and Luc Doublet for Radiation Protection advice.

## References

- [1] B. Cricks, J.M. BonnetBlanc, J.C. Guillaume, Comprendre la peau. Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes, *Ann. Dermatol. Venereol.* 132 (2005) 8S5-48.
- [2] N. Blanchin, S. Desloires, L. Grappin, A.M. Guillermin, P. Lafon, A. Miele, 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 (2004) 59-75.
- [3] REAC/TS, Guidance for radiation accident management: The medical aspects of radiation incidents, <https://orise.orau.gov/files/reacts/medical-aspects-of-radiation-incident.pdf> (2013) (Radiation Emergency Assistance Center / Training Site, Oak Ridge).
- [4] P. Laroche, A. Cazoulat, S. Bohand, V. Schoen, E. Bey, H. Roche, B. Quesne, J.C. Amabile, The French armed forces health service and the surgical management of a plutonium contaminated patient at Percy Military Hospital, France, (2010) “The Medical Basis for Radiation-Accident Preparedness. Medical Management.” Ed Christensen DM, Sugarman SL, O’Hara FM. ORAU 12-1771, ORAU, Oak Ridge, Tennessee.
- [5] P. Bérard, X. Michel, F. Ménétrier, P. Laroche, Medical management of a cutaneous contamination, *Health Phys.* 99 (2010) 572-576.
- [6] H. Shin, J. Kim, Development of realistic RDD scenarios and their radiological consequence analyses, *Appl. Radiat. Isot.* 67 (2009) 1516–1520.
- [7] M. Bunn, M.B. Malin, N. Roth, W.H. Tobey, Preventing nuclear terrorism, (2016) page 4, Belfer Center. <http://belfercenter.ksg.harvard.edu/files/PreventingNuclearTerrorism-Web.pdf>.
- [8] E. Fattal, N. Tsapis, G. Phan, Novel drug delivery systems for actinides (uranium and plutonium) decontamination agents, *Adv. Drug Deliv.* 90 (2015) 40-54.
- [9] J.J. Jech, J.R. Berry, B.D. Breitenstein, 1976 Hanford americium exposure incident: external decontamination procedures, *Health Phys.* 45 (1983) 873-881.
- [10] B. Robinson, K.R. Heid, T.L. Aldridge, R.D. Glenn, 1976 Hanford americium exposure incident: organ burden and radiation dose estimates, *Health Phys.* 45 (1983) 911-921.

- [11] RELIR OTHEA. Contamination radioactive à l'américium-241 dans un laboratoire universitaire. <http://relir.cepn.asso.fr/index.php/fr/fiches-recherche-a-enseignement-menu-cachour-les-pages-57/94-enseignement/57-contamination-radioactive-amcium-241-dans-un-laboratoire-universitaire.html>
- [12] L.A. Il'in, A.T. Ivannikov, B.A. Popov, G.A. Altukhova, I.M. Parfenova, Effectiveness of decontaminating skin contaminated by  $^{241}\text{Am}$  in concentrated acid, *Gig. Sanit.* (1980) 34-37.
- [13] H. Nishiyama, R.J. Van Tunen, S.J. Lukes, P.A Feller, Survey of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  contamination of laboratory personnel: hand decontamination, *Radiol.* 137 (1980) 549-551.
- [14] J.E. Huckle, M.P. Sadgrove, E. Pacyniak, M.G. Leed, W.M. Weber, M. Doyle-Eisele, R.A. Guilmette, B.J. Agha, R.L. Susick, R.J. Mumper, M. Jay, Orally administered DTPA diethyl ester for decorporation of ( $^{241}\text{Am}$ ) in dogs: Assessment of safety and efficacy in an inhalation-contamination model, *Int. J. Radiat. Biol.* 91 (2015) 568-575.
- [15] N.M. Griffiths, S. Coudert, J.C. Wilk, D. Renault, J.F. Angulo, A. Van der Meeren, Combined drug and surgery treatment of plutonium-contaminated wounds: indications obtained using a rodent model, *Health Phys.* 106 (2014) 638-644.
- [16] M.A. Bolzinger, C. Bolot, G. Galy, A. Chabanel, J. Pelletier, S. Briançon, Skin contamination by radiopharmaceuticals and decontamination strategies, *Int. J. Pharm.* 402 (2010) 44-49.
- [17] P. Gerasimo, D. Jourdain, A. Cazoulat, D. Schoulz, P. Laroche, R. Ducouso, Modeling of cutaneous radio-contamination: effects of washings by soap and by solutions of DTPA, *Ann. pharm. FR.* 55 (1997)116-124.
- [18] H. Tymen, P. Gerasimo, D. Hoffschir, Contamination and decontamination of rat and human skin with plutonium and uranium, studied with a Franz's chamber, *Int. J. Radiat. Biol.* 76 (2000a) 1417-1424.
- [19] H. Tymen, D. Hoffschir, P. Gerasimo, J.P. Marty, Efficiency of etidronic acid in the case of cutaneous radiocontamination by actinid elements: in vitro evaluation, *Ann. Pharm. Fr.* 58 (2000b) 405-413.

- [20] F. Petitot, A.M. Moreels, F. Paquet, In vitro evaluation of percutaneous diffusion of uranyl nitrate through intact or excoriated skin of rat and pig, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82 (2004) 133-139.
- [21] A. Spagnul, C. Bouvier-Capely, G. Phan G, G. Landon, C. Tessier, D. Suhard, F. Rebière, M. Agarande, E. Fattal, Ex vivo decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (2011) 258-267.
- [22] OECD, Guideline for the Testing Of Chemicals. Skin Absorption: In Vitro Method. 428 (2004) OECD, Paris.
- [23] S.F. Ng, J.J. Rouse, F.D. Sanderson, V. Meidan, G.M. Eccleston, Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies, *AAPS PharmSciTech.* 11 (2010) 1432-1441.
- [24] U. Jacobi, M. Kaiser, R. Toll, S. Mangelsdorf, H. Audring, N. Otberg, W. Sterry, J. Lademann, Porcine ear skin: an in vitro model for human skin, *Skin Res. Technol.* 13 (2007) 19-24.
- [25] G.A. Simon, H.I. Maibach, The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations-an overview, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13 (2000) 229-234.
- [26] C. Herkenne, A. Naik, Y.N. Kalia, J. Hadgraft, R.H. Guy, Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man, *Pharm. Res.* 23 (2006) 1850-1856.
- [27] E.C. Jung, H.I. Maibach, Animal models for percutaneous absorption, *J. Appl. Toxicol.* 35 (2015) 1-10.
- [28] A. Summerfield, F. Meurens, M.E. Ricklin, The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin, *Mol. Immunol.* 66 (2015) 14-21.
- [29] D. Mannis and A. Brandl, Efficacy of Common Decontamination Methods for Cleaning Contaminated Wounds, *Health Phys.* 108 (2015) S5-S12.
- [30] A. Teichmann, U. Jacobi, M. Ossadnik, H. Richter, S. Koch, W. Sterry, J. Lademann, Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles, *J. Invest. Dermatol.* 125 (2005) 264-269.

- [31] M. Förster, M.A. Bolzinger, M.R. Rovere, O. Damour, G. Montagnac, S. Briançon, Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods, *Skin Pharmacol. Physiol.* 24 (2011) 103-112.
- [32] M.H. Lee, Y.J. Park, K.Y. Jee, W.H. Kim, S.B. Clark, Study of an alpha track analysis and a fission track analysis for determining the hot particles contaminated with Pu and U isotopes, *Appl. Radiat. Isot.* 65 (2007) 85-91.
- [33] L. Taysse, S. Daulon, S. Delamanche, B. Bellier, P. Breton, Skin decontamination of mustards and organophosphates: comparative efficiency of RSDL and Fuller's earth in domestic swine, *Hum. Exp. Toxicol.* 26 (2007) 135-141.
- [34] A. Tazart, P. Bérard, A. Leiterer, F. Ménétrier, Decontamination of radionuclides from skin: an overview, *Health Phys.* 105 (2013) 201-207.
- [35] R.P. Moody, H.I. Maibach, Skin decontamination: Importance of the wash-in effect, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 1783-1788.
- [36] J.D. Harrison, A. Hodgson, J.W. Haines, J.W. Stather, The biokinetics of plutonium-239 and americium-241 in the rat after subcutaneous deposition of contaminated particles from the former nuclear weapons site at Maralinga: implications for human exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 12 (1993) 313-321.
- [37] A. Pappas, Epidermal surface lipids, *Dermatoendocrinol.* 1 (2009) 72-76.
- [38] E. Houben, K. De Paepe, V. Rogiers, A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol. Physiol.* 20 (2007) 122-132.
- [39] G.K. Menon, G.W. Cleary, M.E. Lane, The structure and function of the stratum corneum, *Int. J. Pharm.* 435 (2012) 3-9.
- [40] Tymen H. Contribution à l'étude de la contamination externe par des produits radioactifs : contamination cutanée par les cobalts radioactifs sous forme soluble et décontamination. Thèse de pharmacie. (2002) 272 p.
- [41] ICRP, The Biological Basis for Dose Limitation in the Skin, p.87, Publication 59 (1992) *Ann. ICRP* 22 (2).

- [42] M.B. Reddy, R.H. Guy, A.L. Bunge, Does epidermal turnover reduce percutaneous penetration ? *Pharm Res.* (2000) 1414-1419.
- [43] S.B. Hoath, D.G. Leahy, The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality, *J. Invest. Dermatol.* 121 (2003) 1440-1446.
- [44] A. Rougier, D. Dupuis, C. Lotte, R. Roguet, H. Schaefer, In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption, *J. Invest. Dermatol.* (1983) 275-278.
- [45] F. Hafeez, A. Chiang, X. Hui, H. Zhu, F. Kamili, H.I. Maibach, Stratum corneum reservoir as a predictive method for in vitro percutaneous absorption. *J. Appl. Toxicol.* (2015) [Epub ahead of print].
- [46] H.A.E. Benson, A.C. Watkinson. *Topical and Transdermal Drug Delivery: Principles and Practice*, Chapter 1 and 2 (2012) 3-42.
- [47] G. Phan, N. Semili, C. Bouvier-Capely, G. Landon, G. Mekhloufi, N. Huang, F. Rebière, M. Agarande, E. Fattal, Calixarene cleansing formulation for uranium skin contamination, *Health Phys.* 105 (2013) 382-389.
- [48] N.M. Griffiths, J.C. Wilk, M.C. Abram, D. Renault, Q. Chau, N. Helfer, C. Guichet, A. Van der Meeren, Internal contamination by actinides after wounding: a robust rodent model for assessment of local and distant actinide retention, *Health Phys.* 103 (2012) 187-194.
- [49] E. Blanchardon, E. Davesne, F. Paquet, M. Bailey, Absorption of americium compounds in the respiratory tract, *Int. J. Radiat. Biol.* 90 (2014) 959-965.
- [50] F. Petitot, C. Gautier, A.M. Moreels, S. Frelon, F. Paquet, Percutaneous penetration of uranium in rats after a contamination on intact or wounded skin, *Radiat. Prot. Dosimetry.* 127 (2007) 125-130.
- [51] C. Bianco, G. Adami, M. Crosera, F. Larese, S. Casarin, C. Castagnoli, M. Stella, G. Maina, Silver percutaneous absorption after exposure to silver nanoparticles: a comparison study of three human skin graft samples used for clinical applications, *Burns.* 40 (2014) 1390-1396.

## CHAPITRE IV

---

**Skin absorption of actinides: influence of solvents or chelates on skin penetration *ex vivo***

---



Dans le précédent chapitre, nous avons montré une pénétration cutanée des actinides avec une accumulation dans le *stratum corneum* et un faible passage dans le compartiment receveur. La plupart de ces contaminations aux actinides sont sans conséquences si la peau n'est pas endommagée. Cependant, certaines formes chimiques peuvent pénétrer directement à travers la peau intacte résultant en une absorption systémique augmentée.

Ce chapitre expose la pénétration dans la peau de l'américium et le plutonium dans différentes conditions : des solutions aqueuses du Pu et d'Am sous forme nitrate ainsi que des solutions organiques, en mélange eau/DMSO pour l'américium et en mélange TBP/dodécane pour le plutonium. De plus, l'évolution du complexe actinides-chélateur (DTPA) sera également étudiée. Des analyses histologiques ont été réalisées pour chaque condition afin d'évaluer une éventuelle modification de la structure cutanée. Enfin, une comparaison entre trois techniques d'imagerie (simili CR-39 TASTRAK, autoradiographie par émulsion) dont une quantitative (iQID), a été faite sur des coupes contaminées à l'américium. Pour cela, comme précédemment les études ont été menées en cellule de Franz avec des explants d'oreilles de porcs viables. Au vu des résultats présentés dans le chapitre III, il a été choisi d'utiliser les solutions de nitrate d'américium et de plutonium (modérément solubles) en point de comparaison avec les autres solutions étudiées.

L'ensemble des résultats obtenus a ainsi pu démontrer une augmentation de la pénétration cutanée des formes organiques, comparées aux formes nitrates en solution aqueuse (pH 1.5 à 2). En effet, une forte activité est mesurée dans la peau dans le cas du TBP pour le plutonium ainsi que du DMSO pour l'américium. De plus, on constate également une augmentation de l'activité retrouvée au niveau du compartiment récepteur dans le cas du TBP, correspondant à près de 10% de l'activité totale retrouvée. Les complexes actinide-DTPA sont mesurés en plus faible quantité dans la peau mais ils diffusent plus dans le compartiment receveur (17 et 148 fois plus pour l'Am et le Pu respectivement). Les techniques d'imageries ont permis de mettre en évidence une modification de la structure de la peau par l'effet des solvants : avec une formation particulière « en nid d'abeille » du *stratum corneum* et une apparence sinieuse et plus rigide de manière générale. Les résultats obtenus dans ces travaux confirment et renforcent la nécessité d'un protocole de décontamination adapté au contaminant lorsqu'il est connu, du fait de la différence de comportement de pénétration dans la peau des différentes formes.

**Publication 2: Skin absorption of actinides: influence of solvents  
or chelates on skin penetration *ex vivo***

**International Journal of Radiation Biology, accepted**

**A.Tazrart <sup>a,b</sup>, M.A. Bolzinger <sup>b</sup>, S. Coudert <sup>a</sup>, S. Lamart <sup>a</sup>, B.W. Miller <sup>c</sup>, J.F. Angulo <sup>a</sup>, S.  
Briançon <sup>b</sup>, N.M. Griffiths <sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Laboratoire de Radio Toxicologie, CEA, Université Paris-Saclay, 91297 Arpajon, France.*

<sup>b</sup> *Université de Lyon, F-69008, Lyon, France : Laboratoire de Dermopharmacie et  
Cosmétologie, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS  
5007, 8, Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France*

<sup>c</sup> *College of Optical Sciences, The University of Arizona, Tucson, AZ USA*

## **Abstract**

**Purpose-** To evaluate skin penetration and retention of americium (Am) and plutonium (Pu), in different chemical forms relevant to the nuclear industry and to treatment by chelation.

**Materials and methods-** Percutaneous penetration of different Am and Pu forms were evaluated using viable pig skin with the Franz cell diffusion system. The behavior of the complex Pu-tributylphosphate (Pu-TBP), Am or Pu complexed to the chelator Diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) and the effect of DMSO was assessed. Radioactivity was measured in skin and receiver compartments. Three approaches were used to visualize activity in skin including the recent iQID technique for quantification.

**Results-** Transfer of Am was 24-fold greater than Pu and Pu-TBP complex penetration was enhanced by 500 fold. Actinide-DTPA transfer was greater than the Am or Pu alone (17-fold and 148-fold respectively). The stratum corneum retained the majority of activity in all cases and both DMSO and TBP enhanced skin retention of Am and Pu respectively. Histological and bioimaging data confirmed these results and the iQID camera allowed the quantification of skin activity.

**Conclusions-** Skin penetration and fixation profiles are different depending on the chemical actinide form. Altered behavior of Pu-TBP and actinide-DTPA complexes reinforces the need to address decontamination protocols.

**Key words:** actinides; skin contamination; DMSO; TBP; DTPA

## 1. Introduction

Plutonium (Pu) and Americium (Am) are strong alpha emitters and represent the most studied actinides in the literature along with uranium. These actinides are listed as potential usable sources for radiological dispersible devices (RDD) in addition to polonium or neptunium (Shin and Kim, 2009). Internal contamination with these actinides may occur by inhalation, ingestion and from contaminated wounds for which proposed biokinetic models exist (ICRP 48, 1986; ICRP 67, 1993; ICRP 66, 1994; Leggett, 2003; NCRP 156, 2007; Suslova et al., 2012). The other main pathway is the possible absorption through skin, healthy or damaged, which has been studied using different animal models *in vivo* or *ex vivo* (Tymen et al., 2000; Luciani et al., 2006; Griffiths et al., 2012; Grives et al., 2015) as well as following accidental contamination in man (Hanford case: Breitenstein, 1983).

Most of these actinide contaminations are harmless if the skin is not damaged, and barrier function remains intact. However, some chemical forms may penetrate directly through intact skin resulting in systemic uptake. In addition, penetration of healthy skin may also be due to the combination of the treatment protocol (chelators, skin damage from rubbing...), a certain valence ( $\text{Pu}^{6+}$ ) or the chemical form such as citrate, which is known to penetrate more easily due to a higher solubility. Today, the process of actinide skin penetration is not totally understood mainly due to the complexity of actinide speciation, the skin structure involved in the diffusion and retention as well as the wide variability of skin types between different anatomical locations and individuals (Hostynek, 2003). Moreover, there is no general biokinetic model applicable for skin because of the wide range of possible exposure scenarios (chemical form, organic compound, pH...) (ICRP 130, 2015). Data from the literature reports that actinides have been most frequently tested with simple aqueous forms of nitrate or citrate for example in addition to colloidal preparations (ICRP 48, 1986; Takahashi et al., 1992). However, actinides are often used in more complex media (solvents or fission products cocktail) particularly in the nuclear industry.

Tributyl phosphate (TBP) is an organophosphorus compound that complexes metals and is used as an extractant of rare earth metals from ores. TBP has a major use in the extraction process of plutonium known as PUREX (Plutonium URanium EXtraction process) from spent uranium fuel (Goldschmidt et al., 1955). In this process Pu in nitric acid solution is extracted into the organic phase to form the neutral complex  $\text{Pu}(\text{NO}_3)_4(\text{TBP})_2$  known as Pu-TBP. This complex has been studied *in vivo* following inhalation or intramuscular injection (Métivier et

al., 1989; Paquet et al., 1995; Kalmykova et al., 1996). A better understanding of the behavior of Pu-TBP complex on skin is important given its use by workers during the PUREX extraction process or other decommissioning operations.

DMSO is known to enhance transcutaneous transfer of pharmaceuticals and is considered to “carry” dissolved materials. DMSO is not used in industrial processes with actinides but in experimental situations this polar aprotic agent is used to avoid actinide hydrolysis in aqueous solutions (Watters and Johnson, 1970). Furthermore, it has also been used for the removal of plastic-bonded explosive during nuclear weapon assembly (Haschke and Pruner, 1995), the electrodeposition of actinides (Handley and Cooper, 1969) and to study the luminescence of Am (Yusov, 1990; Kimura et al., 2001).

DiethyleneTriaminePentaAcetic acid (DTPA) is the recommended treatment in case of internal (ingestion and inhalation) and external contamination (healthy skin and wound) by actinides notably for americium, plutonium or curium (Tazart et al., 2013; Grappin and Bérard, 2008; FDA, 2002). It can be administered orally (Huckle et al., 2015), intravenously (FDA, 2002), by inhalation (Grémy et al., 2012) or just by pouring the solution on the contaminated skin area. DTPA efficacy has been proven in animal studies as well as in cases of accidental contamination of workers. Some clinical observations during incidents indicated that the application of DTPA on a healthy skin increased the radioactivity excreted in the urine (personal communication – occupational medicine service). This result suggests that the complex actinide-DTPA may cross the skin barrier more easily. This question has not been studied experimentally concerning treatment of skin decontamination with DTPA.

The present work assessed the skin penetration of americium and plutonium in different conditions: using aqueous solutions of Am nitrate and Pu nitrate, an organic solution of Pu-TBP, a solution of Am in DMSO (50:50 v/v) and aqueous solutions where either actinide is complexed to DTPA to mimic the clinical situation as described above. These different forms were evaluated *ex vivo* using viable pig skin with the Franz cell diffusion system. Porcine skin has been shown to have similar histological and physiological properties to human skin and has been suggested as a good model for human skin permeability (OECD, 2004; Dick and Scott, 1992). Histological analyses were carried out for the different conditions to assess the effect on the skin. Finally, a comparison between three imaging techniques including one quantitative was made for americium-contaminated skin.

## 2. Material and methods

### 2.1 Skin samples

Pig ears were obtained from a slaughterhouse with authorization from the local veterinary department (DDPP Essonne, France). Ears were collected immediately post-euthanasia before carcass scalding and then transported for use on the day of the experiment. The ears were washed with running warm water and shaved carefully using electric clippers to avoid damaging the skin. The cartilage and subcutaneous tissue were removed using a scalpel. Skin samples were then cut into samples that matched the Franz Cell diameter (0.9 cm). The full-thickness pig ear skin samples were measured prior to use with a micrometer (Mitutoyo Corporation, France) and  $1 \pm 0.2$  mm thickness sections were selected. The integrity of skin samples was determined by measuring the Trans Epidermal Water Loss (TEWL) (Tewameter TM210, Monaderm, Monaco). TEWL was measured for 30 seconds and skin samples with TEWL values less than  $15 \text{ g.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  were retained.

### 2.2 Contamination solutions

The different Am and Pu contamination solutions tested were: aqueous solutions (nitrate, 2 M  $\text{HNO}_3$ ), organic solution (TBP in dodecane for Pu), a solution of Am in DMSO (50:50 v/v) for Am and aqueous Am- or Pu-DTPA complexes.

Working solutions containing  $^{241}\text{Am}$  and  $^{238}\text{Pu}/^{239}\text{Pu}$  (nitrate) were prepared from the stock solutions ( $1584 \text{ kBq.mL}^{-1}$  for Am and  $714 \text{ kBq.mL}^{-1}$  for Pu). The samples were then evaporated and resuspended in water, in DMSO (50:50 v/v in water) or nitric acid ( $\text{HNO}_3$ , 4 M). For comparison purposes, Pu and Am nitrate solutions are taken as controls. Table 1 shows the different preparations of the Am and Pu solutions used.

For the actinide-DTPA complex, DTPA (500 mM; Pharmacie Centrale des Armées, PCA Fleury les Aubrais, France) was added to either Am or Pu nitrate solutions to obtain an actinide:DTPA ratio 1:10, where DTPA is in excess. The volume to add was calculated using Pu or Am specific activity and molecular weight to obtain a number of mole/Bq ( $6.6 \times 10^{-15}$  for  $^{238}\text{Pu}$ ,  $1.83 \times 10^{-12}$  for  $^{239}\text{Pu}$  and  $3.3 \times 10^{-14}$  for  $^{241}\text{Am}$ ) of both actinides in these experimental solutions. To obtain the ratio of 1:10 actinide to DTPA, solutions (final volume 1.66 mL) contained to 25 kBq of Pu and 111  $\mu\text{l}$  DTPA (solution at 500  $\mu\text{M}$ ) or 25 kBq of Am and 16  $\mu\text{l}$  of DTPA (solution at 500  $\mu\text{M}$ ).

The TBP solution (Sigma-Aldrich, 240494, purity  $\geq 99\%$ ) was equilibrated with water and prepared in a 30% solution (v/v) with n-dodecane. The TBP-dodecane solution was washed with HNO<sub>3</sub> (4 M) and the organic phase was recovered. This solution was then contacted with <sup>238/239</sup>Pu solution (4 M) for 20 minutes. During this process, the plutonium is extracted into the organic phase (Pu-dodecane) as a neutral complex Pu-TBP (Pu(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(TBP)<sub>2</sub>) (Stradling et al., 1985), with an extraction yield of 97 %  $\pm$  2%.

Final contamination solutions are at a concentration of around 15 kBq.mL<sup>-1</sup> for a contamination deposit of around 270  $\mu$ l containing 4 kBq (activity per cm<sup>2</sup> = 6.25 kBq surface area of skin is 0.64 cm<sup>2</sup>). The pH of the different solutions ranged from 0.5 to 2.5.

<b>Solution</b>	<b>Deposit</b>	<b>Preparation</b>
Pu Nitrate	4 kBq	Evaporation of stock solution + resuspension in H <sub>2</sub> O
Am Nitrate	4 kBq	Evaporation of stock solution + resuspension in H <sub>2</sub> O
Pu DTPA	4 kBq	Evaporation of stock solution + resuspension in H <sub>2</sub> O + <b>111 <math>\mu</math>l DTPA (500 <math>\mu</math>M)</b>
Am DTPA	4 kBq	Evaporation of stock solution + resuspension in H <sub>2</sub> O + <b>16 <math>\mu</math>l of DTPA (500 <math>\mu</math>M)</b>
Pu TBP	4 kBq	Evaporation of stock solution + resuspension in HNO <sub>3</sub> (4 M) Contact for 20 minutes with TBP (30% in n-dodecane v/v) <b>final recovery of organic phase = Pu-TBP</b>
Am DMSO	4 kBq	Evaporation of stock solution + resuspension in 50% DMSO (solution referred to as Am-DMSO)

**Table I:** Preparation of the actinide solutions

### 2.3 Skin contamination and penetration

Skin samples were placed in the Franz cell system, between the donor (DC) and receiver compartment (RC), which was filled with 8 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) as previously described (Tazart et al., 2016). After 30 min at 35°C which corresponds to a skin temperature of 32°C, a deposit of 4 kBq per skin sample was made and each cell was covered

with parafilm to limit evaporation of the contamination solution. After 24 hours of contact, all the contaminant was removed from the DC with repetitive pipetting and the totality of the RC was collected. Skin samples were then removed from the chamber and the *stratum corneum* (SC) separated from epidermis + dermis (ED) using a reproducible cyanoacrylate stripping technique (Teichmann et al., 2005; Förster et al., 2011a).

## 2.4 Radioactivity measurements

The receiver compartment (RC) fluid was recovered in glass vials and evaporated to dryness on a hot plate at 90°C. The residues were then wet-ashed in HNO<sub>3</sub> (2 x 2 mL, 2 M) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 x 1 mL, 30% solution) until a clear solution was obtained. Dry residues were taken up into HNO<sub>3</sub> (2 mL, 2 M), samples were purified by anion exchange (TRU resin columns, Eichrom, Rennes, France) and then analyzed for radioactivity by alpha spectrometry (Ortec Octète PLUS Alpha Spectrometer, detectors ULTRA-AS BU-037-1200-AS). The different skin samples (*stratum corneum* and epidermis + dermis) were calcinated in an oven (Carbolite GPC 1200) using a 54-hour cycle with a maximum temperature of 500°C. The residues were then wet-ashed as described for the RC. The donor compartment (DC) fluid, the skin samples and decontamination washes were analyzed for radioactivity by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2500, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). For the radiochemical and alpha spectrometric analyses a known amount of standard is added to each sample (<sup>242</sup>Pu or <sup>243</sup>Am) at the beginning of the experiment in order to calculate the recovery for each sample. For example recovery from these analyses was 88 ± 6.6 (N =12) which is typical over the number of experiments performed for this study. For this particular experiment total recovery (donor + receiver chamber + skin) was 96.7 ± 13 % of the initial value of 4 kBq

## 2.5 Localization of the activity in the skin

Three techniques were used to visualize the location of the different contaminants in the skin: emulsion autoradiography (Leblond, 1991; Hahn et al., 2004), solid track detector autoradiography using a CR-39 like plastic (Fews and Henshaw, 1983; Lee et al., 2007) and digital autoradiography with the iQID (ionizing-radiation Quantum Imaging Detector) camera (Miller et al., 2014). This last technique is described in more detail below.

After 24 h, skin samples (exposed to conditions as described above) were fixed in buffered formol (4%) for 2-3 days, then dehydrated through an ascending series of alcohols (Automatic Tissue Processor TP020, Leica, Germany) and then embedded in paraffin. Samples (5 µm or

10  $\mu\text{m}$  for the iQID) were cut, deparaffinized and rehydrated for autoradiography and histological analyses. All the autoradiography steps were carried out in a dark room to prevent the exposure of the photographic emulsion to visible light which would lead to uninterpretable slides. Skin sections were incubated for a week with a photographic emulsion (NTB 2K-5, Kodak, France). Following autoradiography development and fixation, the slides were stained with Harris' hematoxylin-eosin.

A CR-39 like plastic (Pollyallyl diglycol carbonate, PADC) (Tastrak, TASL, Bristol, UK) was also used to visualize the activity. Samples (5  $\mu\text{m}$ ) were protected by a Mylar film (3  $\mu\text{m}$ ) and exposed for 48 h to the PADC plastic. After exposure plastic samples were incubated in potassium hydroxide (6 M) at 80°C for one hour, rinsed with warm water and cleaned with alcohol. Both autoradiography sections and PADC slides were observed under a Nikon Diaphot 300 microscope (x20, x40 objectives).

## 2.6 Localization and quantification of the activity using the IQID camera

Digital autoradiographs of Am-contaminated (nitrate) skin sections were obtained using the iQID camera (Miller et al., 2014). This recently developed scintillator-based device, described in detail by Miller et al. (2014), allows real-time detection of alpha radiation and the generation of the two-dimensional distribution of alpha emitters in a sample (Frost et al., 2015; Miller et al., 2015). This technique enables activity quantification in the sample (tissue, cells). Similar to the PADC plastic detector, the sample is protected by a thin Mylar foil (3  $\mu\text{m}$ ) and is placed in contact with the solid scintillator film (ZnS:Ag). The sensitive area of the iQID camera is a disk with a diameter of 40 mm, which covers entirely the surface of a skin section with a length of about 5 mm. The interaction of the alpha particles in the scintillator produces a flash of light that is amplified and recorded by a CCD camera. Each event can be visualized in real time on a computer screen and its interaction location is estimated to the nearest pixel or sub-pixel region of the camera. The iQID acquisition software uses a graphical user interface developed with LabVIEW<sup>TM</sup> (Miller et al 2015). The events collected during the exposure time are processed and compiled into an image. The activity in Becquerels (Bq) was calculated based on the assumption that alpha particles emitted in a solid angle of  $2\pi$  sr are recovered during the exposure of the section (efficacy approximately 100% detection efficiency). Am-contaminated sections (10  $\mu\text{m}$ ) were exposed for 18 hours to the iQID detector.

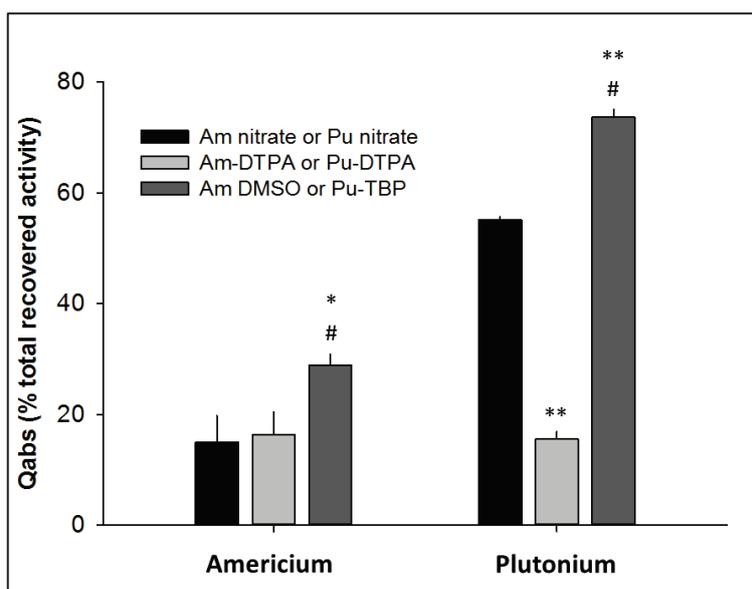
## 2.7 Statistical analysis

Data are presented as the means  $\pm$  standard error (SEM) for each condition (n=6). Skin content of actinides at the end of the experiment is added to receiver compartment fluid values to determine the total quantity of absorbed actinide after 24h (Qabs). Data are given as the fraction of the total recovered activity and the quantity of actinides (DC, RC, skin and Qabs). These recovered values did not differ significantly from the initial activity deposited on the skin samples. Significant differences between the different conditions were compared using a two-tailed unpaired Student's t test with differences considered significant when  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Absorption properties of different actinide preparations

Figure 1 and Table II show data obtained for the activity recovered in the total skin and the receiver compartment (RC) for each formulation called Qabs. The first observations provide evidence for significant differences in the total activity absorbed at 24 hours, represented by the Qabs (skin + RC) for the different forms used for both actinides. The total activity absorbed is higher for Pu (55.4%) compared to Am (15.4%) as nitrate form. In contrast, the Qabs was higher for the solvent-associated form of Pu (Pu-TBP) and Am (Am-DMSO) with respectively 73.5% and 28.8%. However, Qabs of Pu-DTPA and Am-DTPA were quite similar (15.5 and 16.3%) It should be noted that Qabs for Pu-DTPA is significantly reduced (55.4 to 15.5%) compared to Pu nitrate.



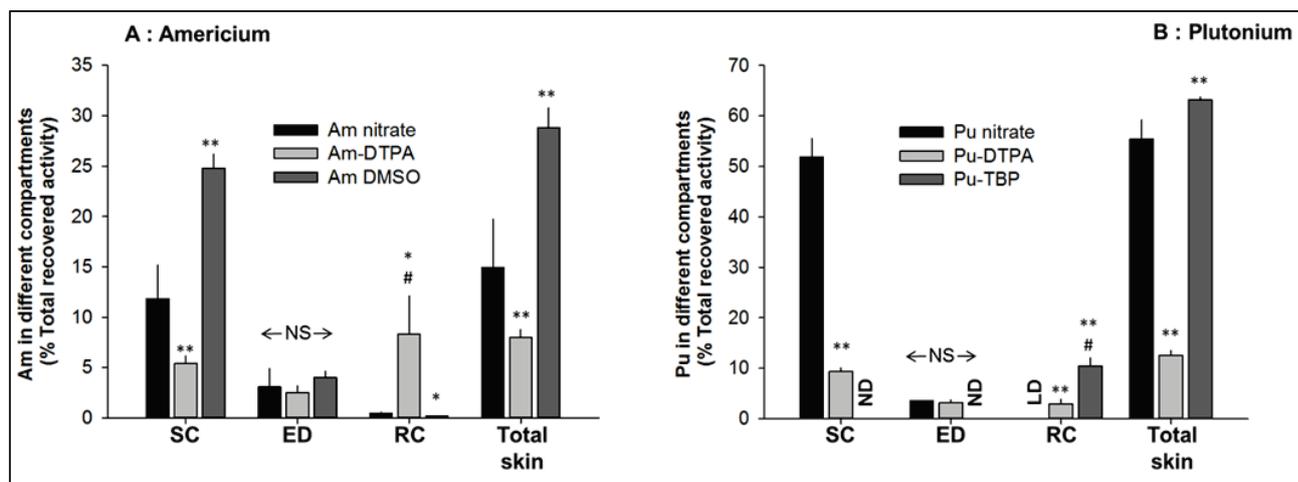
**Figure 1:** Total skin absorption of Am or Pu – different behaviour from different chemical forms.

*Am* and *Pu* activities recovered in the receiver compartment (RC) and skin ( $Q_{abs}$ ) at 24 hours. Data are presented as a percentage of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ), \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  significantly different from controls (nitrate forms), #  $p < 0.05$  different from the Actinide-DTPA form.

### 3.2 Transfer and retention of the actinide preparations in skin layers and receiver compartment

Following 24 h incubation, around  $15 \pm 4.8\%$  of the total activity recovered of Am (nitrate) is located in the skin. Most of this activity is associated with the *stratum corneum* (Figure 2A and Table II). With regard to Pu, figure 2B shows that  $55.4 \pm 3.8\%$  of Pu was recovered in the skin as compared to Am and that most of the activity was again localized in the *stratum corneum*. Similar activities were found in the epidermis and the dermis for both actinides.

Compared to the nitrate form, addition of DMSO to Am results in a much higher level of activity in the skin again mainly bound to the *stratum corneum* (Figure 2A and Table II). Little differences are seen in the lower layers (epidermis + dermis) although some activity was present.



**Figure 2:** Distribution of activity recovered in the different compartments at 24 h after contamination with different actinide forms.

SC: *stratum corneum*, ED: *epidermis + dermis*, RC: *Receiver compartment* and total skin. Data are presented as a percentage of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ), \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$  significantly different from controls (nitrate forms), #  $p < 0.05$  different from the other actinide forms.

Data for SC and ED for the Pu-TBP contamination could not be determined with the cyanoacrylate stripping technique (Figure 2B and Table II). First, the main assumption was

that the *stratum corneum* was dissolved due to the nature of the solvents (TBP and dodecane). Indeed a few fragments were recovered when removing the donor compartment of the contaminant. However, this does not explain the fact that the level of skin contamination was higher (around 66%) compared to Pu nitrate given that the contamination is mainly fixed to the SC (Figure 2B). In fact, the cyanoacrylate glue does not solidify in the presence of solvents and so it was impossible to separate the SC from the deeper skin layers. These results were confirmed by autoradiography. In agreement with a greater amount measured in the receiver compartment the total amount of Pu-TBP transferred was increased by some 76%.

Interestingly less activity is found in *stratum corneum* after incubation with the Am-DTPA complex compared to the nitrate form with no difference in the deeper layers. However, the total activity absorbed ( $Q_{abs}$ ) is similar as Am activity was increased in the RC and reduced in the SC. Am associated with the deeper skin layers was similar for both preparations (Table II). This is in agreement with the greater transcutaneous transfer of the complex (Figure 1), which means that DTPA changes transcutaneous penetration of Am.

Figures 2A and 2B therefore demonstrate a greater transfer through the skin barrier of Am as compared with Pu after a 24 h incubation with a nitrate solution (0.48 % and 0.02 % of the total recovered activity). Indeed, the transfer of Am into the receiver compartment is 24-fold greater than Pu. With regard to Pu transfer, the complex Pu-TBP form penetrates the skin to reach the RC to a much greater extent (500-fold compared to Pu nitrate form). When Am or Pu are complexed to DTPA, in both cases the transfer is increased by some 17- and 148-fold respectively in comparison to the uncomplexed forms of Am or Pu (Figure 2). Lastly the transfer of Am in DMSO is reduced rather than enhanced. Am levels in the RC in this case were close to detection limits. However, the transfer of the Pu-TBP complex was 500-fold greater than the recovered activity of following incubation with Pu nitrate.

The results obtained for Pu-DTPA complex are similar to those of the Am-DTPA complex with a greater transfer and a lower skin deposit especially in the SC. Thus, the complex tends to be less retained by the skin, with more activity recovered in the donor compartment (Table II) and a greater diffusion into the receiver compartment (Figures 1, 2A and 2B). Similarly, there were no significant differences in activity associated with the deeper layers (ED). In both cases, the DTPA-complex has a tendency to cross the skin with similar total absorption of 16 % and 15 % for Am and Pu respectively. It should be noted that this is much lower than

that seen for Pu-TBP. These data show that the transfer of Pu and Am depends on the different formulations and the solubility in complex media.

	DC (% of recovered activity)	SC (% of recovered activity)	ED (% of recovered activity)	Total skin (% of recovered activity)	RC (% of recovered activity)	Qabs (% of recovered activity)
<b>Pu (nitrate)</b>	44.58 ± 1.95	51.88 ± 3.58	3.51 ± 0.23	55.40 ± 3.81	0.02 ± 0.002	55.42
<b>Am (nitrate)</b>	84.57 ± 0.84	11.85 ± 3.33	3.10 ± 1.75	14.95 ± 4.82	0.48 ± 0.13	15.43
<b>Pu DTPA</b>	84.45 ± 1.40	9.33 ± 0.72	3.25 ± 0.55	12.58 ± 0.88	2.96 ± 0.89	15.54
<b>Am DTPA</b>	83.72 ± 4.14	5.42 ± 0.78	2.54 ± 0.61	7.97 ± 0.77	8.31 ± 3.79	16.28
<b>Pu TBP</b>	26.35 ± 1.48	-	-	63.06 ± 2.06	10.45 ± 1.57	73.51
<b>Am DMSO</b>	71.52 ± 0.98	24.77 ± 1.40	4.05 ± 0.62	28.82 ± 2.02	0.21 ± 0.03	28.83

**Table II:** Retention and transfer of the different actinide forms in each compartment.

*Am and Pu activities were recovered in the donor (DC) and receiver (RC) compartments and skin after 24 h incubation with the different actinide forms. The total skin absorption called Qabs is the sum of the activities recovered in the receiver compartment and the skin. Data are presented as a percentage of the total recovered activity and are means ± SEM (n=6) with DC: donor compartment, RC: receiver compartment, SC: stratum corneum, ED: epidermis + dermis and Qabs = RC + total skin.*

Table III sums up all the results obtained in terms of quantity of actinides (ng.cm<sup>-2</sup>) found in each compartment. It highlights that there is much more Pu attached to the skin than Am in terms of % and in quantity. Moreover, for a similar activity (Bq) of Am and Pu solution, the actual quantity in ng is different. This is dependent on the specific activities of the different actinides. The Pu solution contains mostly <sup>238</sup>Pu (87%) but with some <sup>239</sup>Pu (12%). This latter isotope is heavier and determines the total plutonium mass given its lower specific activity (300 fold less than <sup>238</sup>Pu). The specific activity of <sup>241</sup>Am is around 5 fold less than <sup>238</sup>Pu. For

example, for the donor compartment, around 84% is recovered for Pu and Am-DTPA, but in terms of quantity it corresponds respectively to 278.2 ng.cm<sup>-2</sup> and 46.3 ng.cm<sup>-2</sup>. The same phenomenon is observed for the Qabs, with equivalence for the DTPA complex in terms of % of activity (15.5/16.3%) but not in mass (50.6/8.93 ng.cm<sup>-2</sup>) respectively for Pu and Am.

	DC (ng.cm <sup>-2</sup> )	SC (ng.cm <sup>-2</sup> )	ED (ng.cm <sup>-2</sup> )	total skin (ng.cm <sup>-2</sup> )	RC (ng.cm <sup>-2</sup> )	Qabs (ng.cm <sup>-2</sup> )
<b>Pu</b> <b>(nitrate)</b>	154.29 ± 7.7	204.20 ± 16.32	7.58 ± 1.50	211.78 ± 17.82	0.002 ± 2.8x10 <sup>-4</sup>	211.78
<b>Am</b> <b>(nitrate)</b>	47.75 ± 0.45	3.13 ± 0.20	0.65 ± 0.20	3.78 ± 0.40	0.25 ± 0.07	4.03
<b>Pu</b> <b>DTPA</b>	278.24 ± 12.27	30.34 ± 1.38	10.71 ± 1.97	41.05 ± 3.35	9.55 ± 2.78	50.60
<b>Am</b> <b>DTPA</b>	46.37 ± 2.55	2.99 ± 0.39	1.39 ± 0.33	4.38 ± 0.72	4.55 ± 2.03	8.93
<b>Pu</b> <b>TBP</b>	99.51 ± 7.76	-	-	237.25 ± 6.08	38.73 ± 5.32	275.98
<b>Am</b> <b>DMSO</b>	38.45 ± 0.72	5.16 ± 0.35	1.22 ± 0.13	6.38 ± 0.48	0.002 ± 6.3x10 <sup>-4</sup>	6.38

**Table III:** The amount of actinides found in each compartment.

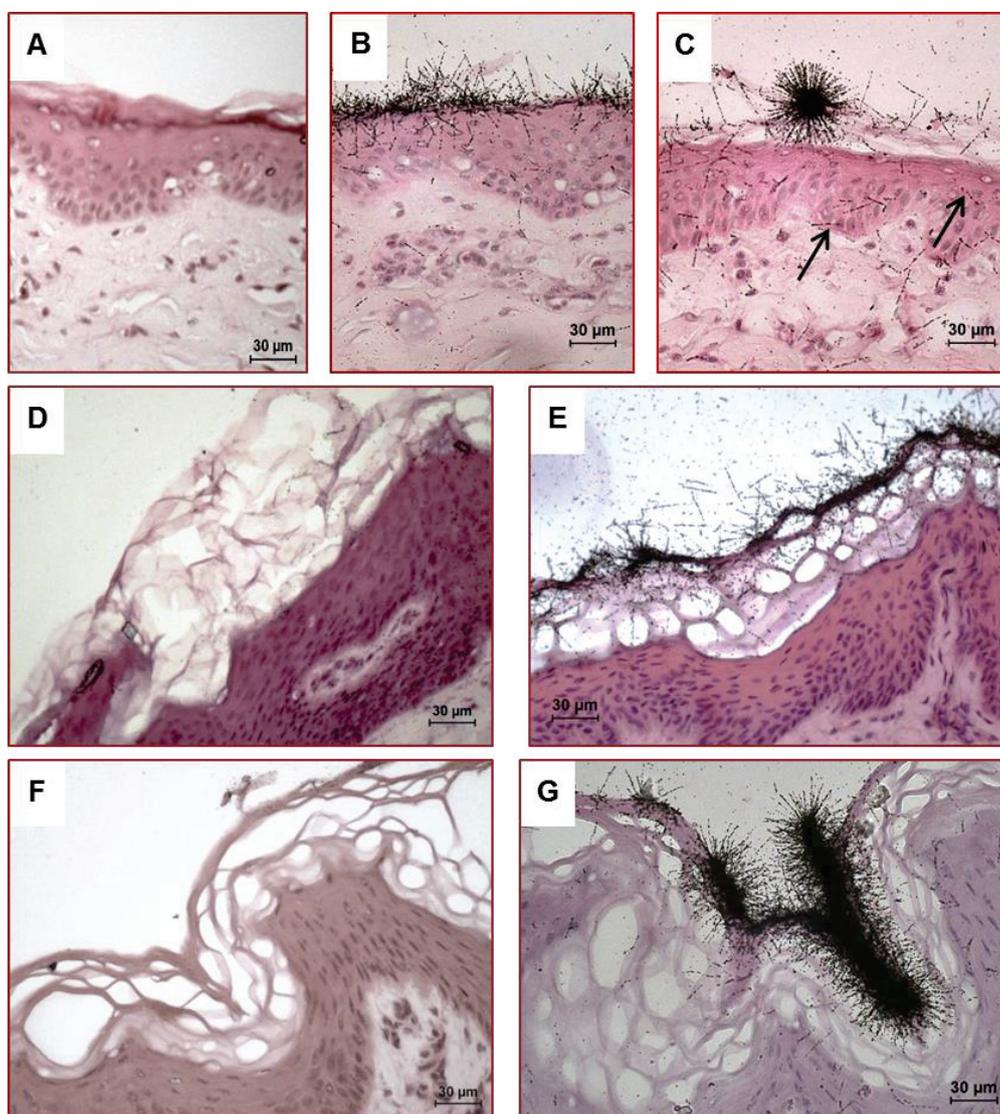
*The quantities of the different actinide solutions were calculated from the specific activities as described in the Materials and Methods. The data are expressed as the means ± SEM in ng.cm<sup>2</sup> of skin in order to normalize to the exposed skin surface area (n=6). DC: donor compartment, RC: receiver compartment, SC: stratum corneum, ED: epidermis + dermis and Qabs = total skin + RC*

These data along with the transfer data demonstrate differential behavior of the two actinides in different forms. Further work was directed towards visualization of activity within the skin layers and eventual modifications of skin structures.

### 3.3 Localization of actinides in skin by imaging approaches

The second part of the study has addressed the question of the differential localization of the two actinides in these different conditions. Figure 3 shows the localization of Am (B) or Pu

(C) after incubation with Am or Pu nitrate for 24 h. In agreement with activity measurements it is clear that most of the activity is fixed to the *stratum corneum*. Some isolated tracks are however visible in the deeper layers (Figure 3 B and C; see arrows).



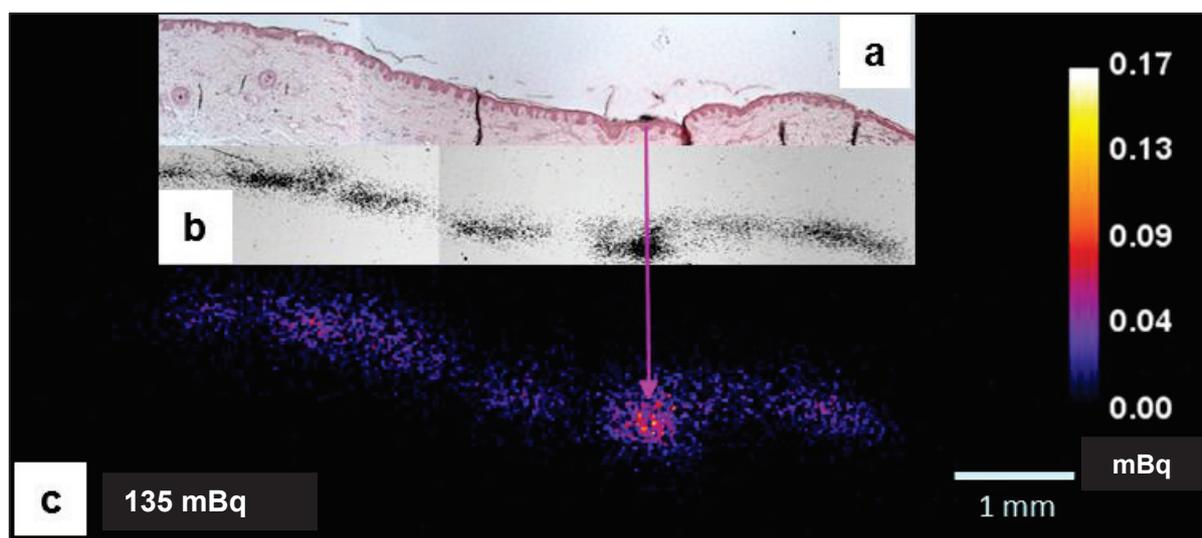
**Figure 3:** Localisation in the skin of activity after contamination with different actinide forms.

Sections were obtained from porcine skin without contamination (A), skin contaminated (24h) with Am nitrate (B), Pu nitrate (C), Skin with DMSO (D), Am-DMSO (E), Skin with TBP (F), Pu-TBP (G) and analysed by emulsion-based autoradiography. For identification of structures the sections were stained with haematoxylin-eosin after the autoradiography step. The arrows show single tracks present in the deeper skin layers. All images were acquired with x 40 objective. The scale bar represents 30 µm.

The comparison of autoradiographs obtained on skin samples incubated (Figure 3E) or not (Figure 3B) with Am-DMSO shows the changes elicited by this solvent. The SC takes on a

“beehive” appearance which is probably due to the generation of solvent-filled spaces. The skin also tended to curl and have a more rigid aspect. The deeper structures appeared identical. The SC structure was also modified in a similar way for skin in contact with Pu-TBP complex (Figure 3G). Again there was the appearance of spaces and structure was more rigid and “curled up”.

Emulsion-based autoradiography provides highly resolved images of alpha tracks directly superimposed on the histological image (Figure 3). However, it is challenging to quantify the relative or absolute activity from this technique. Therefore, in addition to the classical emulsion autoradiography, two other techniques were tested on the same skin sample: the solid state detector CR39 and digital autoradiography. The corresponding autoradiographs are shown in Figure 4a, b and c respectively.



**Figure 4:** Comparison of americium distribution in the skin using three techniques: a) Emulsion autoradiography; b) CR 39; c) iQID camera.

*Skin samples were contaminated with  $^{241}\text{Am}$  (4 kBq) for 24 h. Skin samples were fixed and treated as described in the Materials and Methods. The acquisition time for iQID was 18 hours, the CR 39 contact with the sample was 48 hours and the autoradiography revelation was at 1 week after emulsion incubation. **a:** emulsion autoradiograph, **b:** CR-39 autoradiograph, **c:** image generated by the iQID camera. The arrow shows for clarity the same activity deposit on the stratum corneum. The scale bar of 1 mm applies to all three images.*

As shown in Figure 3, the emulsion autoradiograph of Am nitrate-contaminated skin shows that activity is localized in the outer SC layer. This confirmed the results from activity measurements (Figure 4a). A few isolated tracks are found deeper in the skin in accordance with the low penetration. The autoradiograph obtained with CR-39 like plastic shows the

variation in activity concentration along the *stratum corneum*, with darker areas in locations where activity is more concentrated (Figure 4b). Quantification of activity however remains difficult as the impacts overlap. The image from the iQID camera presents a similar activity distribution as in the CR-39 like plastic image (Figure 4c). In addition, the pixel values converted to activity enable visualization of the relative and absolute activity distribution. The total activity for this section was estimated at 135 mBq. This is largely in agreement with a mean activity from radiochemistry data for a similar surface area ( $228 \pm 80$  mBq). This system clearly has advantages but it can be seen that similar images are obtained using the different techniques.

#### 4. Discussion

Following skin contamination with actinides, these elements adhere to the outermost layer of skin, the *stratum corneum*. This layer is formed of keratinized and flattened cells surrounded by lipids (cholesterol and free fatty acids). These lipids act as an adhesive to maintain the structure of the cells of the *stratum corneum* cells rather like cement used to hold bricks in a wall. This primary barrier is thus essential to skin integrity (Gerasimo et al., 1997; Bolzinger et al., 2012; Benson and Watkinson, 2012). The present study demonstrates that the skin provides an effective barrier to actinides, except for the Pu-TBP, as illustrated by the very low transfer into the receiver compartment. In addition this study demonstrated the higher transfer of Am as compared to Pu.

Plutonium has different properties from americium which is more soluble (ICRP 48, 1986). It is capable of forming hydrolysis products that polymerize generally at a pH greater than 1 (Gerasimo et al., 1997). These polymers can potentially be adsorbed onto all surfaces on contact. This may explain why Pu binds much more to the SC than Am as the latter is less likely to hydrolyze and is also more soluble (ICRP 48, 1986). It is possible that plutonium hydrolysis occurs rapidly on contact with the skin and so the majority of the Pu is trapped into the SC and leading to lower levels in the deeper skin layers. In a study using human skin explants, Tymen and colleagues found similar results after plutonium contamination on human skin explants following just 2 hours contact time in that the majority of Pu was retained by the SC and far less in deeper layers. In the human explants around 4.1 % of Pu was found in the epidermis and the dermis after a two-hour contact which is similar to the data obtained in the present study (3.5 %) even though the contact time was 24 h and the

explants were pig rather than human. The results of these different studies nevertheless, demonstrate that only a small fraction of Pu penetrates to the deeper skin layers.

Moreover, Tymen and colleagues found an activity of 0.02 % in the receiver compartment, exactly what was found in the present study. Indeed, the percentage of transferred Am as compared with Pu is some 24 fold higher, in agreement with the known solubilities of these actinides, with Pu less soluble than Am in aqueous solutions (Nenot and Stather, 1979). Together, these data provide evidence for minimal transfer of Pu across the skin barrier and a strong retention by the SC with less Pu retained in the epidermis and the dermis.

TBP is known to produce skin irritation associated with edema and erythema in animals (NCBI, Pub Chem data base). Moreover, dodecane is an aliphatic hydrocarbon used in the extraction of Pu-TBP and has been shown to be accumulated by the *stratum corneum* and to cause skin irritation and fluidization of lipids (Babu et al., 2004; Förster et al., 2011b). The increased penetration of the complex Pu-TBP may be explained by the dissolution of the intercellular junctions of the *stratum corneum* thus reducing barrier integrity. The increased penetration may be associated with modification of lipid/protein organization and/or the extraction of skin micro constituents that are responsible for maintenance of barrier status (Allenby et al., 1969; Anigbogu et al., 1995; Sapra et al., 2008). In support of this, lipid analysis of skin extracts revealed that solvents removed comparable quantities of the surface lipids (Abrams et al., 1993).

In agreement with these observations, Am-DMSO and Pu-TBP modified skin structure resulting in increased penetration into the skin. Histological analysis demonstrated that skin structure was completely modified and damaged. Am nitrate skin diffusion was greater compared to Am-DMSO. Interestingly, no difference in the transfer to the receiver compartment was noted. Thus, penetration and retention into the skin is increased but not completely to the receiver compartment. In agreement with these results, it was found that DMSO caused the skin membranes to acquire a swollen and rucked appearance (Elfbaum and Laden, 1968). This appearance may be caused by a modification of skin keratin conformation which may be associated with removal of protein bound water by DMSO (Greve et al., 2008). It is thus curious that transfer of into the receiver compartment is reduced in the presence of DMSO. The latter is known to create pores within the lipid bilayer and it maybe that Am<sup>3+</sup> is trapped within these structures (Notman et al., 2008).

More activity was recovered in skin contaminated with Pu-TBP compared to all other forms. The single reported case of human exposure suggests that Pu-TBP complex is absorbed more rapidly (0.04% in 15 minutes) than Pu aqueous solution that did not exceed 0.01% in the first hour (ICRP 48, 1986). The Pu-TBP complex represents a major issue because it passes through the skin barrier in significant amounts ( $39 \text{ ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). This could lead to exposure to high energy alpha irradiation of sensitive stem cells of the basal layer of the epidermis as well as to internal contamination that can affect distant organs. This form is often encountered in the nuclear industry and may be problematic for decontamination protocols. Further work is necessary to define clearly the best decontamination procedures for this complex.

DTPA is not known to disrupt the skin barrier. The data from the present study suggest that both actinide-DTPA complexes are more soluble and transfer is facilitated through the skin barrier. The fact that the Pu-DTPA complex binds considerably less to the SC may be explained by the high affinity of DTPA for Pu (Log K= 29.5) (Ansoborlo et al., 2007). In accordance with these results, more activity is recovered in the donor compartment compared to the nitrate form (Table II). Indeed, Pu will stay attached to DTPA and is therefore less available for fixation to the SC. This suggests that Pu once bound to DTPA is effectively conformationally shielded from eventual ligands of the SC and an increased fraction of the Pu-DTPA complex passes through the skin into the receiver compartment. This indicates that the Pu-DTPA complex increases the solubility of Pu or protects it from hydrolysis. This phenomenon is also identical for the Am-DTPA complex also in agreement with the known high affinity of DTPA for Am (Log K= 26.2). It is unlikely that the Pu- or Am-DTPA dissociates and this explains the reduced fixation to the *stratum corneum*. Actinide-DTPA complexes are not retained in the retention organs (liver and skeleton) and are excreted directly in the urine (Stevens et al., 1978). Similar results have been shown for Pu complexed to DTPA *in vivo* in rats and *ex vivo* in human explants after 24 hours (Tymen et al, 2000). In the second case, a less marked difference was observed between the transfer of Pu and the DTPA-Pu complex (0.02% and 0.08%) to the receiver compartment as compared with the present study (0.02% and 2.96%). However, in the present work DTPA was markedly in excess (1:10) of Pu which may explain this difference. For the Am-DTPA complex, there was a 50% increase in the activity found in the dermis as compared to Am nitrate alone. The reason for this is unclear but it could explain enhanced urinary excretion observed after a decontamination procedure with DTPA as the majority of blood vessels are found in the dermis (personal communication occupational medicine service).

The three imaging techniques used in this work are complementary and allowed the visualization of activity in the different skin layers as well as its quantification. In addition the localization of the highest amounts of activity is in good agreement with the radiochemistry data. The determination of activity using the iQID camera would allow calculation of the absorbed dose. Another interesting and moreover useful application could be in the case of contaminated skin to count wound biopsies and estimate the activity deposited in a relatively short period of time. The iQID camera is also applicable for  $\gamma$  and  $\beta$  radiation, enabling other radionuclides to be detected.

## **5. Conclusion**

The experiments using several different techniques and different conditions provide a global approach to transcutaneous actinide penetration and fixation. The use of an industrial complex Pu-TBP as well as a “medical-end product” complex actinide-DTPA reinforces the need to address decontamination protocols. It would be interesting to evaluate decontamination methods for actinides complexed to other solvents such as dibutyl phosphate (stabilized form of the TBP), dimethylformamide or for other actinides such as Neptunium for which there is no decontamination or decorporation agent. In addition, the iQID camera could be a useful adjunct for dose determination in skin biopsies in an accidental scenario.

## **Acknowledgements**

This work was supported under a co-financing agreement between the Direction Générale de l'Armement (DGA) and the Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA). The authors would like to thank Laurent Miccoli for his help with the preparation of actinide-DTPA complexes, Phillippe Moisy for his help with the TBP extraction protocol and Fabrice Huet for Radiation Protection advice.

## References

- Abrams K, Harvell JD, Shriner D, Wertz P, Maibach H, Maibach HI, Rehfeld SJ. Effect of organic solvents on in vitro human skin water barrier function. *J Invest Dermatol.* 1993; 101(4):609-613.
- Allenby AC, Fletcher J, Schock C, Tees TFS. The effect of heat, pH and organic solvents on the electrical impedance and permeability of excised human skin. *Br J Dermatol.* 1969; 81(4):31-39.
- Anigbogu ANC, Williams AC, Barry BW, Edwards HGM. Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethyl sulfoxide and human stratum corneum. *Int J Pharm.* 1995; 125:265–282.
- Ansoborlo E, Amekraz B, Moulin C, Moulin V, Taran F, Bailly T, Burgada R, Henge-Napoli MH, Jeanson A, Den Auwer C, Bonin L, Moisy P. Review of actinide decorporation with chelating agents. *Comptes Rendus Chimie.* 2007; 10(10–11):1010–1019.
- Babu RJ, Chatterjee A, Ahaghotu E, Singh M. Percutaneous absorption and skin irritation upon low-level prolonged dermal exposure to nonane, dodecane and tetradecane in hairless rats. *Toxicol Ind Health.* 2004; 20(6-10): 109-118.
- Benson HAE and Watkinson A.C. Topical and transdermal drug delivery: Principles and Practice, in: Benson, H.A.E., *Skin Structure, Function, and Permeation.* 2012. Wiley edition. pp. 1–22.
- Bolzinger MA, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012; 17:156–165.
- Breitenstein, BD. 1976 Hanford americium exposure incident: Medical management and chelation therapy. *Health Phys.* 1983; 45(4):855-866.
- Dick IP and Scott RC. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J Pharm Pharmacol.* 1992; 44(8):640-645.
- Elfbaum SG and Laden K. The effect of dimethyl sulphoxide on percutaneous absorption: a mechanistic study: Part I. *J Soc Cosmet Chem.* 1968; 19:119-127.

Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry on pentetate calcium trisodium and pentetate zinc trisodium for treatment of internal contamination with plutonium, americium or curium. Federal Register. 2002; 68:53984-53988.

Fews AP and Henshaw DL. Alpha-particle autoradiography in CR-39: a technique for quantitative assessment of alpha-emitters in biological tissue. Phys Med Biol. 1983; 28(5):459-474.

Förster M, Bolzinger MA, Rovere MR, Damour O, Montagnac G, Briançon S. Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods, Skin Pharmacol Physiol. 2011a; 24:103-112.

Förster M, Bolzinger MA, Ach D, Montagnac G, Briançon S. Ingredients tracking of cosmetic formulations in the skin: a confocal Raman microscopy investigation. Pharm Res. 2011b; 28: 858-872.

Frost SH, Miller BW, Bäck TA, Santos EB, Hamlin DK, Knoblauch SE, Frayo SL, Kenoyer AL, Storb R, Press OW, Wilbur DS, Pagel JM, Sandmaier BM.  $\alpha$ -Imaging Confirmed Efficient Targeting of CD45-Positive Cells After  $^{211}\text{At}$ -Radioimmunotherapy for Hematopoietic Cell Transplantation. J Nucl Med. 2015; 56(11):1766-1773.

Gerasimo P, Crehange G, Cazoulat A, Tymen H. Radionucléides decontamination: study with skin models. 1st International Congress from la Baule October, 1997. <http://www.prevor.com/en/scientific-publications-studies-and-articles-on-diphoterine-solution/> (accessed 03/11/2016).

Goldschmidt B, Regnaut P, Prévot I. Un procédé par solvant pour l'extraction du plutonium de l'uranium dans les piles irradiées. Rapport CEA. 1955; 397, pp.1-16.

Grappin L and Bérard P. Autorisation de mise sur le marché du Ca-DTPA. Radioprotection 2008; 43:465-466.

Grémy O, Tsapis N, Bruel S, Renault D, Van der Meeren A. Decorporation approach following rat lung contamination with a moderately soluble compound of plutonium using local and systemic Ca-DTPA combined chelation. Radiat Res. 2012; 178(3):217-223.

Greve TM, Andersen KB, Nielsen OF. Penetration mechanism of dimethyl sulfoxide in human and pig ear skin: An ATR-FTIR and near-FT Raman spectroscopic in vivo and in vitro study. *Spectroscopy*. 2008; 22(5):405-417.

Griffiths NM, Wilk JC, Abram MC, Renault D, Chau Q, Helfer N, Guichet C, Van der Meeren A. Internal contamination by actinides after wounding: a robust rodent model for assessment of local and distant actinide retention. *Health Phys*. 2012; 103(2):187-194.

Grives S, Phan G, Morat G, Suhard D, Rebiere F, Fattal E. Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion. *J Pharm Sci*. 2015; 104(6):2008-2017.

Hahn FF, Romanov SA, Guilmette RA, Nifatov AP, Diel JH, Zaytseva Y. Plutonium microdistribution in the lungs of Mayak workers. *Radiat Res*. 2004; 161(5):568-581.

Handley TH and Cooper JH. Quantitative electrodeposition of actinides from dimethylsulfoxide. *Anal Chem*. 1969; 41:381-382.

Haschke JM and Pruner RE. Hydrolysis of Plutonium: Corrosion Kinetics in DMSO Solutions Containing Simulated High Explosive and Water. Los Alamos National Laboratory. 1995. report LA-12898-MS. <http://www.osti.gov/scitech/biblio/10114156-BHpmfZ/webviewable/> (accessed 12.10.16).

Hostynek JJ. Factors determining percutaneous metal absorption. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41(3):327-345.

Huckle JE, Sadgrove MP, Pacyniak E, Leed MG, Weber WM, Doyle-Eisele M, Guilmette RA, Agha BJ, Susick RL, Mumper RJ, Jay M. Orally administered DTPA di-ethyl ester for decorporation of (241)Am in dogs: Assessment of safety and efficacy in an inhalation-contamination model. *Int J Radiat Biol*. 2015; 91(7):568-575.

International Commission on Radiological Protection. *The Metabolism of Plutonium and Related Elements*. Oxford; New-York: Pergamon Press; 1986. ICRP 48, Ann. ICRP 16 (2-3).

International Commission on Radiological Protection. *Age-dependent Doses to Members of the Public from Intake of Radionuclides - Part 2 Ingestion Dose Coefficients*. Oxford; New-York: Pergamon Press; 1993. ICRP 67, Ann. ICRP 23 (3-4).

International Commission on Radiological Protection. Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. Oxford; New-York: Pergamon Press; 1994. ICRP 66, Ann. ICRP 24 (1-3).

International Commission on Radiological Protection. Occupational Intakes of Radionuclides: Part 1. Oxford; New-York: Pergamon Press; 2015. ICRP 130, Ann. ICRP 44(2).

Kalmykova ZI, Lemberg VK, Chudin VA. Long-term consequences of the effects of single inhalation of Pu-239 in association with tributyl phosphate and hexachlorobutadiene in rats. *Radiats Biol Radioecol.* 1996; 36(1):88-93.

Kimura T, Nagaishi R, Kato Y, Yoshida Z. Luminescence study on solvation of americium (III), curium (III) and several lanthanide (III) ions in nonaqueous and binary mixed solvents. *Radiochim Acta.* 2001; 89:125–130.

Leblond, CP. Time dimension in cell biology. *Proto- plasma.* 1991; 160:5-38.

Lee MH, Park YJ, Jee KY, Kim WH, Clark SB. Study of an alpha track analysis and a fission track analysis for determining the hot particles contaminated with Pu and U isotopes. *Appl Radiat Isot.* 2007; 65:85-91.

Leggett R.W. Reliability of the ICRP's Dose Coefficients for Members of the Public. III. Plutonium as a Case Study of Uncertainties in the Systemic Biokinetics of Radionuclides. *Radiat Prot Dosimetry* 2003; 106(2):103-120.

Luciani A, Polig E, Lloyd RD, Miller SC. Americium in the beagle dog: biokinetic and dosimetric model. *Health Phys.* 2006; 90(5):459-470.

Métivier H, Piechowski J, Duserre C, Rateau G, Legendre N, Menoux B, Masse R. Biological behaviour of plutonium inhaled by baboons as plutonium n-tributylphosphate complex. Comparison with ICRP models. *Radiat Prot Dosim.* 1989; 26:287–292.

Miller BW, Gregory SJ, Fuller ES, Barrett HH, Barber HB, Furenlid LR. The iQID camera: An ionizing-radiation quantum imaging detector. *Nucl Instrum Methods Phys Res A.* 2014; 767:146-152.

Miller BW, Frost SH, Frayo,SL, Kenoyer AL, Santos E, Jones JC, Green DJ, Hamlin DK, Wilbur DS, Fisher DR, Orozco JJ, Press OW, Pagel JM, Sandmaier BM. Quantitative single-

particle digital autoradiography with  $\alpha$ -particle emitters for targeted radionuclide therapy using the iQID camera. *Med Phys.* 2015; 42(7):4094-4105.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=31357, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31357/> (accessed 19.10.16).

National Council on Radiation Protection. Development of a biokinetics model for radionuclide-contaminated wounds and procedures for their assessment, dosimetry and treatment. 2007. NCRP Report No. 156 (NCRP, Bethesda, MD).

Nenot JC and Stather JW. The Toxicity of Plutonium, Americium and Curium, in: *Physical and chemical properties of biological importance*. Pergamon, 1st edition. 1979. pp.3-9.

Notman R, Anwar J, Briels WJ, Noro MG, Den Otter WK. Simulations of skin barrier function: free energies of hydrophobic and hydrophilic transmembrane pores in ceramide bilayers. *Biophys J.* 2008; 95(10):4763-71.

Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline for the Testing Of Chemicals. Skin Absorption: In Vitro Method. 2004; n°428.

Paquet F, Poney JL, Metivier H, Grillon G, Fritsch P, Burgada R, Bailly T, Raymond KN, Durbin PW. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for enhancing the excretion of plutonium from rat after simulated wound contamination as a tributyl-n-phosphate complex. *Int J Radiat Biol.* 1995; 68(6):663-668.

Sapra B, Jain S, Tiwary AK. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. *AAPS J.* 2008; 10(1):120-132.

Shin H and Kim J. Development of realistic RDD scenarios and their radiological consequence analyses. *Appl Radiat Isot.* 2009; 67(7–8):1516–1520.

Stradling GN, Stather JW, Sumner SA, Moody JC, Hodgson A. The metabolism and decorporation of Pu after inhalation of the tributyl phosphate complex by the rat. *Health Phys.* 1985; 49(3):499-502.

Stevens W, Bruenger FW, Atherton DR, Buster DS, Howerton G. The retention and distribution of  $^{241}\text{Am}$  and  $^{65}\text{Zn}$ , given as DTPA chelates in rats and of  $[^{14}\text{C}]\text{DTPA}$  in rats and beagles. *Radiat Res.* 1978; 75(2):397-409.

Suslova KG, Khokhryakov VF, Sokolova AB, Miller SC. 238Pu: a review of the biokinetics, dosimetry, and implications for human exposures. *Health Phys.* 2012;102(3):251-262.

Takahashi S, Sato H, Kubota Y, Inaba J. Transfer of plutonium to rat embryos in vivo and in vitro. *J Radiat Res.* 1992; 33(4):301-308.

Tazart A, Bérard P, Leiterer A, Ménétrier F. Decontamination of radionuclides from skin: an overview. *Health Phys.* 2013; 105(2):201-207.

Tazart A, Bolzinger MA, Moureau A, Molina T, Coudert S, Angulo JF, Briancon S, Griffiths NM. Penetration and decontamination of americium-241 ex vivo using fresh and frozen pig skin. *Chem Biol Interact.* 2016; pii: S0009-2797(16)30197-1.

Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, Lademann J. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol.* 2005; 125:264-269.

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.* 2000; 76:1417-1424.

Watters RL and Johnson JE. Skin absorption of plutonium in DMSO solution. *Health Phys.* 1970; 19(2):318-320.

Yusov, AB. Photoluminescence of americium (III) in aqueous and organic solutions J. *Radioanal Nucl Chem.* 1990; 143:287-294.

## CHAPITRE V

---

**Actinide-contaminated skin: evaluating  
decontamination efficacy of water, gels and  
chelating agents *in vitro* and *ex vivo***

---



Précédemment, il a été démontré que la pénétration cutanée des actinides dépend de leur forme particulière ou spéciation et qu'un simple lavage à l'eau sans frottement n'est pas suffisant. Un protocole plus approfondi et adapté à plusieurs formes chimiques d'actinides est nécessaire. En effet, le DTPA qui est le traitement recommandé est efficace sur les formes dites modérément soluble comme les nitrates ou les citrates.

Ce dernier chapitre expose les résultats obtenus sur un protocole de décontamination adapté à une situation de terrain, avec une décontamination effectuée deux heures après exposition. Ce protocole a été utilisé sur trois formes d'actinides : l'américium, le plutonium et le plutonium en solution organique complexé au tributylphosphate (TBP). Deux modèles expérimentaux ont été utilisés afin de tester différents produits décontaminants : une poudre de couche cornée bovine (*in vitro*) et de la peau de porc en cellule de Franz (*ex vivo*). Différents produits recommandés ou utilisés par retour d'expérience ont été testés dans ces protocoles : l'eau, un savon radiodécontaminant (Trait rouge®), le DTPA, le LIHOPO, la terre à foulon, l'EHBP. Afin de compléter la liste des décontaminants testés, une formulation en hydrogel du DTPA a été réalisée. Cette forme a été comparée à l'Osmogel, qui possède les mêmes caractéristiques de viscosité que la formulation gel du DTPA.

Les résultats *in vitro* ont mis en évidence les comportements de fixation à la couche cornée (ou *stratum corneum*) des actinides, avec des profils similaires pour le Pu et le Pu-TBP et un profil spécifique pour l'Am. En effet, ce dernier semble ne pas avoir atteint un équilibre dans la fixation contrairement aux deux autres formes de Pu. Cependant, le Pu-TBP se fixe moins et plus lentement à la couche cornée, du fait de la modification de la structure de la kératine du *stratum corneum*. Les différents produits testés *in vitro* et *ex vivo* montrent chacun une efficacité, comparés à une peau non décontaminée. Cependant, les décontaminants les plus efficaces sont le DTPA ainsi que le Trait rouge®. La formulation en gel du DTPA montre une efficacité supérieure comparée à l'Osmogel, utilisé en cas de contamination fixée, et égale à celle du DTPA en ampoule.

Le devenir de la fraction fixée après décontamination reste à déterminer, du fait qu'elle difficile à retirer et pourrait pénétrer plus profondément. Le maintien de l'efficacité après changement de forme galénique est encourageant pour le développement de cette formulation. En effet, elle permettrait une facilité de la prise en charge des contaminations externes par la diminution de volume liquide et le confinement du contaminant dans le gel évitant la dispersion sur d'autres zones cutanées.

**Publication 3: Actinide-contaminated skin: evaluating  
decontamination efficacy of water, gels and chelating agents *in  
vitro* and *ex vivo***

**À soumettre**

**A.Tazart<sup>a,b</sup>, M.A. Bolzinger<sup>bc</sup>, S. Coudert<sup>a</sup>, J.F. Angulo<sup>a</sup>, S. Briançon<sup>b</sup>, N.M. Griffiths<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Laboratoire de Radio Toxicologie, CEA, Université Paris-Saclay, 91297 Arpajon, France.*

<sup>b</sup> *Université de Lyon, F-69008, Lyon, France : Laboratoire de Dermopharmacie et  
Cosmétologie, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), UMR CNRS  
5007, 8, Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France*

## Abstract

Skin contamination by alpha-emitting actinides is a risk for workers during nuclear fuel production and reactor decommissioning. Also the list of items for potential use in radiological dispersal devices includes Plutonium (Pu) and Americium, (Am). The actinide chemical form is important and solvents such as Tributyl phosphate, (TBP) used to extract Pu can influence Pu behavior. The present study has evaluated skin fixation and decontamination products for these different actinide forms in vitro and ex vivo. Binding to the skin and decontamination of Am, Pu and Pu-TBP were evaluated using bovine hide powder (in vitro) and viable pig skin with the Franz cell diffusion system (ex vivo). Commonly-used or recommended decontamination products such as water, cleansing gel, DTPA or LIHOPO as well as a hydrogel DTPA formulation were tested after a two-hour contact time with the contaminant. In vitro and ex vivo binding studies demonstrated that more Pu nitrate is bound to skin as compared to Pu-TBP. Fixation of Am to skin is also significant. Both experimental approaches showed DTPA or cleansing gel washes to be particularly effective for all three actinide preparations with removal of around 90% of bound actinide. DTPA hydrogel form presented a good efficacy compared to Osmogel and an equivalent efficacy to the DTPA solution. These two approaches allow a rapid evaluation of potential decontaminants. However treatments did not significantly decontaminate deeper skin layers indicating a need for additional decontamination procedures.

**Key words:** actinides, skin, decontamination, Pu-TBP, DTPA gel

## 1. Introduction

In recent years, there has been a renewed interest for the decontamination of skin in the context of potential NRBC events. Indeed, skin contamination with radionuclides is one of the most likely risks during NR incidents or accidents occurring in the nuclear industry along with inhalation (Grappin et al., 2007; Bérard et al., 2010; Deas et al., 2016; Rump et al., 2016). The alpha-emitting actinides such as plutonium (Pu) and americium (Am) are potential candidates along with gamma-emitting sources from industrial or hospital sectors. In France, a survey of 548 exposure cases from the nuclear industry sector (AREVA-CEA) was performed to include cases spanning over 30 years (1970 to 2003). The study showed that approximately 53.5% of these cases included skin exposure to actinides of which 17% concerned contamination of healthy skin (Grappin et al., 2007).

The Plutonium Uranium redox extraction process called “PUREX” is a chemical method that has been used for many years in the recycling of spent uranium nuclear fuel to extract uranium (U) and Pu. It separates out the different fission products (Curium, Neptunium, Am ...) by means of a selective organic solvent extraction. Tributyl phosphate (TBP) in dodecane (30%) is the organophosphorus solvent used in this extraction process (Warf, 1949; Alian et al., 1968; Olmez and Eral, 1994; Gaillard et al., 2015). The fission products are recovered in the aqueous phase and plutonium, as the Pu-TBP complex is recovered in the organic phase (Goldschmidt et al., 1955). As this complex is handled by workers during this extraction process or for decommissioning operations, there is a risk of skin contamination.

After skin contamination with these actinides, the main decontamination method consists of simple rinsing of the affected area with lukewarm water, supplemented by non-aggressive mild cleansing gels if available. In the case of residual contamination after these washings, this treatment can be combined with DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) which is the recommended chelation therapy in cases of actinide contamination (FDA, 2002; ASN, 2008; TMT, 2009; Tazart et al., 2013). Damaged or wounded skin is a different scenario and systemic decorporation treatment with DTPA is used with a mild decontamination to limit the risk of internal contamination. However, it has also been suggested that just simple flushing/rinsing of a wound may not be sufficient to decontaminate a wound (Mannis and Brandl, 2015). For healthy skin, systemic decorporation treatment is applied only if a high activity is found after urine analysis which may be sometime after the incident. In cases of residual contamination, the application of an osmotic gel in an occlusive dressing is recommended. The use of an occlusive dressing prevents evaporation, potentiates the

impregnation of the gel and increases the local temperature (Tymen, 2002). However, this approach could enhance contaminant penetration. If the contaminant remains refractory to all of these treatments then more invasive measures, such as tissue excision can be undertaken on healthy skin or on a wound (Bailey et al., 2003; Carbaugh et al., 2010).

There are no formal protocols or tests showing product efficacy except for DTPA that has FDA approval in the U.S. and a marketing authorization in France. Most products are used following feedback from isolated incident where the victim used what was immediately available. The efficacy of the DTPA for decorporation and/or decontamination of certain forms of actinides has been proven in different studies (Tymen et al., 2000; Paquet et al., 2003; Gremy et al., 2012; Kullgren et al., 2012). However, successful chelation treatment with DTPA may be limited in some cases such as mixtures of fission products, insoluble actinide forms or when associated with organic solvents such as Pu-TBP (Poncy et al., 1993; Paquet et al., 1995; Paquet et al., 2003; Ménétrier et al., 2005). For these scenarios, the need of established efficacy tests of commonly-used products is necessary for comparison with the “gold standard” DTPA. Moreover, the latter treatment is not very suitable for a field situation due to the potential risk of spreading the contamination when pouring from the glass vial. In addition, there is also the problem of contaminated liquid waste elimination. This difficult situation underlines the necessity for a better formulation or a more suitable conditioning for external decontamination of actinides. There are other chelators such as the octadentate linear hydroxypyridinone compound 3,4,3-LI(1,2-HOPO) referred to as LIHOPO that has been shown to have good decorporation efficacy in cases of wound contamination with plutonium, americium or uranium (Volf et al., 1996; Paquet et al., 2003; Ramounet-Le Gall et al., 2003), but it has not been tested for intact skin decontamination of Pu or Am. Etidronic acid (1-hydroxyethane 1, 1-diphosphonic acid, HEDP) is a metal chelator that is used in the treatment of osteoporosis. HEDP has been shown to have decorporation efficacy in the rat after a uranium wound contamination and for plutonium and uranium after intact skin contamination (Tymen et al., 2000; Fukuda et al., 2005).

Two experimental approaches were used to investigate the efficacy of the different chosen products (i) *in vitro* bovine hide as a simple “screening” technique to represent outer skin layers, mainly the stratum corneum and (ii) *ex vivo* using skin from pig ears. The use of viable pig ear skin placed in the Franz cell diffusion system is considered a suitable and representative model for human skin (OECD, 2004; Ng et al, 2010) and may be used to test decontamination procedures (Tymen et al, 2002; Spagnul et al, 2015).

The purpose of this work was to evaluate skin binding and decontamination protocols, *in vitro* and *ex vivo*, for plutonium and americium in different conditions (aqueous or organic solutions) using commonly-used or recommended products as well as a hydrogel formulation containing DTPA.

## 2. Material and methods

### 2.1 Porcine skin and bovine hide preparation

Pig ears were obtained from a slaughterhouse with the veterinary department authorization (DDPP Essonne, France). Ears were collected immediately post-euthanasia before carcass scalding and then transported for use on the day of the experiment. The ears were washed and shaved using electric clippers. The cartilage and subcutaneous tissues were removed using a scalpel. Skin samples were then cut into samples to match the Franz cell diameter (0.9 cm). The thickness of the skin samples was measured before assays using micrometer (Mitutoyo Corporation, France) and those of  $1 \pm 0.1$  mm of thickness were selected. Skin integrity was determined by measuring the Trans Epidermal Water Loss (TEWL) (Tewameter TM210, Monaderm, Monaco). The TEWL was measured for 30 seconds and skin samples with TEWL values less than  $15 \text{ g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  were retained.

An additional approach was made using commercially-available bovine hide (Sigma HO162) *in vitro* as an equivalent for stratum corneum layer for a primary evaluation of binding kinetics and subsequent decontamination of actinides.

### 2.2 Contamination solution

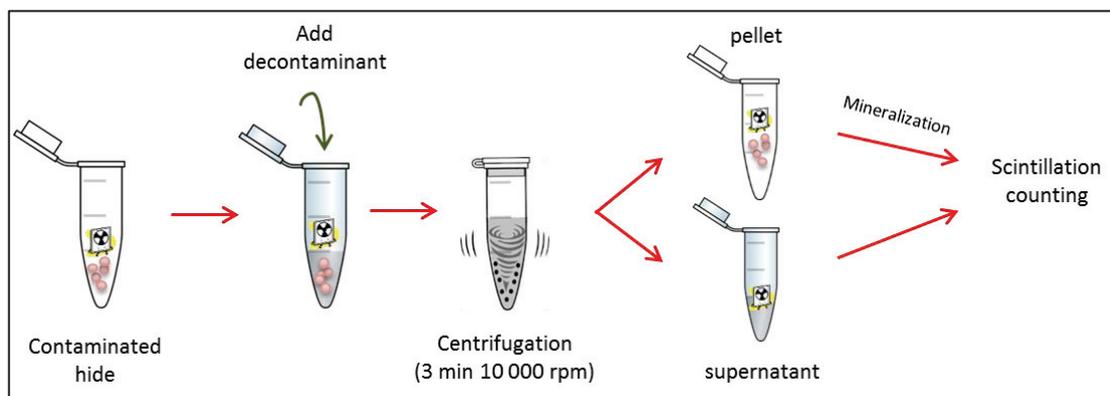
Different contaminant solutions were tested both *in vitro* and *ex vivo*: an aqueous solution of  $^{241}\text{Am}$ , an aqueous solution  $^{238/239}\text{Pu}$  and an organic solution for  $^{238/239}\text{Pu}$  using the complex Pu-TBP in dodecane (30%). The aqueous working solutions of  $^{241}\text{Am}$  and  $^{238}\text{Pu}/^{239}\text{Pu}$  (nitrate for both) were prepared from a stock solution (2 M,  $\text{HNO}_3$ ) followed by evaporation and resuspension in water.

The TBP solution (Sigma-Aldrich, 240494, purity  $\geq 99\%$ ) was first washed with water to remove impurities. A solution of 30% volume of TBP and 70% dodecane (Fischer, 117595000  $\geq 99\%$ ) was prepared. This solution was then contacted with the same volume of  $\text{HNO}_3$  (4 M) with elimination of the aqueous phase. This procedure was repeated three times. The organic phase was then recovered and contacted (v/v) with a Pu solution ( $\text{HNO}_3$ , 4 M) for

20 minutes. The Pu contained in the aqueous phase will pass into the organic phase because of Pu affinity for the oxygen-phosphate group of TBP, where oxygen is free and strongly electronegative. The final organic phase (Pu-TBP) was then separated from the nitric acid phase. An aliquot of the aqueous solution was taken before and after extraction in the TBP phase to assess the Pu extraction yield ( $97 \pm 2\%$ ). For each case, the contamination deposit was around 300  $\mu\text{l}$  containing 4 kBq (activity per  $\text{cm}^2 = 6.25 \text{ kBq}$ ).

### 2.3 Skin actinide binding and decontamination *in vitro*: bovine hide preparation

Bovine hide (H0162, Sigma-Aldrich) ( $10.6 \text{ mg} \pm 1.8$ ,  $n=160$ ) was incubated in Eppendorf tube with a solution (1 mL) containing 200 Bq of Am, Pu or Pu-TBP. Samples were then placed in a rack on an agitator (circular/tilting movement of 8 rpm) in an incubator ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). The incubation was stopped at different times: (15, 30, 60, 90 and 120 min) and samples were centrifuged during 3 minutes at 5 000 rpm to separate free and bound actinide. The supernatant was removed and the pellet mineralized using  $\text{HNO}_3$  (1 x 2 mL, 2 M) and  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 x 1 mL, 30% solution) and resuspended in 1 mL of  $\text{HNO}_3$  (2 M). Radioactivity content of the supernatant and pellet was determined using liquid scintillation counting (Tri-Carb 2500, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).



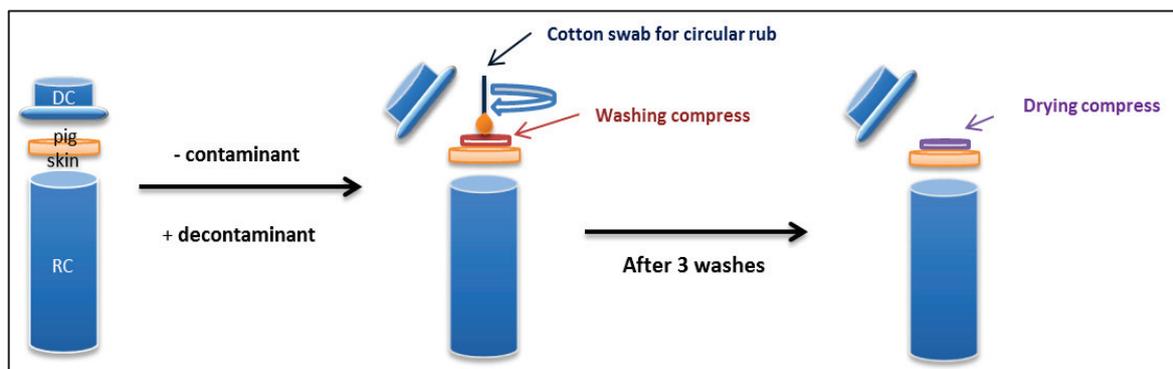
**Figure 1:** Hide decontamination protocol (*in vitro*)

For the decontamination experiment after 2 h incubation, samples were centrifuged at 5 000 rpm during 3 minutes, the supernatant removed and counted. The pellet was then washed with the decontamination products (1mL): water, DTPA (250 mM) obtained from the Pharmacie Centrale des Armées (PCA, Fleury les Aubrais, France), Trait rouge® (cleansing gel 1:1 in water v/v; SORIFA laboratory, Ostwald, France), and LIHOPO (7 mM, Laboratoire NovAliX, Illkirch, France). Each concentration was adapted to the small amount of hide (around 10 mg)

and the low level of activity. This step was repeated two more times, with centrifugation between additions of decontaminants and collection of the supernatant. After the third wash, supernatants and pellets were treated and counted using the technique detailed above.

#### 2.4 Skin actinide decontamination *ex vivo* : pig ear skin explant

Skin samples (0.64 cm<sup>2</sup> surface area) were placed in the Franz cell system, between the donor (DC) and receiver compartment (RC), which was filled with 8 mL of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After a 30 min equilibration time at 35°C, which corresponds to a skin temperature of 32°C, a deposit of 4 kBq (around 300 µL) per skin sample was made and each cell was covered with parafilm to avoid the evaporation of the contamination solution. After a two-hour contact time, the donor compartment with the contaminant solution was removed to test the different decontamination products. The different treatments applied were: water, Trait rouge® 1:1 v/v with water, Fuller's earth (7.2 mg of dry powder per wash, NBC-Sys, St Chamond, France), DTPA, LIHOPO, HEDP (all at 500 mM), proprietary over-the-counter Osmogel (Merck Medication Familiale, Dijon, France) and a DTPA gel formulation (DTPA 500 mM). The use of DTPA is recommended at this concentration, so it was decided to choose this concentration for all the products. Each aqueous product was used with a same volume of 500 µl. For the gels, a quantity of 0.3 g was added to the skin for each treatment.



**Figure 2:** *ex vivo* decontamination protocol using porcine skin

After the decontaminant was added to the skin, a compress was placed on top and a cotton swab was used to spread the product gently with circular movement for 30 seconds (1 rotation per second). The compress was then recovered and the eventual remainder of decontamination was removed from the skin using a pipette and collected in a glass vial. This procedure was repeated three times without delay between washings using the same cotton swabs but a different compress for every wash. Each wash is represented by the compress + remaining

corresponding decontaminant. After the third wash, the skin was dried with another compress (drying swab) in order to assess if any contamination remained on the surface. Skin samples were then removed from the chamber and the *stratum corneum* (SC) separated from epidermis + dermis (ED) using a reproducible cyanoacrylate stripping technique (Teichmann et al., 2005; Förster et al., 2011a).

## 2.5 DTPA gel formulation

To obtain 1g of gel, 0.030 g of blanose™ (sodium carboxymethyl cellulose, Ashland, Alizay, France; 3%) was added to 0.970g of Ca-DTPA solution (500 mM) and agitated for about 30 min at 300 rpm using a magnetic stirrer. The solution was then placed in a water bath at 50°C, with magnetic stirring (300 rpm) until complete homogenization. Stirring was maintained and the gel allowed to cool at room temperature. After 24 hours, the viscosity was measured prior to use in decontamination experiments. The viscosity of this formulation was the in order of 0.550 Pa.s<sup>-1</sup>, which is close to the viscosity of the proprietary Osmogel. The gel has no preservative but it can be kept at 4 °C for maximum two to three days. However, to prevent any bacterial contamination or viscosity changes, the gel was made systematically the day before each experiment. Different formulations were elaborated but this formula was chosen for its viscosity and its stability. The final concentration is about 500 mM Ca-DTPA/ g of gel, similar to that of the solution.

## 2.6 Radioactivity measurements

The receiver compartment samples were recovered in glass vials and evaporated on a hot plate at 90°C. The residues were then wet-ashed in HNO<sub>3</sub> (2 x 2mL, 2M) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 x 1mL, 30% solution) until a clear solution was obtained. Dry residues were taken up into HNO<sub>3</sub> (2 mL, 2 M) and samples were analyzed for radioactivity by alpha-spectrometry (Ortec Octête PLUS Alpha Spectrometer, detectors ULTRA-AS BU-037-1200-AS) following purification by anion exchange (TRU resin columns, Eichrom, Rennes, France). The detection limit of the alpha-spectrometry is 2.5 mBq.

The different skin samples (SC+ED) were dry-ashed in an oven (Carbolite GPC 1200) using a 52-hour cycle with a maximum temperature of 500°C. The residues were then wet-ashed as described for the RC.

The donor compartment, the skin samples and the decontamination washes were analyzed for radioactivity by liquid scintillation counting (Tri-Carb 2500, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). The radioactivity content of the supernatants and the hide pellets (after wet-ashing) were also evaluated using liquid scintillation counting. The activity retained in the cotton swabs, the compresses and the drying swabs was estimated by measuring the  $\gamma$  and X radiation emission spectrum, using a low background germanium detector (BEGe5030P model, Canberra, Montigny-les-Bretonneux, France). The samples were centered in a Petri dish close to the detector surface for measurements. A count time of fifteen minutes was used. The detection limit of this device is 1 Bq for americium and 10 Bq for plutonium.

## 2.7 Statistical analysis

Data are presented as the means  $\pm$  standard deviation (SD, *in vitro* experiments) or standard error of the mean (SEM) for each condition with:  $n=3$  for the *in vitro* experiment,  $n=6$  (Pu-TBP) and  $n=8$  (Am and Pu nitrate) for the *ex vivo* experiments. Data are given as the fraction of the total recovered activity (activity in donor + receiver compartments, in washes and in skin). These recovered values did not differ significantly from the initial activity deposited on the skin samples. Significant differences between the different conditions were compared using a two-tailed unpaired Student's t test with differences considered significant when  $p < 0.05$ .

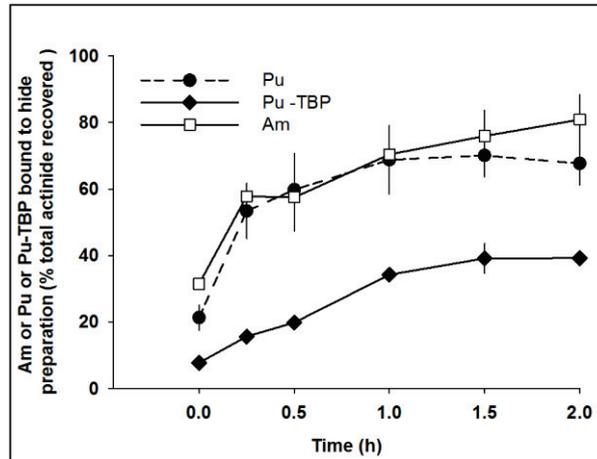
## 3. Results

### 3.1 Actinide binding to bovine hide and decontamination

The objectives of the initial experiments using bovine hide were to assess binding of different actinides and forms and whether this was reversible using different products.

Figure 3 shows the data obtained for binding of the different actinide preparations,  $\text{Am}(\text{NO}_3)_3$ ,  $\text{Pu}(\text{NO}_3)_4$  and Pu-TBP over a period of up to 2 h. These results showed that binding of all actinides increases with time to reach around  $81 \pm 7 \%$ ,  $68 \pm 6 \%$  and  $39 \pm 2 \%$  for Am, Pu and Pu-TBP respectively of the initial activity. However, it appears that binding equilibrium is reached for both Pu preparations but not for Am. In terms of actual actinide mass bound (in ng), around 50 % more Pu is bound as compared to the complex Pu-TBP (8.2 and 4  $\text{ng}\cdot\text{mg}^{-1}$  respectively). Given the much higher specific activity of Am in terms of mass much less is

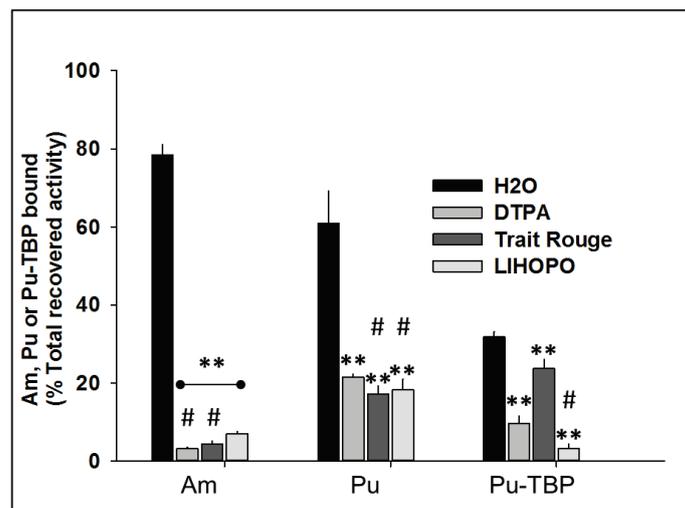
bound at 2 h ( $0.25 \text{ ng mg}^{-1}$ ). This suggests that for Am all available binding sites are not saturated and can explain why equilibrium appears not to be reached.



**Figure 3:** Time course of Am, Pu or Pu-TBP binding to hide.

Hide samples were incubated with Am, Pu or Pu-TBP for up to two hours. Samples were taken at different times, centrifuged and the supernatant (free unbound actinide) and pellet (bound) analyzed for radioactivity. Data are expressed as actinide bound as a % of total recovered activity and are the means  $\pm$  SD ( $n=3$  for each time)

The different decontamination procedures were carried out 2 hours after contact with each contaminant solutions (Figure 4). Compared to controls, all the decontaminant solutions were efficient but a simple water wash was not effective. As an example, DTPA (250 mM) reduced binding to hide (expressed as  $\text{Bq. mg}^{-1}$  of hide) of Am, Pu or Pu-TBP by some  $96 \pm 0.4\%$ ,  $78 \pm 3 \%$  and  $73 \pm 4\%$  respectively. Interestingly, the most effective product for Pu-TBP removal was LIHOPO (7 mM) with  $88 \pm 9 \%$  as compared with the  $73 \pm 4 \%$  reduction by DTPA at a concentration of nearly 36-fold that of LIHOPO (Figure 4)



**Figure 4:** Decontamination of Am, Pu or Pu-TBP from hide.

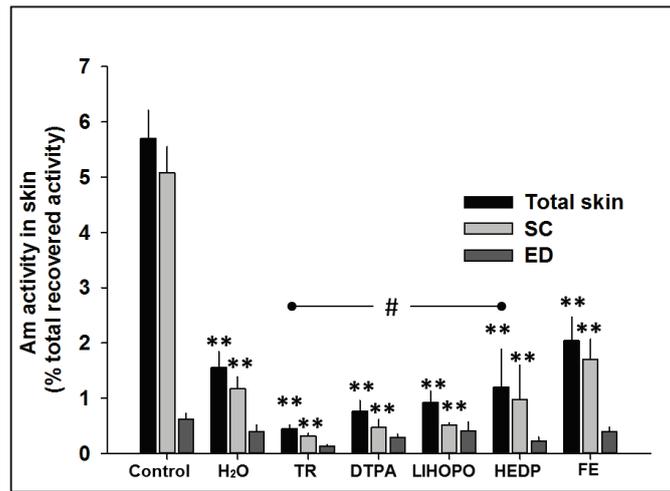
*Bovine hide samples were incubated for two hours with Am, Pu or Pu-TBP. Samples were centrifuged and then treated three times with DTPA (250 mM) or Trait Rouge 1.1 (v/v) water or LIHOPO (7 mM). All supernatants and the pellet were analyzed for radioactivity. Data are expressed as actinide bound as a % of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SD (n=3).*

*\*\* different from control  $p < 0.01$ , # different from the other decontaminant  $p < 0.05$ .*

### **3.2 Actinide binding to porcine skin and decontamination**

The decontamination treatment was performed after a two hour contact time with the different actinides on the pig skin explants. Firstly, it is important to note that in control samples (simple removal of contaminant solution), the majority of the activity was recovered in the donor compartment with around 6 %, 35 % and 19 % of Am, Pu and Pu-TBP respectively remaining bound to the skin (Figure 5,6 and 7). In addition, Am or Pu activity levels were below the limit of detection in the receptor compartment indicating minimal transfer across the skin after a two-hour incubation period. However the complex Pu-TBP penetration was greater and represented around  $0.008 \pm 0.005$  % of total recovered activity in the receptor compartment.

In the case of Am where around 6% remains bound to the skin after removal of the incubation solution, the first wash is most important as the maximum amount of activity is recovered at this step. This represents around 90 % of the total activity recovered from the decontamination procedure. Around 5 % was recovered in the second step and from 0.1 to 0.5% in the final step. There is much less activity in the last drying swab which shows that the remaining activity in the skin (from 0.5 to 2% depending on the decontaminant used) is strongly bound and that a mechanical action does not remove it. These results, with regard to the first application of the decontaminant, were a common finding to both *in vitro* and *ex vivo* approaches and were observed for Am and for decontamination of both Pu and Pu-TBP whatever the decontaminant used.

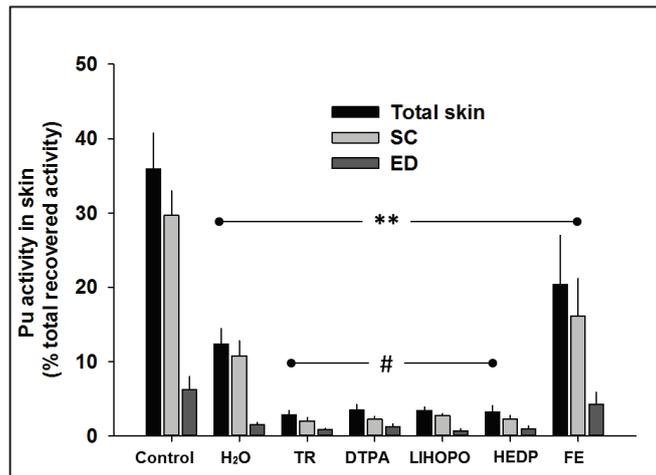


**Figure 5:** Decontamination of Am in the different skin layers

*Porcine skin samples were incubated with Am for two hours. The incubation solution was removed and the samples washed with TR: Trait Rouge 1:1 water (v/v), DTPA, LIHOPO, HEDP (all at 500 mM) and Fuller's earth 7.2 mg of dry powder per addition. Data are skin activity (SC: stratum corneum, ED: epidermis + dermis) expressed as a % of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SEM (n=8) \*\* different from control ( $p < 0.01$ ) and # different from water ( $p < 0.05$ ).*

All treatments reduced Am activity in total skin (SC+ED) and *stratum corneum* samples compared to control ( $p < 0.01$ ) (Figure 5). Am activity in the deeper skin layers (epidermis and dermis) was less affected by the different decontamination treatments with the cleansing gel solution (Trait rouge®) being the most effective (80 % reduction). Dry decontamination using Fuller's earth and simple decontamination with water presented a lower efficacy as compared to other treatments (66 and 76 % reduction respectively). There were no significant differences between DTPA, cleansing gel solution (Trait rouge®), LIHOPO and HEDP which indicates that all these treatments were effective for Am decontamination (Figure 5). These products resulted in around 90 % reduction in skin Am activity.

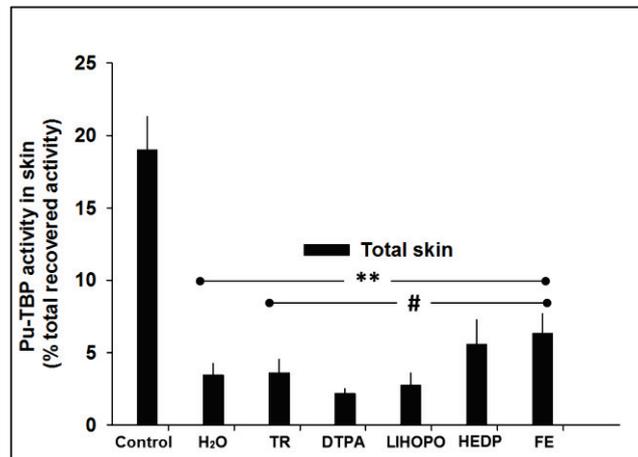
The hierarchy of these products was similar for decontamination of Pu and Pu-TBP. As for Am, there was no significant difference between DTPA, cleansing gel solution, LIHOPO and HEDP. There is only a slight difference of activity content in the deeper layers. Thus, as observed for Am, decontamination of Pu is effective on the surface but less for the epidermis and dermis (Figure 6 and 7).



**Figure 6:** Decontamination of Pu in the different skin layers

Porcine skin samples were incubated with Pu for two hours. The incubation solution was removed and the samples washed with TR: Trait Rouge 1:1 water (v/v), DTPA, LIHOPO, HEDP (all at 500 mM) and Fuller's earth 7.2 mg of dry powder per addition. Data are skin activity (SC: stratum corneum, ED: epidermis+dermis) expressed as a % of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SEM (n=8) \*\* different from control ( $p < 0.01$ ) and # different from water ( $p < 0.05$ ).

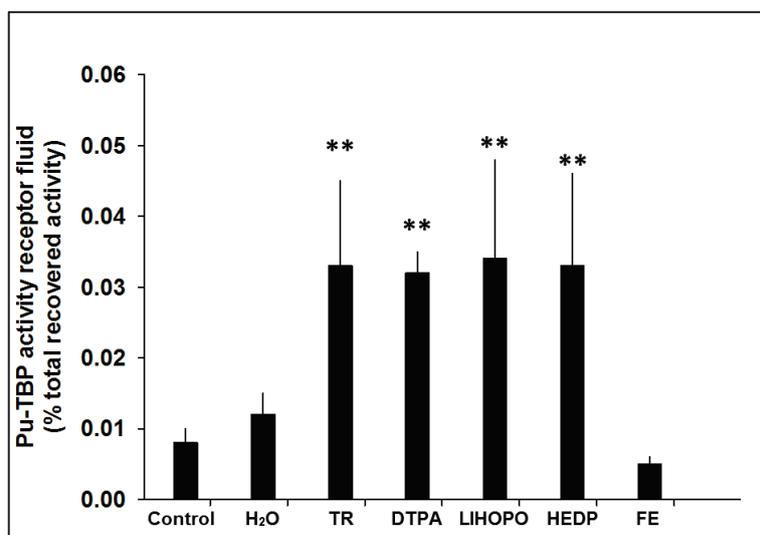
In case of Pu-TBP, only total skin activity was measured as separation of the different layers using the cyanoacrylate technique was not possible since the cyanoacrylate glue is dissolved, presumably by dodecane. Nevertheless, the results show that decontamination is of a similar order to that obtained for removal of Pu in the aqueous nitrate solution (Figure 7).



**Figure 7:** Decontamination efficacy of various products following Pu-TBP skin contamination

Porcine skin samples were incubated with Pu-TBP for two hours. The incubation solution was removed and the samples washed with TR: Trait Rouge 1:1 water (v/v), DTPA, LIHOPO, HEDP (all at 500 mM) and Fuller's earth 7.2 mg of dry powder per addition. Data are skin activity (SC: stratum corneum, ED: epidermis+dermis) expressed as a % of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SEM (n=6) \*\* different from control ( $p < 0.01$ ) and # different from water ( $p < 0.05$ ).

As indicated earlier the receiver compartment results were at the detection limit for alpha-spectrometry after the two hour incubation period for both Pu and Am. However, penetration is higher in case of Pu-TBP and surprisingly, even higher when a decontamination product is applied to the skin. Figure 8 shows the data obtained and indicates that penetration of Pu-TBP is indeed enhanced particularly for the most effective decontaminant products namely the cleansing gel solution, DTPA, LIHOPO and HEDP (around 4-fold increase). However, it should be noted that actual amounts are very small and represent only around 0.03 % of the total recovered activity.



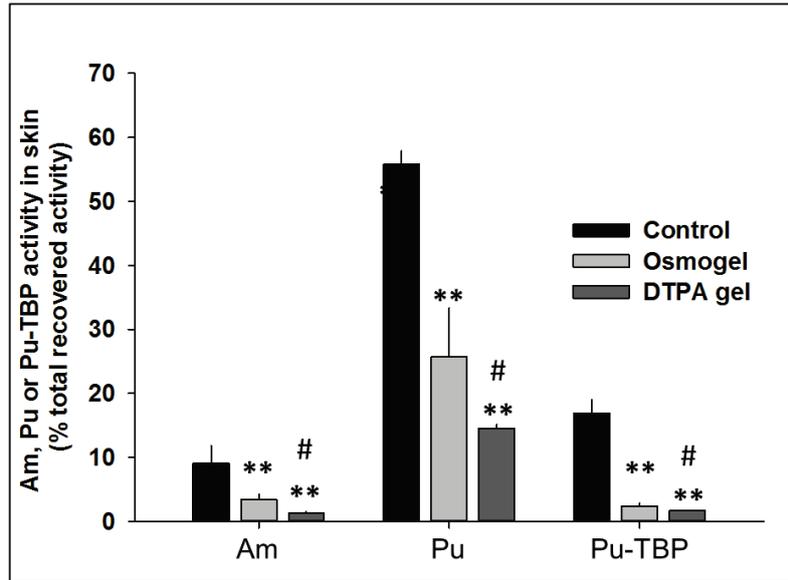
**Figure 8:** Receptor fluid activity after skin contamination with Pu-TBP and decontamination.

*Porcine skin samples were incubated with Pu-TBP for two hours. The incubation solution was removed and the samples washed with the different products (TR: Trait Rouge 1:1 water (v/v), DTPA, LIHOPO, HEDP (all at 500 mM), Fuller's earth 7.2 mg of dry powder per addition) as described in Materials and Methods. At the end of the decontamination procedure the receiver compartment was collected and analysed for radioactivity. Data are expressed as a % of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SEM (n=6). \*\* different from control ( $p < 0.01$ ).*

One of the main objectives of this study was to test the decontamination efficacy of DTPA formulated as a gel. As a control for the modified formulation, a commonly-used gel proprietary preparation (Osmogel) was included in the study. For the gel forms, both osmogel and DTPA have significant skin decontamination actions (Figure 9). However, the DTPA-containing gel has two-fold greater efficacy compared to Osmogel. Nevertheless, the Pu contamination level in the skin after decontamination with Osmogel remains high (25%). These results show the efficiency and real benefit of DTPA added to another formulation.

To observe whether application of gel forms would increase the skin penetration, the receiver compartments were analyzed. It was found that the application of Osmogel did not modify the

penetration profile of the three actinides but the gel containing DTPA, similar to DTPA solution preparation, did increase the Pu (nitrate) penetration by some six-fold (data not shown). Again as indicated previously some activity remains fixed to the skin, for example for Pu this represented around 10 % of the initial deposited activity compared with over 50% for Pu-TBP.



**Figure 9:** Actinide recovery after decontamination of skin using a gel containing DTPA in comparison with Osmogel.

*Porcine skin samples were incubated with Am or Pu or Pu-TBP for two hours. The incubation solution was removed and the samples treated with proprietary Osmogel and DTPA. The skin was analysed for radioactivity as described. Osmogel (0.3 g per addition); DTPA gel prepared as described containing 500 mM DTPA. Data are skin activity expressed as a % of the total recovered activity and are the means  $\pm$  SEM (n=6) \*\* different from control ( $p < 0.01$ ), # different from Osmogel ( $p < 0.05$ ).*

For comparison purposes, decontamination efficacies of the most efficient products are presented in table I. Decontamination factor (DF) is the contamination level of material before decontamination application divided by the contamination level immediately after decontamination (Khan et al. 2013). The decontamination efficacy is the percentage of decontaminant removed and is calculated from the following equation: Efficacy (%) =  $1 - 1/\text{decontamination factor} \times 100$  (Khan et al. 2013).

Decontamination efficiency in %			
Product	Am	Pu	Pu-TBP
Water	80 ± 4	70 ± 15	82 ± 10
Trait rouge®	90 ± 3	92 ± 4	84 ± 12
DTPA solution	90 ± 6	91 ± 5	90 ± 3
Osmogel	63 ± 10	54 ± 14	86 ± 3
DTPA hydrogel	85 ± 7	74 ± 3	90 ± 1

**Table I:** Comparison of the decontamination efficacies of different products following skin contamination with Am, Pu and Pu-TBP.

*Skin explants were incubated for two hours with Am or Pu or Pu-TBP. Decontamination procedures as described in Materials and Methods were carried out using different products. These data compare water, DTPA (500 mM), the proprietary Osmogel and a gel containing DTPA (500 mM). Decontamination efficacy was calculated as described. Data are the means ± SD (n=6).*

The data show that the DTPA hydrogel is the most efficient for the organic form of Pu but not for Pu nitrate for which DTPA solution is the most efficient decontaminant. Osmogel is not particularly effective for Pu-TBP compared to the other products, even water. Overall, DTPA remains the most effective decontaminant although the cleansing gel (Trait rouge®) is also very effective for removal of Pu or Am nitrate solutions from skin.

#### 4. Discussion

The present study provides comparative data on the efficacy of different decontaminant products using a rapid *in vitro* technique and a more elaborate *ex vivo* technique using viable skin explants from pig ears. Both techniques provide similar information and have advantages and disadvantages. The *in vitro* technique using a bovine hide preparation as a surrogate for the external skin layer (*stratum corneum*) is easy, quick and cheap and allows a rapid screening of products. A similar technique using skin obtained from podiatry clinics was used to investigate the binding kinetics of cobalt and cesium (Tymen et al., 2002) as well to test various decontamination products for plutonium and uranium (Tymen et al., 2000). It showed different fixation profiles of cesium and cobalt, with a rapid fixation of cesium compared to

cobalt. Similarly, the present work with actinides, demonstrated a difference between binding of Am, Pu or the complex Pu-TBP. These data support the concept of external contamination of skin by actinides by adhering to the outer *stratum corneum* and that this occurs rapidly. The *stratum corneum* is the primary barrier to external aggression and may also be considered as a sink for contaminants that may modulate skin penetration and release contamination to the epidermis and dermis (Rougier et al., 1983; Hafeez et al., 2016). The mechanism of how actinides bind to the *stratum corneum* is unknown but it would be worthwhile to carry out an extraction analysis of proteins and lipids in order to determine which components bind the actinides.

The *ex vivo* technique using explants obtained from pig ears and maintained in a viable system also demonstrates differences between the three actinide preparations as observed with the *in vitro* approach. The data thus reinforce the initial observations *in vitro* in that most of the actinide binding is to the *stratum corneum* with a much lower amount reaching the deeper layers or indeed crossing the skin barrier completely. This is in agreement with previous studies that demonstrate the very poor skin penetration of actinides (ICRP 48, 1986; Tymen et al., 2000; Tazart et al., 2016). Reducing barrier integrity by wounds, abrasions, chemicals or by a decontamination procedure can lead to increased actinide penetration. This was observed for Pu-TBP where significantly more activity was measured in the receiver compartment. This could be associated with the Pu-TBP neutral complex or the presence of dodecane that is known to fluidize membrane components and cause skin irritation (Babu et al., 2004, Förster et al., 2011b). Thus, the two methods demonstrated a strong binding/adherence of the different actinide preparations. These data provided the background for the study of different ways in which to remove actinide skin contamination. Both techniques were used to compare the different products.

The choice of products stemmed from discussion with occupational health services in the nuclear industry (CEA, AREVA). As indicated earlier, decontamination for actinides ranges from water, cleansing gel to the authorized chelator DTPA. Trait rouge® is a concentrated skin cleansing gel and is suggested by the makers (Sorifa) as a radiodecontaminant. Fuller's earth is a clay material that contains bentonite which has been shown to have adsorptive properties for plutonium (Begg et al., 2015). This product has been mainly used in cases of skin contamination with chemical agents in the NRBC context (Taysse et al., 2011, Rolland et al., 2013; Salerno et al., 2016). DTPA is used for treatment of both external and internal actinide contamination and provided the gold standard for this study. In the search for actinide chelators a wide range of compounds have been tried and tested perhaps the most

promising to date is LIHOPO (Paquet et al., 2003; An et al., 2016). HEDP a bisphosphonate that has metal chelating properties, including iron, has also been shown to have some efficacy for uranium and plutonium decontamination and so these two latter products were also included in the study (Tymen et al., 2000; Fukuda et al., 2005). The rapid adherence of actinides to skin and the amount of time the contaminant remains on the skin is important. All the protocols for removal were begun after two hours of contact. This time was chosen as being reasonable in the event of an accident and particularly if the worker was unaware of possible contamination. The primary objective of this work was to study decontamination products rather than transfer across the skin which was observed to be minimal for the two-hour contact time.

It is clear from the results of either method that the first wash is the most effective whatever the product used, which was also demonstrated in the study of Mannis and Brandl (Manis and Brandl, 2015). This does indeed suggest a non-specific wash-out effect or physical displacement of loosely-fixed actinide. Moreover, the water wash of actinide-contaminated hide was ineffective which supports the idea a physical action (swabs for example). In both experimental procedures, the same products have more or less the same efficacy namely DTPA, Trait rouge® and LIHOPO. Although these products removed over 90% of the contamination, some remains attached to the skin, particularly to the *stratum corneum*. One possible explanation is these actinides are hydrolyzed (irreversible reaction) on contact with the skin to form hydroxyl complexes, which can lead to the formation of an almost inert colloidal macromolecular network that cannot be dislodged (Morss et al., 2006). Moreover, Pu is capable of forming hydrolysis products that polymerize as soon as the pH is greater than 3 which is less than that of skin (Vitorges, 1999; Métivier, 2000). In fact, it seems that to a certain point, decontamination is successful as the first wash presumably removes the majority of the soluble fraction and then the second and the third washes are less efficient due to this insoluble fraction that cannot be dislodged, even with the best decontaminant. This would then act as a “sink” and possibly result in contamination to deeper skin layers or to systemic absorption. Therefore, it would be interesting to investigate the fate of this fixed part to improve decontamination procedures.

In the present study, the radiodecontamination cleansing gel (Trait rouge®) was very efficient, and at least equivalent to DTPA in both experimental systems. This gel has also been shown to be effective for uranium decontamination. However, the gel was left on the skin for 24 hours and migration of uranium through skin layers was increased (Grives et al., 2015). This increased penetration may be explained by the hydration of the skin,

permeabilization of skin membranes so leading to the dissolution of the intercellular lipids of the *stratum corneum* by the surfactants contained in the cleansing gel, which eventually damage the layer (Tymen et al., 2002; Grives et al., 2015). If a prolonged contact between gel and the skin promotes the penetration, the use of cleansing gels containing surfactants must be done only in simple, rapid washing which is similar to the present protocol, and therefore not in an occlusive dressing. The present data support this in that all the effective decontamination products led to increased activity in the receptor chamber indicative of increased transcutaneous transfer albeit very low levels. Besides, dissolution of intercellular lipids leading to enhanced transfer chelation of actinides by DTPA or LIHOPO may increase solubility or protect the actinide from hydrolysis at skin pH. Recent work has demonstrated that transcutaneous penetration of Am- or Pu-DTPA complexes is enhanced (Tazart et al., 2017).

The need for a form that does not require water is an important issue due to a possible lack of water or contaminated water on site, which was the case at the Fukushima Daiichi plant. For this reason, Fuller's earth (solid) was included in the study due to its use for chemical skin contamination. However, poor efficacy was observed in case of actinide skin contamination. The DTPA gel formulation proved very efficient for the removal of all actinide preparations and compared favorably with the DTPA solution. The hydrogel form of DTPA is more suitable and easier to handle in the field, compared to a glass vial that has to be broken. In addition, a gel form traps and isolates the contamination, so avoiding possible inhalation (volatile compound) and dispersion to other skin areas. In the present work, proprietary Osmogel was chosen for comparison of the excipient but without active ingredient. It has the same viscosity as the DTPA hydrogel and an osmolarity of 2030 mOsmol/L. In fact, it was challenging to obtain a comparable viscosity with only water and carboxymethyl cellulose (CMC), due to the high osmolarity of the DTPA solution (around 1800 mOsmol/L H<sub>2</sub>O). It would however seem that the decontamination efficacy of the DTPA gel (or indeed solution) cannot be due entirely to an osmotic effect. Another formulation that would be interesting to study is a "peel-off gel", which solidifies in contact of the skin. This formulation presents even more advantages such as an easy removal and a solid waste management that is easier and cheaper compared to the liquid waste. Moreover, during the removal, some contaminated SC layers may also be stripped off so adding to the decontamination procedure. However, care is necessary in order to avoid too harsh a treatment which would lead to skin damage, loss of barrier integrity and so the penetration in deeper layers.

There is more and more interest concerning DTPA formulations, for instance another gel form (non aqueous) has been tested using a prodrug DTPA derivative (penta-ethyl ester) (Zhang et al., 2013). The aim of this particular formulation was in fact to target decorporation using a transdermal delivery to the systemic system rather than for external skin decontamination. Thus gel DTPA forms, either as a pro-drug or parent compound, could be suitable for various situations such as mass decontamination, nuclear industry incidents, victim self-administration in addition to follow-up or long term treatments. After a skin contamination, the local dose depends particularly on the type of emitter, and different skin parameters such as the surface, the area or the thickness. Therefore skin decontamination represents an important step to implement in order to decrease the local dose and an eventual uptake leading to an internal dose.

## **5. Conclusion**

Two models were used in this work to evaluate skin binding profiles and subsequent decontamination using different products. *In vitro* results showed different binding profiles for Am, Pu and Pu-TBP. The decontamination protocols presented in this work showed a high efficiency for the gold standard DTPA, the radiodecontaminant cleansing gel as well as two other chelators, LIHOPO and HEDP. A DTPA hydrogel preparation presented a good efficacy compared to Osmogel and an equivalent efficacy with the DTPA solution. This formulation offers many advantages and could be promising for further toxicology assessment and testing in combination with other protocols such as occlusive dressing or on damaged skin.

## **Acknowledgement**

The authors would like to thank Direction Générale de l'Armement (DGA) for their financial support, Fabrice Huet for Radiation Protection advice Laurent, Miccoli for the LIHOPO preparation and Jocelyne Pelletier for her help on the gel formulations.

## References

Alian A, Sanad W, Khalifa H. Extraction of certain elements from aqueous methanol, ethanol and acetone by tridodecylamine and tributyl phosphate. *Talanta* 15:249-255; 1968.

An DD, Kullgren B, Jarvis EE, Abergel RJ. From early prophylaxis to delayed treatment: Establishing the plutonium decorporation activity window of hydroxypyridinonate chelating agents. *Chem Biol Interact* pii: S0009-2797(16)30103-X; 2016.

ASN. Autorité de Sureté Nucléaire. Guide national d'intervention médicale en cas d'évènement nucléaire ou radiologique. 2008 (In french). [www.asn.fr/index.php/Sinformer/Publications/Guides-pour-lesprofessionnels/Situation-d-urgence/Guide-national-d-intervention-medicale-en-cas-d-evenement-nucleaire-ou-radiologique](http://www.asn.fr/index.php/Sinformer/Publications/Guides-pour-lesprofessionnels/Situation-d-urgence/Guide-national-d-intervention-medicale-en-cas-d-evenement-nucleaire-ou-radiologique). (Accessed 16/01/17)

Babu RJ, Chatterjee A, Ahaghotu E, Singh M. Percutaneous absorption and skin irritation upon low-level prolonged dermal exposure to nonane, dodecane and tetradecane in hairless rats. *Toxicol Ind Health* 20:109-118; 2004.

Bailey BR, Eckerman KF, Townsend LW. An analysis of a puncture wound case with medical intervention. *Radiat Prot Dosimetry* 105:509-512; 2003.

Begg JD, Zavarin M, Tumey SJ, Kersting AB. Plutonium sorption and desorption behavior on bentonite. *J Environ Radioact* 141:106-114; 2015.

Bérard P, Michel X, Ménétrier F, Laroche P. Medical management of a cutaneous contamination. *Health Phys* 99:572-576; 2010.

Carbaugh EH, Lynch TP, Antonio CL, Medina-Del Valle F. Twenty-four years of follow-up for a Hanford plutonium wound case. *Health Phys* 99:483-494; 2010.

Chudin VA. Effect of the inhalation of tributyl phosphate on the behavior of Pu-239 in the bodies of rats. *Gig Sanit* 4:71-72; 1989.

Deas SD, Huprikar N, Skabelund A. Radiation exposure and lung disease in today's nuclear world. *Curr Opin Pulm Med* 2016. (Epub ahead of print)

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for industry on pentetate calcium trisodium and pentetate zinc trisodium for treatment of internal contamination with plutonium, americium or curium. *Federal Register* 68:53984-53988; 2002.

<http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/FR%20Doc%2003-23489.htm/> (accessed 04.11.16)

Förster M, Bolzinger MA, Rovere MR, Damour O, Montagnac G, Briançon S. Confocal Raman microspectroscopy for evaluating the stratum corneum removal by 3 standard methods. *Skin Pharmacol Physiol* 24:103-112; 2011a.

Förster M, Bolzinger MA, Ach D, Montagnac G, Briançon S. Ingredients tracking of cosmetic formulations in the skin: a confocal Raman microscopy investigation. *Pharm Res* 28:858-872; 2011b.

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* 89:81-88; 2005.

Gaillard DC, Boltoeva M, Billard I, Georg S, Mazan V, Ouadi A, Ternova D, Hennig C. Insights into the mechanism of extraction of uranium (VI) from nitric acid solution into an ionic liquid by using tri-n-butyl phosphate. *Chemphyschem* 16:2653-2662; 2015.

Gerasimo P, Crehange G, Cazoulat A, Tymen H. Radionuclides decontamination: study with skin models. 1st International Congress from la Baule October, 1997. <http://www.prevor.com/en/scientific-publications-studies-and-articles-on-diphoterine-solution/> (accessed 30/11/2016).

Goldschmidt B, Regnaut P, Prévot I. Un procédé par solvant pour l'extraction du plutonium de l'uranium dans les piles irradiées. *Rapport CEA 397:1-16*; 1955.

Grappin L, Berard 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. *Radiat Prot Dosimetry* 127:435-439; 2007.

Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. *AAPS PharmSciTech* 11:1432-1441; 2010.

Grémy O, Tsapis N, Bruel S, Renault D, Van der Meeren A. Decorporation approach following rat lung contamination with a moderately soluble compound of plutonium using local and systemic Ca-DTPA combined chelation. *Radiat Res* 178:217-223; 2012.

Grives S, Phan G, Morat G, Suhard D, Rebiere F, Fattal E. Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion. *J Pharm Sci* 104:2008-2017; 2015.

Hafeez F, Chiang A, Hui X, Zhu H, Kamili F, Maibach HI. Stratum corneum reservoir as a predictive method for in vitro percutaneous absorption. *J Appl Toxicol* 36:1003-1010; 2016.

Henge-Napoli MH, Archimbaud M, Ansoborlo E, Metivier H, Gourmelon P. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for reducing the retention of uranium in rat after acute administration. *Int. J. Radiat Biol* 68:389-393; 1995.

ICRP, 1986. The Metabolism of Plutonium and Related Elements. ICRP Publication 48. *Ann. ICRP* 16 (2-3).

Kalmykova ZI, Lemberg VK, Chudin VA. Long-term consequences of the effects of single inhalation of Pu-239 in association with tributyl phosphate and hexachlorobutadiene in rats. *Radiats Biol Radioecol* 36:88-93; 1996.

Khan AW, Kotta S, Rana S, Ansari SH, Sharma RK, Ali J. Skin decontamination cream for radiological contaminants: Formulation development and evaluation. *Int J Pharm Investig.* 3:54-9; 2013.

Kullgren B, Jarvis EE, An DD, Abergel RJ. Actinide chelation: biodistribution and in vivo complex stability of the targeted metal ions. *Toxicol Mech Methods* 23:18-26; 2013.

Mannis D, Brandl A. Efficacy of common decontamination methods for cleaning contaminated wounds. *Health Phys* 108(1 Suppl 1):S5-S12; 2015.

Ménétrier F, Grappin L, Raynaud P, Courtay C, Wood R, Joussineau S, List V, Stradling GN, Taylor DM, Bérard P, Morcillo MA, Rencova J. Treatment of accidental intakes of plutonium and americium: guidance notes. *Appl Radiat Isot* 62:829-846; 2005.

Métivier H. Plutonium : Mythes et Réalités. Chapitre 2 : Le plutonium, découverte et propriétés. EDP Sciences 23-40; 2010.

Morss LR, Edelstein NM, Fuger J. The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements. Third edition, published by Springer, The Netherlands. 2006.

OECD, Guideline for the Testing Of Chemicals. Skin Absorption: In Vitro Method. 2004; 428 OECD, Paris.

Olmez S, Eral M. Extraction of uranium from acidic solutions by TBP impregnated polyurethane foam. *Biol Trace Elem Res* 43-45:731-735; 1994.

Paquet F, Poncy JL, Metivier H, Grillon G, Fritsch P, Burgada R, Bailly T, Raymond KN, Durbin PW. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for enhancing the excretion of plutonium from rat

after simulated wound contamination as a tributyl-n-phosphate complex. *Int J Radiat Biol* 68:663-668; 1995.

Paquet F, Chazel V, Houpert P, Guilmette R, Muggenburg B. Efficacy of 3,4,3-LI(1,2-HOPO) for decorporation of Pu, Am and U from rats injected intramuscularly with high-fired particles of MOX. *Radiat Prot Dosimetry* 105:521-525; 2003.

Poncy JL, Rateau G, Burgada R, Bailly T, Leroux Y, Raymond KN, Durbin PW, Masse R. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for reducing the retention of <sup>238</sup>Pu in rat after inhalation of the tributyl phosphate complex. *Int J Radiat Biol* 64:431-436; 1993.

Ramounet-Le Gall B, Grillon G, Rateau G, Burgada R, Bailly T, Fritsch P. Comparative decorporation efficacy of 3,4,3-LIHOPO, 4,4,4-LIHOPO and DTPA after contamination of rats with soluble forms of <sup>238</sup>Pu and <sup>233</sup>U. *Radiat Prot Dosimetry* 105:535-538; 2003.

Rolland P, Bolzinger MA, Cruz C, Josse D, Briançon S. Hairy skin exposure to VX in vitro : effectiveness of delayed contamination. *Toxicol In Vitro* 27:358-366; 2013.

Rougier A, Dupuis D, Lotte C, Roguet R, Schaefer H. In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. *J Invest Dermatol* 8:275-278; 1983.

Rump A, Stricklin D, Lamkowski A, Eder S, Abend M, Port M. The Impact of Time on Decorporation Efficacy After a "Dirty Bomb" Attack Studied by Simulation. *Drug Res (Stuttg)* 66:607-613; 2016.

Salerno A, Bolzinger MA, Rolland P, Chevalier Y, Josse D, Briançon S. Pickering emulsions for skin decontamination. *Toxicol In Vitro* 34 :45-54 ; 2016.

Spagnul A, Bouvier-Capely C, Phan G, Landon G, Tessier C, Suhard D, Rebière F, Agarande M, Fattal E. Ex vivo decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene. *Eur J Pharm Biopharm* 79:258-267; 2011.

Taysse L, Dorandeu F, Daulon S, Foquin A, Perrier N, Lallement G, Breton P. Cutaneous challenge with chemical warfare agents in the SKH-1 hairless mouse (II): effects of some currently used skin decontaminants (RSDL and Fuller's earth) against liquid sulphur mustard and VX exposure. *Hum Exp Toxicol* 30:491-498; 2011.

Tazart A, Bérard P, Leiterer A, Ménétrier F. Decontamination of radionuclides from skin: an overview. *Health Phys* 105:201-207; 2013.

Tazart A, Bolzinger MA, Moureau A, Molina T, Coudert S, Angulo JF, Briançon S, Griffiths NM. Penetration and decontamination of americium-241 ex vivo using fresh and frozen pig skin. *Chem Biol Interact* pii: S0009-2797(16)30197-1; 2016.

Tazart A, Bolzinger MA, Coudert S, Lamart S, Miller BW, Angulo JF, Briançon S, Griffiths NM. Skin absorption of actinides: influence of solvents or chelates on skin penetration ex vivo. *Int J Radiat Biol Mar* 3:1-10. doi: 10.1080/09553002.2017.1293865. [Epub ahead of print]

Teichmann A, Jacobi U, Ossadnik M, Richter H, Koch S, Sterry W, Lademann J. Differential stripping: determination of the amount of topically applied substances penetrated into the hair follicles. *J Invest Dermatol* 125:264-269; 2005.

TMT handbook: Triage, Monitoring and Treatment of people exposed to ionizing radiation following a malevolent act, consortium members of a European Commission program, SCK-CEN, NRPA, HPA, WHO, STUK, Enviros and CLOR Oslo, Norway: Lobo Media AS; 2009.

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* 76:1417-1424 ; 2000.

Tymen H. Contribution à l'étude de la contamination externe par des produits radioactifs : contamination cutanée par les cobalts radioactifs sous forme soluble et décontamination. Thèse de pharmacie. (2002), 272 p.

Vitorges P. Chimie des actinides. *Techniques de l'Ingénieur*; 1999. <http://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42457210-bn3520for.pdf>. (accessed 14/12/16).

Volf V, Burgada R, Raymond KN, Durbin PW. Treatment with 3,4,3-LIHOPO of simulated wounds contaminated with plutonium and americium in rat. *Int J Radiat Biol* 70:109-114; 1996.

Warf JC. Extraction of Cerium (IV) Nitrate by Butyl Phosphate. *J Am Chem Soc* 71:3257-3258; 1949.

Zhang Y, Sadgrove MP, Sueda K, Yang YT, Pacyniak EK, Kagel JR, Braun BA, Zamboni WC, Mumper RJ, Jay M. Nonaqueous gel for the transdermal delivery of a DTPA penta-ethyl ester prodrug. *AAPS J* 15:523-532; 2013.

---

## **Discussion générale et conclusions**

---



L'objectif essentiel de ce travail de recherche a été de caractériser la pénétration et la décontamination cutanée de l'américium et du plutonium. Ces deux radioéléments sont les émetteurs-alpha présents dans la chaîne du combustible nucléaire. En cas d'accident chez le travailleur isolé ou en cas d'évènement de grande ampleur, il existe une forte probabilité d'une contamination cutanée.

La problématique était la suivante : hormis les problèmes radiotoxicologiques liés à une contamination cutanée par les actinides, la voie transcutanée est-elle une voie significative pour leur diffusion dans l'organisme ? Et dans ce cas quels sont les moyens disponibles pour limiter cette diffusion ? Cette étude se place dans un cadre où de nombreux décontaminants sont proposés sans pour autant qu'il existe une preuve de leur efficacité. La décontamination cutanée des actinides représente un réel enjeu pour les travailleurs de l'industrie du fait de la variété d'éléments et de formes chimiques auxquelles ils peuvent être exposés.

Afin de répondre à ces questions de terrain, deux approches (*in vitro* et *ex vivo*) ont été utilisées lors de ces travaux. Les contraintes spécifiques associées à l'utilisation de radioéléments ont été prises en compte tout au long de ce travail. La manipulation de matière radioactive nécessite un apprentissage spécifique avec la mise en place d'un protocole et d'une pratique rigoureuse afin de protéger à la fois l'expérimentateur et son environnement de risques radiologiques potentiels.

### **1. Justification du modèle et choix de décontaminants**

Deux stratégies sont mises en œuvre pour traiter une contamination cutanée par les actinides. La première est la décontamination cutanée qui a pour objectif d'éliminer l'élément de la zone cutanée contaminée et de limiter son entrée dans l'organisme. La seconde est la décorporation qui consiste à administrer par voie intraveineuse ou orale des agents chélatants comme le DTPA et dont l'objectif est d'accélérer l'excrétion par la voie urinaire du radioélément ayant pénétré dans l'organisme.

Au sein du laboratoire de radiotoxicologie, il existe depuis 50 ans des travaux sur les actinides sur des modèles *in vivo* répondant à la problématique de la contamination interne et de la décorporation chez le travailleur exposé. Ces travaux ont bénéficié à la mise en place au sein du laboratoire de techniques expérimentales *ex vivo*, afin de répondre à l'autre volet qu'est la contamination externe, permettant non seulement d'étudier la pénétration des radioéléments mais également leur décontamination. L'ensemble des études *ex vivo* a été mené sur des

explants d'oreille de porc montés en cellules de diffusion de Franz, selon un mode opératoire précédemment défini.

Les cellules de diffusion de Franz ont initialement été développées pour les études de pénétration cutanée de substances (principe actif, cosmétiques...), de radioéléments (Tymen et al., 2000) et plus récemment des nanoparticules (Sahle et al., 2016). Facile à mettre en œuvre, ce système permet d'éviter l'utilisation d'un grand nombre d'animaux *in vivo*. C'est la raison pour laquelle nous avons fait le choix de travailler exclusivement avec ce système afin de ne pas euthanasier des animaux pour des études de décontamination alors qu'il existe d'autres méthodes représentatives. Pour cela, des explants de peau de la face externe des oreilles ont été utilisés. Plus faciles à obtenir que des biopsies de peau humaine et moins coûteuses, ces peaux ont l'avantage de constituer un bon modèle alternatif, puisque la peau de porc est la plus représentative de la peau humaine (Jacobi et al., 2007).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons choisi d'étudier la première stratégie de décontamination en testant l'efficacité de différents traitements de décontamination cutanée, en se basant sur un protocole établi après 2h d'exposition. Ce temps a été choisi car il correspond à un temps moyen entre l'exposition et la décontamination pour un travailleur. En effet, un travailleur ne sait pas nécessairement qu'il est contaminé dans l'instant mais peut le découvrir après un contrôle. Pour les accidents de plus grande ampleur, ce temps peut en effet être rallongé du fait de l'affluence des victimes. C'est pourquoi nous avons décidé d'observer une décontamination par lavage et la pénétration de ces actinides 24 heures après contamination. Après avoir démontré *in vitro*, la capacité de fixation des actinides à cette couche cornée ainsi que la décontamination de certains produits (Chapitre V), nous avons décidé d'étudier ces paramètres sur un autre modèle.

Les études de diffusion transcutanée ont été menées sur des cellules de Franz durant 24 heures, durée maximale assurant le maintien de l'intégrité des explants de peau (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 de la solution déposée sur la peau au cours des 24 heures d'expérimentation et donc d'éviter le phénomène de concentration à la surface cutanée qui peut influencer sur le flux de passage transcutané. De plus, cette condition peut être représentative des conditions réellement rencontrées dans les cas de

contamination cutanée. En effet, après décontamination, un pansement est appliqué s'il reste une contamination résiduelle afin de limiter la dispersion de radioéléments.

Une activité de 4 kBq par cellule a été initialement fixée pour la solution de contamination, permettant d'être au-delà de la limite de détection des différentes techniques utilisées dans ces travaux (scintillation liquide, spectrométrie alpha...). De plus, le choix d'une telle activité a été fixé selon des mesures de radioprotection afin de ne pas dépasser l'activité manipulable en paillasse non ventilée. Cela permet également de contrôler une éventuelle contamination du poste de travail. La contamination des explants de peau a été réalisée avec une solution de nitrate d'américium et de plutonium. Ce composé a été choisi car il a été identifié comme étant modérément soluble et transférable, et donc une des formes les plus utilisées dans l'industrie nucléaire. Il fait donc partie des composés les plus préoccupants en cas de contamination avec le complexe TBP.

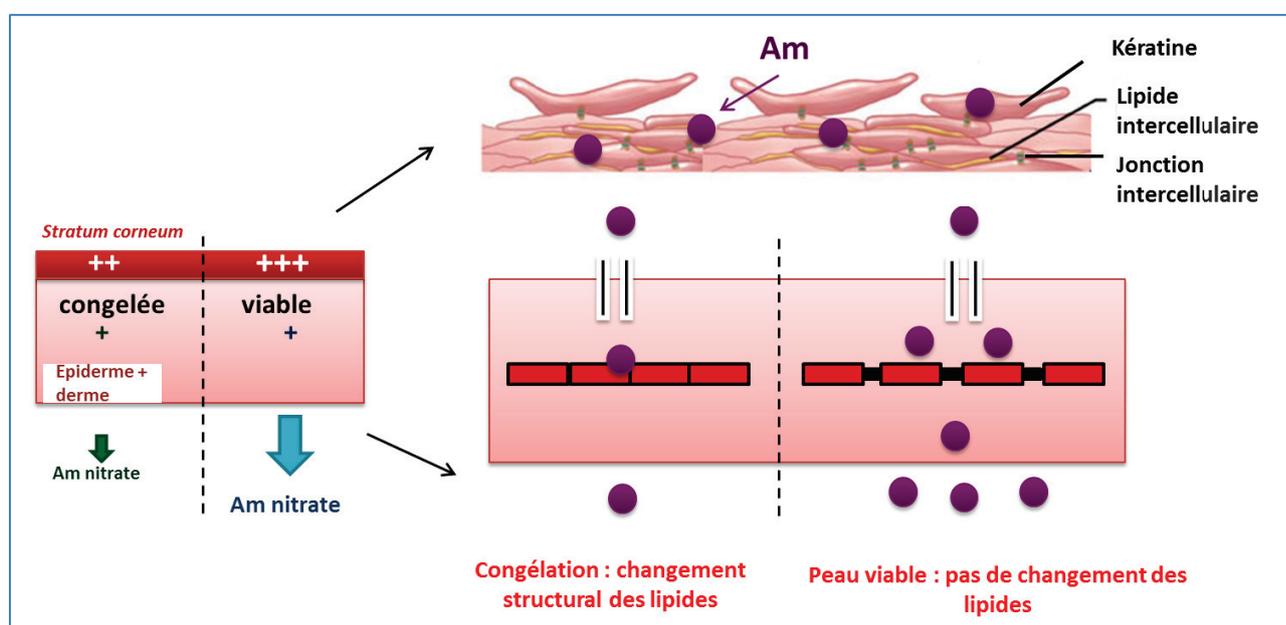
Le pH de la solution contaminée a quant à lui été fixé à  $\text{pH} \leq 2$  pour deux principales raisons. Le plutonium et l'américium sont connus pour leur phénomène d'hydrolyse dépendant de la concentration commençant à  $\text{pH}=3$ . Ce phénomène d'hydrolyse conduit à la précipitation irréversible des actinides en une forme insoluble (Vitorges, 1999), qui ne pénètrent donc pas dans la peau. L'emploi de solutions contaminées acides peut conduire à l'apparition de brûlures chimiques. Cependant, nos solutions de travail n'ont pas été remises en solution dans des acides forts mais dans de l'eau distillée et aucune lésion cutanée n'a été observée sur les coupes histologiques. Bien qu'au contact de la peau, une fraction sera hydrolysée, nous avons fait ce choix pour travailler dans des conditions réelles et optimales, avec des solutions proches de celles manipulées par les travailleurs de l'industrie.

## 2. Discussion des résultats

Une première estimation *in vitro* de la capacité de fixation de ces actinides à la couche cornée a été effectuée, tout d'abord par une étude de cinétique utilisant de la poudre de couche cornée bovine et ensuite, par une étude de décontamination de différents produits sur cette poudre de couche cornée. Ces premières données ont suggéré une forte fixation des actinides avec néanmoins une efficacité de décontamination du Trait rouge® et du DTPA supérieure à celle d'autres décontaminants comme l'EHBP ou le LIHOPO, qui présente tout de même une efficacité proche du DTPA à faible concentration. Ce modèle a en outre permis de caractériser le premier contact du contaminant avec la peau. De plus, ce modèle présente plusieurs avantages tels que la rapidité, une facilité de prise en main et un coût relativement faible. Ces

résultats nous ont permis d'établir par la suite un protocole de décontamination applicable à la peau. Cependant, cela reste une technique limitée du fait de la simplification de la structure (monocouche), ne prenant donc pas en compte l'ensemble des phénomènes physiologiques cutanés. Elle reste tout de même intéressante pour une procédure de criblage de molécules ou produits ayant potentiellement un pouvoir décontaminant et/ou décorporant (cas de la plaie) avant de passer à un modèle plus élaboré (*in vivo* ou *ex vivo*).

Ainsi, les études ultérieures ont été focalisées sur la diffusion transcutanée et la décontamination cutanée de différentes formes de l'américium et du plutonium. *A priori*, il semble évident que les études les plus pertinentes soient celles réalisées *in vivo*. Cependant, pour répondre à notre problématique et pour des raisons de simplification expérimentale, nous avons décidé d'utiliser un modèle *ex vivo* qui nous a également permis de montrer un potentiel transport actif, par comparaison entre une peau viable et une peau congelée. Cette technique, par l'OCDE, est définie comme l'outil de référence pour les études de la pénétration cutanée de substances. Il permet à la fois l'évaluation de l'activité associée à la peau et également la pénétration des actinides. Cette première évaluation a montré qu'il existe bien une différence du profil de pénétration et de rétention dans la peau congelée, supérieures en cas de peau viable.



**Figure 1 :** Hypothèse sur la fixation de l'américium dans la peau

Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que l'Am va se fixer au niveau de la protéine majoritaire (la kératine) et des lipides du *stratum corneum*. La diminution de transfert dans le

compartiment receveur de la peau congelée peut s'expliquer par une éventuelle modification de la structure des lipides de l'épiderme et du derme lors de la congélation (figure 1). Cela expliquerait notamment la différence d'activité d'Am mesurée au niveau du *stratum corneum* dans la peau viable, qui serait représentée par la fraction d'Am liée aux lipides.

Les différences d'activité obtenues dans le compartiment récepteur de la peau viable soulèvent la question d'un éventuel transport spécifique de l'américium présent dans les tissus viables. La technique de microscopie optique n'a montré aucune modification structurale majeure. L'hypothèse principale est que la congélation induit des changements structuraux des lipides cutanés (Bianco et al., 2014). C'est pourquoi, pour la suite de ces travaux, il a été décidé d'utiliser uniquement le modèle de peau viable dans les études de pénétration et de décontamination, pour se rapprocher au maximum d'une situation *in vivo*. Les expérimentations ont été menées sur des explants de peau entière constitués de l'épiderme et du derme. L'utilisation d'explants entiers a permis de mettre en évidence la contamination de l'épiderme et du derme. Ce modèle ne prenant pas en compte la résorption par la circulation sanguine, l'emploi de peaux entières en cellule de Franz peut donc conduire à une sous-estimation du passage cutané. Cependant, dans notre étude de la cinétique de diffusion percutanée, le passage de ces radioéléments à travers la peau a été estimé à 0,01 à 0,1 % à 24 heures respectivement pour le Pu et l'Am, ce qui est en accord avec les données obtenues *in vivo* chez le porc (ICRP 48, 1986).

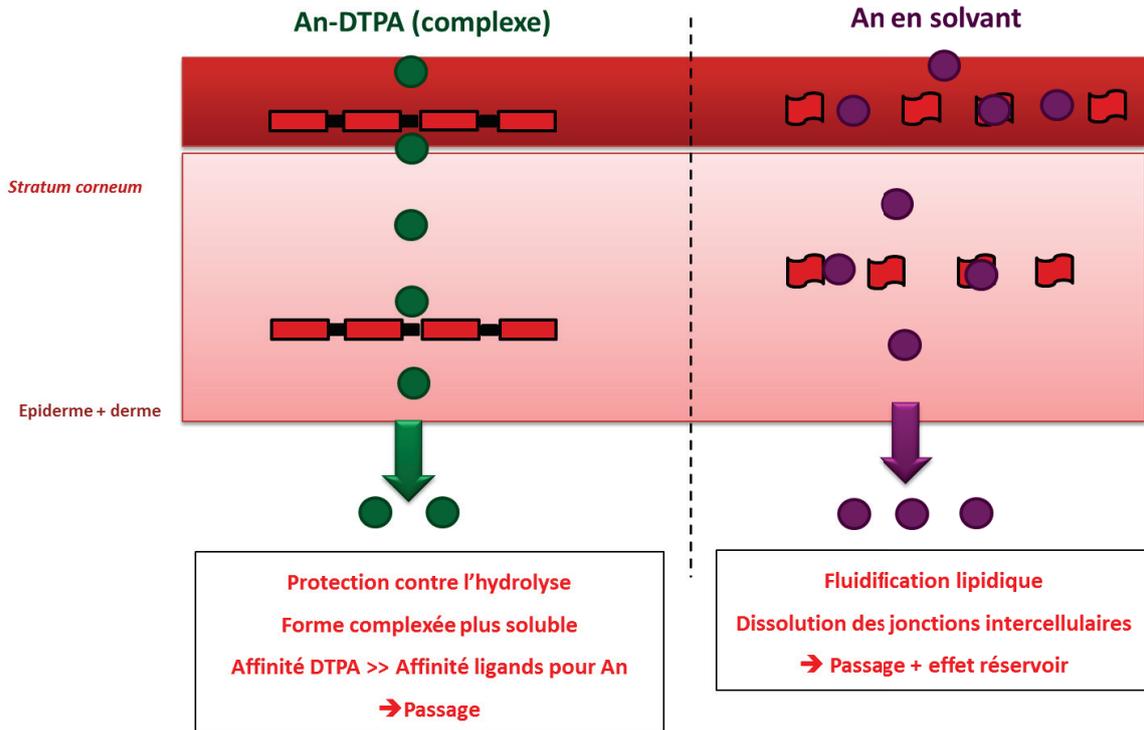
L'étude de pénétration des contaminants sous différentes formes, notamment le complexe Pu-TBP utilisé dans l'industrie nucléaire, a montré l'influence du véhicule (solution organique ou aqueuse) sur la pénétration ainsi que sur la structure cutanée. En effet, le complexe Pu-TBP mélangé au dodécane reste problématique du fait qu'il présente à la fois les effets radiotoxicologiques du plutonium et les effets des solvants sur la peau. Il a également été étudié lors d'une contamination par inhalation avec dans ce cas, une efficacité supérieure du LIHOPO comparé au DTPA pour la décorporation du Pu (Poncy et al., 1993), contrairement aux résultats obtenus en décontamination. Le TBP est connu pour causer une irritation cutanée associée à un œdème et à un érythème chez l'animal (NCBI, Pub Chem base de données). De plus, le dodécane s'avère être accumulé dans le *stratum corneum* et provoquer une fluidisation des lipides (Babu et al., 2004). La pénétration accrue du complexe Pu-TBP peut s'expliquer par la combinaison de ces solvants provoquant la dissolution des jonctions intercellulaires du *stratum corneum* réduisant ainsi l'intégrité de la barrière. Dans ce cas, l'augmentation de la pénétration peut possiblement être associée à une modification de

l'organisation des lipides et/ou protéines responsables du maintien du statut de barrière (Allenby et al., 1969, Sapra et al, 2008). À l'appui de cette hypothèse, une analyse lipidique d'extraits cutanés a révélé que les solvants pouvaient éliminer des quantités significatives des lipides de surface (Abrams et al., 1993). Les forts niveaux d'activité retrouvés dans la peau et le compartiment receveur pour le complexe Pu-TBP soulèvent donc la problématique de la dose par l'exposition  $\alpha$  des cellules souches sensibles de la couche basale de l'épiderme ou encore des cellules souches du follicule pileux cutané, nécessaire à sa régénération. De plus, une fois dans la circulation systémique, ce complexe provoquera également une exposition au niveau des organes de rétention (foie et squelette) où le Pu-TBP va s'accumuler.

Les complexes actinide-DTPA ont également présenté un comportement particulier. La haute affinité du chélateur avec ces actinides, rendant peu probable la dissociation du complexe, explique la fixation réduite au *stratum corneum*. Cependant, l'augmentation d'activité retrouvée dans le compartiment receveur montre que le complexe DTPA présente une solubilité supérieure et qu'il pourrait protéger les actinides de l'hydrolyse. Les complexes actinide-DTPA ne sont pas retenus dans les organes de rétention et sont excrétés directement dans l'urine (Stevens et al., 1978), diminuant les risques d'exposition aux rayonnements contrairement au complexe TBP. L'étude du complexe actinide-DTPA a été réalisée suite à des discussions avec les médecins traitants ayant pris en charge des incidents chez le travailleur. En effet, ils ont constaté une augmentation de l'excrétion urinaire de Pu suite à une décontamination au DTPA sur peau saine. Ces travaux renforcent donc ces observations de terrain validant une l'hypothèse du transfert cutané facilité de ces complexes.

Les comportements spécifiques des formes complexées au DTPA peuvent s'expliquer par différentes hypothèses, décrites dans la figure 2. En effet, l'augmentation de transfert dans le compartiment receveur et la diminution de la rétention cutanée de ces complexes peut avoir pour origine le fait que :

- (i) Le DTPA va protéger l'actinide de l'hydrolyse, provoquée par le pH acide de la peau (4,5 à 5,5)
- (ii) La forme complexée est plus soluble que l'actinide seul et permettra un transfert facilité
- (iii) L'affinité du DTPA pour ces actinides est beaucoup plus forte que l'affinité des ligands cutanés pour ces actinides, empêchant donc la rétention et augmentant le transfert



**Figure 2** : Hypothèse sur les complexes Actinide-DTPA (An-DTPA) et les formes en solvant

Pour la forme Pu-TBP, l'augmentation de transfert dans le compartiment receveur et de la rétention cutanée peut s'expliquer par le fait que :

- (i) Le TBP et le dodécane provoque une fluidification des lipides cutanés
- (ii) Ils peuvent également être à l'origine d'une dissolution des jonctions intercellulaires (cadhérines, intégrines ...)

Les trois techniques d'imagerie utilisées dans ce travail sont des approches complémentaires permettant la visualisation globale de l'activité dans les différentes couches de la peau ainsi que sa quantification. La détermination de l'activité en temps réel à l'aide de la caméra iQID permettrait de calculer la dose absorbée par une victime. La caméra iQID est également applicable aux rayonnements  $\gamma$  et  $\beta$ , ce qui permet de détecter d'autres radionucléides. Dans ce contexte, une autre application très utile pourrait être la détermination de l'activité contenue dans les biopsies de plaie chez le travailleur permettant d'estimer l'activité initiale déposée.

La décontamination cutanée de ces différentes formes s'est avérée efficace avec la majorité des produits choisis suite aux discussions avec les services de santé au travail dans l'industrie nucléaire (CEA, AREVA). Cependant, même après les lavages et l'étape de séchage, il reste

une contamination résiduelle fixée à la peau, en particulier au niveau du *stratum corneum*, qui pourrait jouer un rôle de réservoir et libérer la contamination dans l'épiderme et le derme (Rougier et al., 1983, Hafeez et al., 2016). Une des explications possibles serait que ces actinides sont hydrolysés au contact de la peau (pH 4,5 à 5,5) pour former des complexes hydroxo, ce qui peut conduire à la formation d'un réseau colloïdal presque inerte qui ne peut être délogé (Morss et al., 2006). En effet, il semble que la décontamination soit efficace au premier lavage qui retire la fraction soluble et que les deux derniers lavages le soient moins en raison de cette fraction insoluble.

Le comportement de cette fraction fixée a été rarement étudié mais l'hypothèse qu'elle pourrait encore diffuser dans des couches de peau plus profondes et être libéré dans le sang est concevable (Hoath et al., 2003). En effet, le *stratum corneum* est décrit comme un réservoir après la pénétration de substance soluble dans le ciment lipidique intercellulaire (Hafeez et al., 2016). La substance pénétrée peut ensuite se propager lentement vers les couches inférieures du *stratum corneum* et dans l'épiderme. Ainsi, un élément qui reste fixe pendant cette période de temps peut augmenter le risque d'une dose cutanée locale due à l'énergie alpha. Cette fraction résiduelle fixée après la décontamination a été montrée dans d'autres études avec d'autres actinides tels que l'uranium ou le plutonium (Tymen et al., 2000; Griffiths et al., 2012). Cette fraction est potentiellement retirable par excoiation ou exérèse du tissu. Cependant, ces manœuvres risqueraient de mener à une potentielle augmentation de la pénétration par les lésions cutanées ou une perte du fonctionnement musculaire durant l'intervention. De plus, la décontamination n'est pas efficace au-delà des premières couches de l'épiderme. Il n'existe donc pas de moyen de retirer la contamination retenue au niveau des couches plus profondes (environ 4% de l'activité initiale).

Le DTPA est un traitement efficace mais l'utilisation d'eau savonneuse reste la meilleure alternative, car la plus accessible. Il peut cependant rester un problème en cas de pénurie ou de contamination de l'eau. A titre d'exemple, à Fukushima, des travailleurs ont été immergés dans une eau contaminée résultant en une forte contamination et exposition au niveau des jambes. De plus, le savon ne doit pas être laissé en imprégnation sur la peau car les surfactants augmenteraient la pénétration cutanée par solubilisation des lipides (Grives et al., 2015). Les décontaminants présentent chacun des avantages et des inconvénients dont le choix dépend donc des différents facteurs environnementaux dans une situation de contamination parfois évolutive.

La problématique de la dose cutanée n'a pas été abordée dans ces travaux du fait qu'il n'existe pas de modèle recommandé de calcul de dose pour la peau saine. Il existe cependant une méthode développée par Chaptinel (Chaptinel et al., 1988), qui n'est cependant pas applicable à nos conditions. En effet, ce modèle utilise le calcul suivant :

$$H_{\text{peau}} : A_s * H_{s/v \text{ peau}}$$

$A_s$  : Activité surfacique ( $\text{Bq}/\text{cm}^2$ )

$H_{s/v \text{ peau}}$  : Débit d'équivalent de dose ( $\text{mSv}/\text{h}/\text{kBq}$ )

Cependant, il est applicable uniquement en cas de **contamination surfacique** ou en cas de contamination **homogène en profondeur**. Du fait que nos cas de contaminations présentent les deux scénarios et une répartition hétérogène, il n'a donc pas été possible d'appliquer cette méthode de calcul à nos résultats.

### 3. Perspectives :

Les mécanismes impliqués dans la pénétration de ces actinides restent peu connus. Leur cinétique de pénétration est un phénomène difficile à étudier du fait que la peau représente une barrière efficace et du fait des problèmes de mesures d'activité dans les compartiments receveur (faible activité/limite de détection). Il n'est pas déterminé si ces contaminants utilisent la voie intracellulaire, la voie intercellulaire ou la voie des annexes, ou encore si l'une d'elles est exclusive ou si les trois sont empruntées. Il est peu probable qu'ils traversent directement les cellules donc les voies intercellulaires et la voie des annexes restent privilégiées. Ces annexes cutanées peuvent représenter jusqu'à 13 % de la surface cutanée dans certaines régions (visage, front). Il serait donc intéressant d'isoler les follicules pileux de tissus contaminés par dissection (Gledhill et al., 2013) et de réaliser une autoradiographie comme l'iQID afin d'observer si le contaminant est retrouvé dans le système pileux et s'il constitue un potentiel réservoir pour une libération à long terme.

Afin d'étudier cet effet réservoir particulièrement observé dans le cas du Pu-TBP, il serait intéressant d'étudier la cinétique de pénétration au-delà de 24H, en utilisant un modèle *in vivo* comme le rat. En effet, ce modèle permettrait d'étudier la potentielle libération du réservoir cutané, l'aspect inflammatoire du fait des dommages aux solvants ainsi que de calculer la dose cutanée utilisant le modèle CIPR adapté.

Un autre moyen de déterminer la voie de pénétration des actinides serait d'utiliser un modèle *in vitro* de peau reconstituée appelé RHE (Reconstructed Human Epidermis) (Zghoul et al., 2001; Netzlaff et al., 2007; Hu et al., 2009). Il permettrait d'identifier si le contaminant est retrouvé au niveau intracellulaire et/ou s'il circule entre les cellules et est donc retrouvé dans le milieu. Ce modèle est très simplifié et il exclut de nombreux phénomènes de transports ou renouvellement ainsi que de nombreuses molécules présentes *in vivo*. Ce modèle semble être le moins pertinent du fait qu'il ne présente pas de fonction barrière. En revanche, il serait intéressant pour des analyses moléculaires notamment pour l'identification des voies de pénétration des contaminants radiologiques.

Une autre approche serait l'analyse et l'extraction des composants du *stratum corneum ex vivo* ou par le système PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) (Sinkó et al., 2012). En effet, il serait intéressant de connaître quel sont les éléments de la fraction lipidique et/ou de la fraction protéique qui lient les actinides. Il existe différents procédés d'extraction et de séparation des lipides comme le procédé d'extraction de Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959; Lavrijsen et al., 1994) couplé à une méthode de séparation par chromatographie par couche mince (HPTLC). Le principe serait le même pour la fraction protéique avec une séparation des différentes fractions par leur taille. Ce type d'extraction et de dosage a déjà été réalisé à partir de *stratum corneum* humain par la méthode de « tape-stripping » (Clausen et al., 2016). Ces analyses nécessitent une quantité importante de *stratum corneum*. L'identification de ces lipides ou protéines présentant potentiellement un fort pouvoir de fixation des actinides, mènerait à l'élaboration de nouveaux décontaminants et/ou décorporants ne présentant potentiellement pas de toxicité *in vivo*.

Etant donné que le *stratum corneum* régule la pénétration et la fixation des substances, il serait intéressant d'utiliser un modèle d'explant totalement excorié (sans *stratum corneum*), par la méthode de « tape-stripping » ou de la glue, afin d'observer si cette pénétration cutanée est d'autant plus augmentée dans l'épiderme et le derme et si l'entrée du contaminant dans le compartiment receveur est facilitée.

La nouvelle formulation du DTPA en hydrogel n'a montré aucune altération dans sa capacité à décontaminer, et présente différents avantages comme la facilité d'application, de retrait et ne demande pas nécessairement un rinçage immédiat si l'eau n'est pas accessible. Il serait également intéressant de formuler un autre type de gel appelé « peel-off », souvent utilisé en cosmétique dans le but de retirer les peaux mortes du visage (premières couche du *stratum*

*corneum*) (O'Reilly Beringhs et al., 2013; Velasco et al. 2014). Cette formulation présenterait des avantages tels qu'une gestion facilitée des déchets solides de faibles résidus plus faciles et moins coûteux comparés aux déchets liquides. De plus, elle présenterait non seulement le pouvoir chélatant du DTPA, mais également le potentiel de retirer délicatement une partie du *stratum corneum* en altérant le moins possible la peau, évitant une pénétration de la contamination dans les couches plus profondes. Cette application serait utile notamment en cas de contamination fixée, par des éléments insolubles comme les oxydes. Un type de gel similaire qui solidifie au contact de matériau, développé par une équipe du CEA, a été employé dans la décontamination des surfaces (Sarrade, 2008). Ce gel, commercialisé sous le nom d'Aspigel 100, a montré une efficacité sur plusieurs radioéléments dont le strontium ou le baryum mais son application chez l'homme n'est pas envisageable du fait de son fort pouvoir corrosif et potentiellement toxique. Cependant, il serait intéressant de développer une formulation galénique pour une application similaire sans danger pour l'homme.

S'il n'y a pas de possibilité de se décontaminer avec du DPTA sur le site, la solution de l'eau savonneuse reste une excellente alternative d'après les résultats de notre protocole de décontamination. En réalité, il n'existe pas de réel protocole de décontamination et donc l'efficacité peut varier en fonction de l'opérateur manipulant la victime. De plus, il reste toujours le problème de la non-accessibilité à l'eau ou encore la contamination de l'eau, empêchant ou retardant la décontamination.

Il existe d'autres radioéléments, comme le neptunium ou le strontium, pour lesquels il n'existe pas de décontaminant ou de décorporant efficace et dont certains isotopes sont fortement radiotoxiques (émetteur  $\beta$  ou  $\gamma$ ). De plus, le travailleur est exposé à un grand nombre et une grande variété de radioéléments sous différentes formes chimiques. Cela représente un réel problème pour l'industrie lors d'un incident car les contaminants sont souvent dans des solutions mélangeant solvant, acide et différents éléments. Dans nos travaux, l'efficacité des traitements a été démontrée sur des solutions « modèles » dont la forme est assez simple et connue. L'étude d'une solution « inconnue » issue de l'industrie serait donc pertinente afin de voir si l'efficacité des traitements usuels reste la même en cas de solutions plus complexes.

**Références bibliographiques:**

Abrams K., Harvell J.D., Shriner D., Wertz P., Maibach H., Maibach H.I., Rehfeld SJ. Effect of organic solvents on in vitro human skin water barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 1993; 101(4):609-613

Allenby A.C., Fletcher J., Schock C., Tees T.F.S. The effect of heat, pH and organic solvents on the electrical impedance and permeability of excised human skin. *Br. J. Dermatol.* 1969; 81(4):31-39.

Babu R.J., Chatterjee A., Ahaghotu E., Singh M. Percutaneous absorption and skin irritation upon low-level prolonged dermal exposure to nonane, dodecane and tetradecane in hairless rats. *Toxicol. Ind. Health.* 2004; 20(6-10):109-118.

Bianco C., Adami G., Crosera M., Larese F., Casarin S., Castagnoli C., Stella M., Maina G. Silver percutaneous absorption after exposure to silver nanoparticles: a comparison study of three human skin graft samples used for clinical applications. *Burns.* 2014; 40:1390-1396.

Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959 Aug;37(8):911-7.

Chaptinel Y., Durand F., Piechowski J., Menoux B. (1988) Dosimetric et thérapeutique des contaminations cutanées : Rapport CEA-R5441, 1988, service de documentation et d'édition multimédia. CE Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

Clausen M.L., Slotved H.C., Krogfelt K.A., Agner T. Tape Stripping Technique for Stratum Corneum Protein Analysis. *Sci Rep.* 2016 28;6:19918.

Gledhill K., Gardner A., Jahoda C.A. Isolation and establishment of hair follicle dermal papilla cell cultures. *Methods Mol. Biol.* 2013; 989:285-292.

Griffiths N.M., Wilk J.C., Abram M.C., Renault D., Chau Q., Helfer N., Guichet C., Van der Meeren A. Internal contamination by actinides after wounding: a robust rodent model for assessment of local and distant actinide retention. *Health Phys.* 2012; 103(2):187-194.

Grives S., Phan G., Morat G., Suhard D., Rebiere F., Fattal E. Ex vivo uranium decontamination efficiency on wounded skin and in vitro skin toxicity of a calixarene-loaded nanoemulsion. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104(6):2008-2017

Hafeez F., Chiang A., Hui X., Zhu H., Kamili F., Maibach H.I. Stratum corneum reservoir as a predictive method for in vitro percutaneous absorption. *J. Appl. Toxicol.* 2016; 36(8):1003-1010.

Hoath S.B., Leahy D.G. The organization of human epidermis: functional epidermal units and phi proportionality. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(6):1440-1446.

Hu T., Bailey R.E., Morrall S.W., Aardema M.J., Stanley L.A., Skare J.A. Dermal penetration and metabolism of p-aminophenol and p-phenylenediamine : application of the EpiDerm human reconstructed epidermis model. *Toxicol. Lett.* 2009; 188(2):119-129.

ICRP, 1986. The Metabolism of Plutonium and Related Elements. ICRP Publication 48. Ann. ICRP 16 (2-3).

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 Res. Technol.* 2007; 13:19-24.

Lavrijsen A.P., Higounenc I.M., Weerheim A., Oestmann E., Tuinenburg E.E., Boddé H.E., Ponc M. Validation of an in vivo extraction method for human stratum corneum ceramides. *Arch Dermatol Res.* 1994;286(8):495-503.

Morss L.R., Edelstein N.M., Fuger J. The Chemistry of the Actinide and Transactinide Elements.third edition, published by Springer, The Netherlands. 2006.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=31357, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31357/> (consulté le 10/01/17).

Netzlaff F., Kaca M., Bock U., Haltner-Ukomadu E., Meiers P., Lehr C.M., Schaefer U.F. Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2007; 66(1):127-134.

OCDE, Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Absorption cutanée: méthode in vitro. 428 (2004) OECD, Paris.

O'Reilly Beringhs A., Rosa J.M., Stulzer H.K., Budal R.M., Sonaglio D. Green clay and aloe vera peel-off facial masks: response surface methodology applied to the formulation design. *AAPS PharmSciTech.* 2013 Mar;14(1):445-455.

Poncy JL, Rateau G, Burgada R, Bailly T, Leroux Y, Raymond KN, Durbin PW, Masse R. Efficacy of 3,4,3-LIHOPO for reducing the retention of <sup>238</sup>Pu in rat after inhalation of the tributylphosphate complex. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993; 64(4):431-436.

Rougier A., Dupuis D., Lotte C., Roguet R., Schaefer H. In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. *J. Invest. Dermatol.* 1983; 81(3):275-278.

Sahle FF, Gerecke C, Kleuser B, Bodmeier R. Formulation and comparative in vitro evaluation of various dexamethasone-loaded pH-sensitive polymeric nanoparticles intended for dermal applications. *Int. J. Pharm.* 2016; 516(1-2): 21-31.

Sapra B., Jain S., Tiwary A.K. Percutaneous permeation enhancement by terpenes: mechanistic view. *AAPS J.* 2008; 10(1):120-132.

Sarrade S. Les procédés de décontamination et de traitements des effluents et déchets technologiques. Pour des déchets et effluents plus propres. 2008. Médiathèque CEA. [www.cea.fr/documents/monographies/conditionnement-déchets-nucléaires-décontamination-traitement.pdf/](http://www.cea.fr/documents/monographies/conditionnement-déchets-nucléaires-décontamination-traitement.pdf/). Consulté le 21/12/16

Sinkó B., Garrigues T.M., Balogh G.T., Nagy Z.K., Tsinman O., Avdeef A., Takács-Novák K. Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012; 45(5):698-707.

Stevens W., Bruenger F.W., Atherton D.R., Buster D.S., Howerton G. The retention and distribution of <sup>241</sup>Am and <sup>65</sup>Zn, given as DTPA chelates in rats and of [<sup>14</sup>C]DTPA in rats and beagles. *Radiat Res.* 1978; 75(2):397-409.

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.* 2000; 76(10):1417-1424.

Velasco M.V., Vieira R.P., Fernandes A.R., Dario M.F., Pinto C.A., Pedriali C.A., Kaneko T.M., Baby A.R. Short-term clinical of peel-off facial mask moisturizers. *Int J Cosmet Sci.* 2014 Aug;36(4):355-360.

Vitorges P. Chimie des actinides. *Techniques de l'Ingénieur*; 1999. <http://www.techniques-ingenieur.fr/res/pdf/encyclopedia/42457210-bn3520for.pdf/> Consulté le 14/12/16.

Zghoul N., Fuchs R., Lehr C.M., Schaefer U.F. Reconstructed skin equivalents for assessing percutaneous drug absorption from pharmaceutical formulations. ALTEX 2001; 18(2)103-106.

## Conclusions :

L'ensemble des résultats obtenus s'avère particulièrement utile pour la prise en charge d'une contamination cutanée par les actinides. En termes de radioprotection, la décontamination cutanée s'avère sensiblement efficace en cas de peau non lésée. Ce projet de thèse utilisant des techniques abordables a permis de donner des réponses sur la prise en charge des contaminations cutanées par l'américium et le plutonium sous forme soluble aqueuse et organique. Les expérimentations *in vitro* (bovine) et *ex vivo* sur l'oreille de porc viable ont donc fait l'objet de plusieurs constats :

- L'utilisation d'une technique *in vitro* utilisant de la poudre de couche cornée représente une première approche intéressante permettant à la fois l'établissement de profil de fixation ainsi qu'un screening rapide de produits pour la décontamination.
- L'utilisation de peau viable a montré une différence dans les profils de fixation et de pénétration dans le compartiment receveur de ces éléments.
- L'américium et le plutonium présentent différents profils de fixation et de pénétration dans la peau de porc, avec une fixation plus importante du plutonium et un passage dans le compartiment receveur plus important pour l'américium.
- La validation d'une technique de mesure d'activité et d'imagerie complémentaire a permis la quantification la mise en évidence d'une distribution similaire de ces actinides dans la peau.
- L'action de l'eau permet d'éliminer la contamination de la peau mais beaucoup moins que le savon et le DTPA qui restent les traitements les plus efficaces pour les différentes formes.
- Le complexe Pu-TBP présente un comportement spécifique par la modification de la structure de la peau, permettant une augmentation de la pénétration du plutonium à travers ce complexe, rendant le retrait de la contamination en profondeur une problématique à étudier spécifiquement (effet réservoir et irradiation).
- La formulation du DTPA en hydrogel est prometteuse et permettrait de faciliter les procédures de décontamination pour les services médicaux en cas de contamination du travailleur et sur le terrain en cas d'accident de grande ampleur.

## Communications

### Publication:

**Tazart A.**, Bolzinger M.A., Moureau A., Molina T., Coudert S., Angulo J.F., Briancon S., Griffiths N.M. Penetration and decontamination of americium-241 ex vivo using fresh and frozen pig skin. *Chem. Biol. Interact.* 2016; pii: S0009-2797(16)30197-1.

**Tazart A.**, Bolzinger M.A., Coudert S., Lamart S., Miller B.W., Angulo J.F., Briançon S., Griffiths N.M. Skin absorption of actinides: influence of solvents or chelates on skin penetration ex vivo. *Int J Radiat Biol Mar* 3:1-10. doi: 10.1080/09553002.2017.1293865. [Epub ahead of print]

### Communications orales :

**Tazart A.** Projet de thèse sur la décontamination radiologique cutanée. Doctoriales de l'école polytechnique. 29/09/2014 au 04/10/2014.

**Tazart A.**, Griffiths N.M., Briancon S., Bolzinger M.A. Radiological skin decontamination: efficacy and mechanisms of decontaminant products. Meeting des doctorants de la DSV (Porquerolles) 19-21/10/14

**Tazart A.**, Griffiths N.M., Briancon S., Bolzinger M.A. Décontamination radiologique cutanée: étude de pénétration et efficacité des produits décontaminants. Journée des doctorants CEA-DGA. 09/04/15

**Tazart A.**, Griffiths N.M., Briancon S., Bolzinger M.A. Décontamination radiologique cutanée: pénétration de radioéléments et efficacité des produits de décontamination Journée doctorant CEA-DGA.14/04/16

**Tazart A.**, Griffiths N.M., Briancon S., Bolzinger M.A. Décontamination radiologique cutanée : efficacité et mécanismes des produits décontaminants. Journée des Jeunes chercheurs du LAGEP. 01/06/2016

**Tazart A.**, Griffiths N.M. Contamination de la peau par les actinides : que faire ? Journée des doctorants de la DAM. 08/06/16

**Tazart A.** Décontamination radiologique cutanée: efficacité des gels décontaminants  
Présentation à la Pharmacie Centrale des Armées. 30/08/16

**Tazart A.,** Griffiths N.M. Penetration and decontamination of americium-241 ex vivo using  
fresh pig skin Journée de l'IRCM. 30/09/16

### **Posters :**

**Tazart A.,** Griffiths N.M., Briancon S., Bolzinger M.A. Produit de décontamination  
radiologique cutanée : efficacité et mécanismes d'action. Journée de l'école doctorale.  
08/10/14

**Tazart A.,** Griffiths N.M., Briancon S., Bolzinger M.A. Radiological skin decontamination  
penetration of radioelements and efficacy of decontamination products. 2<sup>ème</sup> Congrès de  
Radiobiologie au Val de Grâce organisé par l'IRBA. 13-14/10/14

**Tazart A.,** Griffiths N.M., Bolzinger M.A, Briancon S. Radiological skin decontamination:  
penetration of radioelements and efficacy of decontamination products. Congrès CBRN  
Research & Innovation, Antibes - Juan-les-Pins, France 16-18/03/15

**Tazart A.,** Griffiths N.M., Bolzinger M.A, Briancon S. Actinide-contaminated skin: efficacy  
of water, soaps, gels and DTPA. 3<sup>ème</sup> Congrès de Radiobiologie au Val de Grâce organisé par  
l'IRBA. 2-3/11/16



## Résumé:

Les actinides sont des radioéléments émetteurs- $\alpha$  couramment manipulés par les travailleurs de l'industrie nucléaire et font partie de la menace NRBC (nucléaire, radiologique, biologique, chimique). La contamination cutanée représente une voie d'exposition majeure de ces agents radiologiques. La décontamination de la peau est donc cruciale pour empêcher une dispersion de la contamination et l'absorption systémique du contaminant par la peau. Ce travail s'est attaché à évaluer les profils de pénétration cutanée de deux actinides : l'américium et le plutonium, sous différentes formes, dans un modèle d'étude *ex vivo*, la peau d'oreille de porc. L'efficacité de décontamination de différents produits usuels a également été testée sur ce modèle, mais aussi sur un modèle *in vitro* de poudre de couche cornée bovine. Pour compléter l'étude de la décontamination, l'efficacité d'une formulation d'hydrogel de DTPA a également été testée. La détermination de la distribution de la contamination dans la peau a été réalisée à l'aide de différentes techniques d'imagerie : l'autoradiographie par émulsion, le TASTRAK ou encore l'iQID camera. Les résultats ont montré une grande différence dans les profils de pénétration et de rétention des actinides lorsqu'ils sont en solution aqueuse modérément soluble ou en solution organique dans un mélange de solvant. De plus, cette dernière forme modifie fortement la structure cutanée, menant à une forte augmentation de la pénétration cutanée. Les résultats des protocoles de décontamination montrent une efficacité égale du savon (Trait rouge®) comparé au DTPA, qui est le traitement décorporant utilisé également en décontamination. La formulation en hydrogel présente une efficacité supérieure pour le traitement de solutions organiques et met en évidence l'intérêt de développer d'autres formulations galéniques.

## Abstract

Actinides are alpha-emitting radioactive elements handled by nuclear industry workers and are part of the NRBC threat (nuclear, radiological, biological, and chemical). Skin contamination represents a major exposure route for these radioelements. Skin decontamination is therefore essential to prevent any dispersion of contamination and systemic absorption through the skin. This work focused the evaluation of skin penetration behavior of two actinides: americium and plutonium, in different forms, in an *ex vivo* model, pig ear skin. The decontamination efficacy of various products was tested on this model as well as an *in vitro* model of bovine hide powder. The efficacy of a new DTPA hydrogel formulation was also tested. The localization of actinides in different skin layers was carried out using various imaging techniques: emulsion autoradiography, solid track autoradiography, TASTRAK or iQID camera. Data showed differences in penetration, retention and localization profiles of the different actinides used in moderately soluble aqueous solution or in a solvent mixture. In addition, the latter modifies skin structure that is associated with an increase in skin penetration. Radioactivity activity measurements in skin layers agreed well with distribution as shown by the different autoradiography techniques. The results of decontamination protocols showed an equal efficacy of the cleansing gel (Trait rouge®) as compared to DTPA, that is used for decorporation therapy and also for decontamination. The hydrogel formulation showed a superior efficacy for the treatment of organic solutions and demonstrates the interest for development of other pharmaceutical formulations.