



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

UNIVERSITÉ D'EUROPE

**UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES**

Institut de Pharmacie

**Laboratoire de Pharmacie Galénique et de**

**Biopharmacie**

**Professeur Karim AMIGHI**

**DEVELOPPEMENT ET EVALUATION DE  
FORMULATIONS DE PRODUITS  
SOLAIRES CONDITIONNES SOUS FORME  
D'AEROSOL**

**Laurence Durand**

Pharmacien

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences  
Biomédicales et Pharmaceutiques

Bruxelles, Mai 2010

Je tiens à remercier en premier lieu Mr. le Professeur Karim Amighi de m'avoir accueillie au sein du service de Pharmacie Galénique et Biopharmacie. Ses nombreux conseils, son écoute, sa disponibilité, ses connaissances scientifiques ainsi que les moyens mis en œuvre pour la réalisation de ce travail m'ont permis de mener à bien ce projet. Je lui témoigne ici toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier très sincèrement Mme Viviane Henschel, chargée de cours à l'institut de Pharmacie, pour son suivi régulier et très soutenu de l'avancement de mes travaux tout au long de ces années. Sa patience, ses qualités scientifiques et son intérêt pour la cosmétologie m'ont été d'une aide très précieuse pour l'élaboration de ce travail.

J'adresse ma profonde gratitude à Mme Nicole Habran pour son dévouement, ses précieux conseils et son inébranlable soutien. Sa grande expérience dans le domaine de la cosmétologie, son écoute, ainsi que son plaisir à partager ses connaissances m'ont aidé à surmonter les difficultés que j'ai pu rencontrer. Je tiens également à la remercier ici de m'avoir communiqué l'envie de continuer dans le domaine de la cosmétologie à la fin de mes études de pharmacie.

Je remercie vivement Gilles Wallaert et Mimouna El Mkhtrioui pour leur précieux support technique au sein du laboratoire de Chimie Industrielle de l'ULB, ainsi que leur grande disponibilité.

Je tiens aussi à remercier Virginie Caprasse, de la société Dow Corning, pour son aide technique ainsi que son soutien et ses encouragements.

Mes remerciements s'adressent aussi à Céline Denis, de la société Lambiotte et Cie., pour ses conseils et la mise en aérosol de mes différents produits.

Je remercie Rosana Chirico pour son support technique au sein de la société UCB lors du prêt du simulateur solaire. Sa disponibilité et sa gentillesse m'ont été précieuses.

Tous mes remerciements s'adressent également à l'ensemble de mes collègues du service de Pharmacie Galénique et Biopharmacie.

Je tiens plus particulièrement à remercier Nancy Van Aelst, pour son aide lors de l'étude *in vivo*, pour son soutien inconditionnel ainsi que pour les bons moments que nous avons partagés pendant ces quatre années.

Ce travail m'a également permis de rencontrer Flore Depreter, Gabrielle Pilcer et Jonathan Goole. Leur soutien, leurs encouragements, leur patience ainsi que leur amitié m'ont permis d'avancer et d'aller au bout du projet.

Je tiens à remercier également tous les membres du personnel de l'Institut de Pharmacie qui, de près ou de loin ont contribué à la bonne réalisation de ce projet.

Plus personnellement, je tiens à remercier mes amis et ma famille qui me soutiennent et qui m'entourent depuis de nombreuses années. Sans eux, je ne serais certainement pas là où j'en suis.

# **TABLE DES MATIERES**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABREVIATIONS .....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>I. Résumé .....</b>   | <b>10</b> |
| <b>II. Introduction .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>II.1 Rappel de l'anatomie et de la physiologie de la peau .....</b> | <b>14</b> |
| II.1.1 L'épiderme .....  | 15        |
| II.1.2 Le derme.....   | 16        |
| II.1.3 L'hypoderme.....  | 17        |
| II.1.4 Les annexes cutanées .....                                      | 17        |
| II.1.5 La mélanine et la mélanogénèse .....                            | 18        |
| II.1.6 Les différents phototypes .....                                 | 20        |
| <b>II.2 Le soleil et la peau .....</b>                                 | <b>21</b> |
| II.2.1 Le rayonnement ultraviolet .....                                | 22        |
| II.2.1.1 Les UVA.....  | 24        |
| II.2.1.2 Les UVB.....  | 25        |
| II.2.1.3 Les UVC.....  | 26        |
| II.2.2 Actions bénéfiques des rayons UV.....                           | 26        |
| II.2.3 Actions néfastes des rayons UV .....                            | 27        |
| II.2.3.1 Les cancers cutanés .....                                     | 27        |
| II.2.3.1.1 Les cancers cutanés non-mélanomes (CCNM) .....              | 28        |
| II.2.3.1.2 Les mélanomes malins cutanés (MMC) .....                    | 29        |
| II.2.3.1.3 La prévention des cancers cutanés.....                      | 30        |
| II.2.3.2 : Autres pathologies liées aux rayons UV.....                 | 31        |
| <b>II.3 Les produits cosmétiques et les protections solaires.....</b>  | <b>31</b> |
| II.3.1 Définition des produits cosmétiques .....                       | 31        |
| II.3.2 Les produits cosmétiques présents sur le marché européen.....   | 32        |
| II.3.3 Le marché des produits solaires .....                           | 33        |
| II.3.4 Définition des produits solaires .....                          | 34        |

|   |           |
|---|-----------|
| II.3.4.1 Protection contre les UV et intérêt des produits de protection solaire ... | <b>34</b> |
| II.3.4.2 Législation des filtres solaires .....                                     | <b>37</b> |
| II.3.4.3 Chimie et mode d'action des filtres solaires .....                         | <b>40</b> |
| II.3.4.3.1 Filtres organiques.....  | <b>41</b> |
| II.3.4.3.2 Filtres inorganiques .....   | <b>44</b> |
| II.3.5 Les indices de protection anti UV .....                                      | <b>46</b> |
| II.3.5.1 Anti UVB : Le facteur de protection solaire (FPS) .....                    | <b>46</b> |
| II.3.5.2 Anti UVA .....   | <b>47</b> |
| <b>II.4 Les aérosols .....</b>  | <b>49</b> |
| II.4.1 Définition et marché des aérosols .....                                      | <b>49</b> |
| II.4.2 Les différents composants .....  | <b>50</b> |
| II.4.2.1 Le boîtier .....   | <b>51</b> |
| II.4.2.2 Les valves .....   | <b>52</b> |
| II.4.2.3 Les diffuseurs .....   | <b>52</b> |
| II.4.2.4 Les gaz propulseurs .....  | <b>53</b> |
| II.4.2.4.1 Les différents gaz utilisés .....  | <b>53</b> |
| II.4.2.4.2 Rappel des lois physiques .....  | <b>54</b> |
| II.4.2.4.2.1 Théorie de cinétique des gaz .....                                     | <b>54</b> |
| II.4.2.4.2.2 Gaz comprimés : Loi des gaz parfaits .....                             | <b>55</b> |
| II.4.2.4.2.3 Gaz liquéfiés : Loi de Raoult.....                                     | <b>56</b> |
| II.4.2.4.2.4 Solubilité des gaz .....   | <b>56</b> |
| II.4.2.5 Les différents systèmes d'aérosol : .....                                  | <b>57</b> |
| II.4.2.5.1 Les gaz comprimés.....   | <b>58</b> |
| II.4.2.5.2 Les gaz liquéfiés.....   | <b>59</b> |
| II.4.2.5.3 Les systèmes de séparation entre propulseur et produit .....             | <b>60</b> |
| II.4.3 Remplissage des aérosols .....   | <b>61</b> |
| II.4.4 Les tests à effectuer .....  | <b>63</b> |
| <b>III. But du travail.....</b>   | <b>65</b> |
| <b>IV. Matériel et méthodes .....</b>   | <b>68</b> |
| <b>IV.1 Matériel .....</b>  | <b>68</b> |

|   |            |
|---|------------|
| IV.1.1 Choix des matières premières pour l'émulsion E/H.....  | <b>68</b>  |
| IV.1.2 Choix des matières premières pour l'émulsion E/Si .....                                      | <b>80</b>  |
| IV.1.3 Réactifs .....   | <b>85</b>  |
| IV.1.4 Lipides et tensio-actifs utilisés pour la formulation des nanoparticules .....               | <b>85</b>  |
| <b>IV.2 Méthodes .....</b>  | <b>85</b>  |
| IV.2.1 Formulation des émulsions.....   | <b>85</b>  |
| IV.2.1.1 Le mélangeur « Silverson » .....   | <b>85</b>  |
| IV.2.1.2 L'agitateur à hélice .....   | <b>86</b>  |
| IV.2.1.3 Le viscosimètre (modèle RV-DV-II+).....  | <b>87</b>  |
| IV.2.1.4 L'étuve à cycle.....   | <b>89</b>  |
| IV.2.1.5 Estimation du FPS : le simulateur du groupe CIBA .....                                     | <b>89</b>  |
| IV.2.2 Diffraction laser : caractérisation de la taille des gouttelettes et des nanoparticules..... | <b>90</b>  |
| IV.2.2.1 Le Spraytec® .....   | <b>91</b>  |
| IV.2.2.2 Le Mastersizer 2000® .....   | <b>92</b>  |
| IV.2.3 Etudes <i>in vitro</i> et méthode d'évaluation <i>in vivo</i> de la pénétration cutanée.     | <b>93</b>  |
| IV.2.3.1 Cellule de Franz .....   | <b>93</b>  |
| IV.2.3.2 Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....                                      | <b>94</b>  |
| IV.2.3.2.1 Dosage des cinq filtres organiques simultanément.....                                    | <b>94</b>  |
| IV.2.3.2.2 Dosage de l'EMC seul (Ethylhexyl Methoxycinnamate) .....                                 | <b>96</b>  |
| IV.2.3.3 ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy)                         | <b>96</b>  |
| IV.2.3.4 Strippings.....  | <b>98</b>  |
| IV.2.4 Evaluation des mélanges lipidiques ; formulation et évaluation de l'EMC encapsulé .....      | <b>98</b>  |
| IV.2.4.1 Calorimètre à balayage différentiel (Differential Scanning Calorimeter=DSC) .....          | <b>98</b>  |
| IV.2.4.2 Hot Stage Microscopy (HSM) .....   | <b>100</b> |
| IV.2.4.3 Homogénéisateur haute vitesse .....  | <b>100</b> |
| IV.2.4.4 Homogénéisateur Haute Pression (HHP) .....   | <b>101</b> |
| IV.2.4.5 Le simulateur de lumière (Suntest CPS +) .....   | <b>102</b> |
| IV.2.4.6 Mesure du potentiel zêta .....   | <b>103</b> |

**V. Partie expérimentale ..... 106**

**V.1 Formulation des émulsions solaires et influence de différents paramètres sur les formes aérosol ..... 106**

|   |            |
|---|------------|
| V.1.1 Formulation des produits solaires .....   | <b>107</b> |
| V.1.1.1 Emulsion E/H.....   | <b>107</b> |
| V.1.1.1.1 Choix des matières premières.....   | <b>107</b> |
| V.1.1.1.2 Formulation sans protecteur solaire .....   | <b>107</b> |
| V.1.1.1.3 Formulations avec protecteurs solaires.....   | <b>111</b> |
| V.1.1.1.4 Formulation avec protecteurs solaires et ingrédients actifs .....   | <b>112</b> |
| V.1.1.2 Emulsion E/Si .....   | <b>115</b> |
| V.1.1.2.1 Choix des matières premières.....   | <b>115</b> |
| V.1.1.2.2 Formulation sans protecteur solaire .....   | <b>115</b> |
| V.1.1.2.3 Formulation avec protecteurs solaires .....   | <b>117</b> |
| V.1.1.2.4 Formulation avec protecteurs solaires et ingrédients actifs .....   | <b>117</b> |
| V.1.2 Mise en aérosol .....   | <b>120</b> |
| V.1.2.1 Appareillage et méthode de fabrication .....  | <b>120</b> |
| V.1.2.2 Choix du gaz et du conditionnement .....  | <b>121</b> |
| V.1.3 Etude de l'influence de différents paramètres sur la taille et la distribution de la taille des gouttelettes..... | <b>124</b> |
| V.1.3.1 Introduction .....  | <b>124</b> |
| V.1.3.2 Matériel et méthode.....  | <b>125</b> |
| V.1.3.3 Les différents paramètres étudiés .....   | <b>125</b> |
| V.1.3.3.1 Concentration en gaz.....   | <b>125</b> |
| V.1.3.3.2 Les concentrations en filtres inorganiques (TiO <sub>2</sub> et ZnO) .....                                    | <b>125</b> |
| V.1.3.3.3 Viscosité .....   | <b>126</b> |
| V.1.3.3.4 Valves et diffuseurs .....  | <b>126</b> |
| V.1.3.4 Résultats et discussion .....   | <b>129</b> |
| V.1.3.4.1 Influence de la concentration en gaz .....  | <b>130</b> |
| V.1.3.4.2 Influence de la concentration en filtre inorganique.....  | <b>132</b> |
| V.1.3.4.3 Influence de la viscosité.....  | <b>133</b> |
| V.1.3.4.4 Influence des valves et des diffuseurs.....   | <b>134</b> |

|  |            |
|--|------------|
| V.1.3.5 Conclusion .....   | <b>138</b> |
| <b>V.2 Evaluation <i>in vitro</i> de la pénétration cutanée des formulations solaires</b><br>..... | <b>139</b> |
| V.2.1 Introduction .....   | <b>139</b> |
| V.2.2 Matériel et méthodes .....   | <b>140</b> |
| V.2.2.1 Matériel .....   | <b>140</b> |
| V.2.2.2 Méthodes .....   | <b>140</b> |
| V.2.2.2.1 Etude in vitro .....   | <b>140</b> |
| V.2.2.2.2 Analyse des filtres UV .....   | <b>141</b> |
| V.2.2.2.2.1 Les filtres organiques .....   | <b>143</b> |
| V.2.2.2.2.2 Les filtres inorganiques .....   | <b>144</b> |
| V.2.3 Résultats et discussion .....  | <b>145</b> |
| V.2.3.1 Filtres organiques .....   | <b>145</b> |
| V.2.3.1.1 Validation de la méthode CLHP .....  | <b>145</b> |
| V.2.3.1.2 Evaluation de la pénétration cutanée .....   | <b>149</b> |
| V.2.3.2 Filtres inorganiques .....   | <b>153</b> |
| V.2.3.2.1 Validation de la méthode analytique .....  | <b>153</b> |
| V.2.3.2.2 Evaluation de la pénétration cutanée .....   | <b>155</b> |
| V.2.4 Conclusion .....   | <b>158</b> |
| <b>V.3 Evaluation <i>in vivo</i> de la pénétration cutanée des formulations solaires</b><br>.....  | <b>159</b> |
| V.3.1 Introduction .....   | <b>159</b> |
| V.3.2 Matériel et méthodes .....   | <b>160</b> |
| V.3.2.1 Matériel .....   | <b>160</b> |
| V.3.2.2 Méthodes .....   | <b>160</b> |
| V.3.2.2.1 Etude in vivo .....  | <b>160</b> |
| V.3.2.2.2 Analyse des filtres UV .....   | <b>163</b> |
| V.3.3 Résultats et discussion .....  | <b>165</b> |
| V.3.3.1 Filtres organiques .....   | <b>165</b> |
| V.3.3.1.1 Validation de l'extraction des filtres à partir des différents<br>prélèvements .....     | <b>165</b> |

|  |            |
|--|------------|
| V.3.3.1.2 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée des filtres organiques: émulsion E/H.....    | <b>167</b> |
| V.3.3.1.3 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée des filtres organiques: émulsion E/Si.....   | <b>175</b> |
| V.3.3.1.4 Discussion des résultats de la pénétration cutanée des filtres organiques.....                   | <b>177</b> |
| V.3.3.2 Filtres inorganiques.....  | <b>181</b> |
| V.3.3.2.1 Validation de l'extraction des filtres à partir des différents prélèvements.....                 | <b>181</b> |
| V.3.3.2.2 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée des filtres inorganiques: émulsion E/H ..... | <b>182</b> |
| V.3.3.2.3 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée: émulsion E/Si .....                         | <b>184</b> |
| V.3.3.2.4 Discussion des résultats de la pénétration cutanée des filtres UV inorganiques.....              | <b>187</b> |
| V.3.4 Conclusion .....   | <b>188</b> |
| <b>V.4 Encapsulation de l'Ethylhexyl Methoxycinnamate (EMC) .....</b>                                      | <b>190</b> |
| V.4.1 Introduction .....   | <b>190</b> |
| V.4.2 Matériel et méthodes.....  | <b>192</b> |
| V.4.2.1 Matériel.....  | <b>192</b> |
| V.4.2.2 Méthodes .....   | <b>192</b> |
| V.4.2.2.1 Composition et évaluations préliminaires des mélanges lipidiques                                 | <b>192</b> |
| V.4.2.2.2 Préparation des nanosuspensions .....  | <b>192</b> |
| V.4.2.2.3 Caractérisation et évaluation des NLC .....  | <b>194</b> |
| V.4.3 Résultats et discussion.....   | <b>196</b> |
| V.4.3.1 Composition et évaluations préliminaires des mélanges lipidiques .....                             | <b>196</b> |
| V.4.3.2 Caractérisation et évaluation des NLC.....   | <b>200</b> |
| V.4.3.2.1 Taille et distribution de taille des particules .....  | <b>200</b> |
| V.4.3.2.2 Détermination du potentiel zêta.....   | <b>205</b> |
| V.4.3.2.3 Capacité d'encapsulation de l'EMC .....  | <b>205</b> |
| V.4.3.2.4 Evaluation de la capacité de protection UV des NLC.....  | <b>206</b> |

|   |            |
|---|------------|
| V.4.3.2.5 Evaluation de la capacité de pénétration cutanée de l'EMC à partir des nanosuspensions.....   | <b>209</b> |
| V.4.3.2.6 Capacité de pénétration cutanée de l'EMC à partir des émulsions                               | <b>212</b> |
| V.4.4 Conclusion .....  | <b>218</b> |
| <b>VI. Conclusion générale .....</b>  | <b>221</b> |
| <b>VII. Bibliographie.....</b>  | <b>225</b> |
| <b>VIII. Annexes .....</b>  | <b>254</b> |
| <b>VIII.1 Liste des filtres UV qui peuvent entrer dans la composition des produits cosmétiques.....</b> | <b>254</b> |
| <b>VIII.2 Principaux documents relatifs à l'étude <i>in vitro</i>.....</b>                              | <b>255</b> |
| VIII.2.1 Demande d'avis au Comité d'Ethique .....   | <b>255</b> |
| VIII.2.2 Formulaire de consentement éclairé.....  | <b>261</b> |
| VIII.2.3 Information au patient .....   | <b>262</b> |
| VIII. 2.4 Approbation du comité d'Ethique .....   | <b>263</b> |
| <b>VIII.3 Principaux documents relatifs à l'étude <i>in vivo</i>.....</b>                               | <b>264</b> |
| VIII.3.1 Demande d'avis au Comité d'Ethique .....   | <b>264</b> |
| VIII.3.2 Formulaire de consentement éclairé.....  | <b>270</b> |
| VIII.3.3 Approbation du comité d'éthique .....  | <b>278</b> |

## **ABBREVIATIONS**

|  |  |
|--|--|
| <b>ACN:</b> Acétonitrile   | <b>J.K<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>:</b> Joule par degré Kelvin par mol |
| <b>ASB:</b> Albumine de Sérum de Bovin   | <b>kPa :</b> Kilo Pascal   |
| <b>BEMT:</b> Bis-Ethyloxyphenol Methoxyphenol Triazine                                   | <b>kW :</b> Kilo watt  |
| <b>°C :</b> degré Celsius  | <b>l/min :</b> litre par minute  |
| <b>°C/min :</b> degré Celsius par minute   | <b>Log P<sub>o/w</sub> :</b> Coefficient de partage octanol/eau          |
| <b>CCNM :</b> Cancer Cutané Non-Mélanome   | <b>µg:</b> microgramme   |
| <b>CLHP:</b> Chromatographie Liquide Haute Performance                                   | <b>log P<sub>o/w</sub> :</b> Log du coefficient de partage octanol/eau   |
| <b>COLIPA:</b> The European Cosmetics Association  | <b>mg:</b> milligramme   |
| <b>CAS:</b> Chemical Abstract Service  | <b>mg/l :</b> milligramme par litre                                      |
| <b>CBC:</b> Carcinome Basocellulaire   | <b>MeOH:</b> Méthanol  |
| <b>CN:</b> Cyanopropyl   | <b>MBBT:</b> Methylene Bis Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol         |
| <b>CSC:</b> Carcinome Spinocellulaire  | <b>min:</b> minutes  |
| <b>DAD:</b> Diode Array Detector   | <b>ml:</b> millilitres   |
| <b>DEM :</b> Dose érythémateuse minimale   | <b>MLC :</b> Micro Lipid Carrier   |
| <b>DHHB:</b> Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate                                  | <b>m/m:</b> masse/masse  |
| <b>DSC:</b> Differential Scanning Calorimetry  | <b>mmHg :</b> millimètre de mercure                                      |
| <b>DME:</b> Di Méthyl Ether  | <b>mm<sup>2</sup>/s:</b> millimètre carré par seconde                    |
| <b>ED-PABA:</b> 2-Ethylhexyl Dimethyl para-aminobenzoic acid                             | <b>MMC :</b> Mélanome Malin Cutanée                                      |
| <b>EINECS:</b> European Inventory of Existing Chemical Substances                        | <b>m/s:</b> mètre par seconde  |
| <b>EMC:</b> Ethylhexyl Methoxycinnamate  | <b>mV:</b> millivolt   |
| <b>E/H:</b> Emulsion Eau dans Huile  | <b>NLC:</b> Nano Lipid Carrier   |
| <b>E/Si:</b> Emulsion Eau dans Silicone  | <b>nm:</b> nanometre   |
| <b>eV :</b> électron volt  | <b>O<sub>3</sub>:</b> ozone  |
| <b>FPS:</b> Facteur de Protection Solaire  | <b>OTC:</b> Over The Counter   |
| <b>FPU :</b> Facteur de Protection des Ultraviolets                                      | <b>%:</b> pourcent   |
| <b>FDA:</b> Food and Drug Administration   | <b>Pa:</b> Pascal  |
| <b>h:</b> heure  | <b>PABA :</b> Para Amino Bnezoic Acid                                    |
| <b>HHP:</b> Homogénéisateur Haute Pression   | <b>PBS:</b> Phosphate Buffered Solution                                  |
| <b>Hz:</b> Hertz   | <b>PM:</b> Poids moléculaire   |
| <b>HSM:</b> Hot Stage Microscopy   | <b>ppm:</b> partie par million   |
| <b>ICP-OES:</b> Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy                 | <b>RBW:</b> Rice Bran Wax  |
| <b>INCI EU:</b> International Nomenclature of Cosmetic Ingredients of the European Union | <b>rpm:</b> Rotation Par Minute  |
| <b>JCIA:</b> Japanese Cosmetic Industry Association                                      | <b>RTP:</b> Rapid Transport Product                                      |
| <b>J/g:</b> Joule par gramme   | <b>SC:</b> Stratum Corneum   |
|  | <b>St:</b> Stockes   |
|  | <b>t<sub>0</sub> :</b> temps 0   |
|  | <b>TGA :</b> Therapeutics Goods Administration                           |
|  | <b>THF:</b> Tétrahydrofurane   |
|  | <b>TiO<sub>2</sub>:</b> Dioxyde de Titane                                |
|  | <b>UV:</b> ultraviolet   |
|  | <b>VPH:</b> Vapor Phase Hole   |
|  | <b>ZnO:</b> Oxyde de zinc  |

# **I.RESUME**

# **I. Résumé**

---

---

L'exposition au soleil, et donc aux rayons ultraviolets, est de plus en plus fréquente chez l'homme dans les pays occidentaux. En effet, les modes de vie ont fortement changé ces dernières années, avec pour résultat une augmentation non négligeable des loisirs en extérieur. Ceci a pour conséquence une augmentation de l'apparition des cancers cutanés, dont le pronostic de survie est souvent mauvais et l'issue fatale. De plus, les traitements associés à ces maladies sont lourds et n'agissent pas toujours de façon efficace. Les campagnes d'information et de prévention face aux dangers du soleil restent donc les principales mesures efficaces pour lutter contre le cancer cutané lié à une surexposition au soleil. La recherche de nouveaux produits permettant de protéger de manière efficace la peau des effets néfastes des rayons UV reste donc un défi permanent et primordial pour la recherche dans l'industrie cosmétique.

Dans un premier temps, le travail a consisté à développer des nouvelles formulations de produits solaires contenant des concentrations élevées en filtres UV, conditionnées sous forme d'aérosol, celles-ci valables pour le marché européen. Une émulsion E/H et une émulsion E/Si ont donc été réalisées. Elles contenaient au final 27% de filtres UV pour l'émulsion E/H et 16,5% de filtres UV pour l'émulsion E/Si, dont 4% de filtres inorganiques pour les deux types d'émulsion. Leur viscosité était de 6800 mPa.s pour l'émulsion E/H et de 2800 mPa.s pour l'émulsion E/Si. Ces formulations étaient stables lorsqu'elles étaient conservées pendant 2 mois à 40°C et également lorsqu'elles subissaient 5 cycles de température entre 5°C et 40°C. La mise en aérosol de ces émulsions a nécessité l'utilisation de 22% de gaz propulseur (mélange : butane, propane, isobutane).

La taille des gouttelettes étant un paramètre important de la caractérisation des aérosols pour le choix des matériaux à utiliser ainsi que pour sécurité afin d'éviter toute inhalation pulmonaire, l'influence de différents éléments sur celle-ci a été étudiée. Nous avons ainsi montré que la concentration en gaz, la viscosité, la présence ou non de filtres inorganiques ainsi que le choix des valves et diffuseurs

utilisés jouent un rôle dans la taille des gouttelettes émises, celle-ci ne pouvant pas être inférieure à 30 µm de diamètre. La taille des gouttelettes émises était supérieure à 50 µm avec pas plus de 0.1% ayant une taille inférieure à 10 µm et maximum 25% des gouttelettes ayant une taille comprise entre 10 et 30 µm.

Les produits formulés contenaient de grandes quantités en filtres solaires, organiques et inorganiques (27% pour l'émulsion E/H et 16,6% pour l'émulsion E/Si), il était donc important de vérifier qu'aucun des filtres présents dans les émulsions ne passaient à travers la peau lors de l'application des produits solaires. En effet, ceux-ci doivent rester à la surface de l'épiderme afin de maintenir l'efficacité des produits solaires et d'éviter des effets néfastes systémiques éventuels en pénétrant la peau. Une étude *in vitro* utilisant de la peau humaine excisée et des cellules de diffusion de Franz nous a permis de constater que les filtres inorganiques présents dans les formulations restaient en surface de la peau, et seulement deux des filtres organiques (l'EMC et MBBT) présentaient un potentiel de pénétration cutanée négligeable et non nocif pour la santé humaine (maximum 1,21 µg/ml/cm<sup>2</sup> pour EMC et maximum 0,14 µg/ml/cm<sup>2</sup> pour MBBT). De plus, après 24 h d'expérience, plus de 50% des filtres restaient à la surface de la peau, ce qui permettait de maintenir l'efficacité des produits solaires. Afin de mener à bien cette étude, des méthodes analytiques pour l'analyse simultanée des filtres solaires organiques d'une part, par CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance), et inorganiques d'autre part, par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry), ont été mises au point et validées.

Une étude *in vivo* non invasive, basée sur le prélèvement des couches successives du stratum corneum, a été réalisée par la suite. Cette dernière a été effectuée par la méthode du « tape stripping », qui utilise des disques adhésifs rigides, et sur 9 volontaires pendant une période de 8 h. Elle a permis de confirmer les résultats obtenus avec la méthode *in vitro*. Une bonne corrélation entre ces deux types d'étude a été observée.

Enfin, la dernière partie du travail a porté sur l'EMC, un des filtres organiques utilisé dans la plupart des produits solaires mis sur le marché et dans les émulsions

E/H et E/Si formulées. Ce filtre présente une sensibilité à la lumière et aux rayons UV. L'encapsulation lipidique de celui-ci a donc été envisagée afin de produire des nanoparticules dont la matrice lipidique a pour but de protéger l'EMC contre une dégradation causée par les rayons UV. Trois lipides différents ont été investigués et ont montré des résultats positifs de protection vis-à-vis des rayonnements UV. En effet, après 2 h d'irradiation par les UV, une perte d'efficacité de 30% de l'EMC pur a été observée contre 10% à 21% pour l'EMC encapsulé par les différents lipides. De plus, les nanoparticules n'ont pas montré de potentiel d'augmentation de pénétration cutanée de l'EMC.

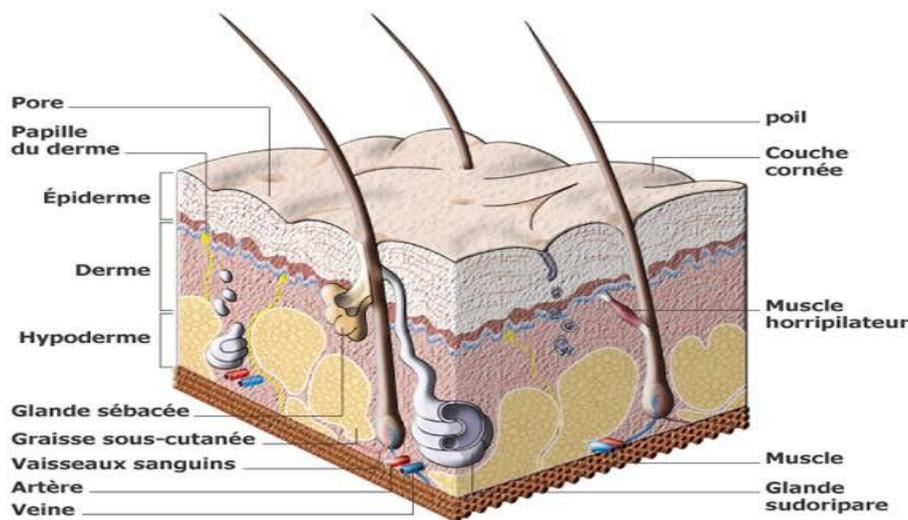
## **II.INTRODUCTION**

## **II. Introduction**

### **II.1 Rappel de l'anatomie et de la physiologie de la peau**

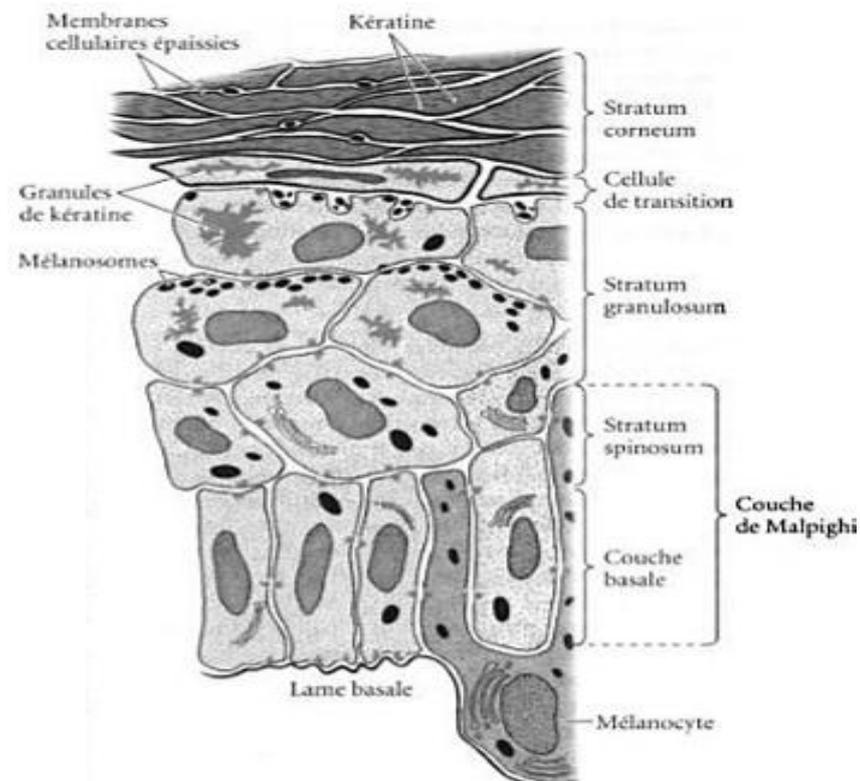
La peau est l'organe le plus important du corps humain. En effet, elle représente en moyenne 10% de la masse corporelle (Walters et Roberts, 2002) avec une superficie de 1.8 m<sup>2</sup> pour un homme de poids moyen de 70 kg.

La peau possède différentes fonctions : thermorégulation et homéostasie hydrique de par sa forte irrigation sanguine, siège du toucher, excrétion et absorption, métabolique (synthèse de la vitamine D). Mais son rôle principal est de former une barrière contre les agressions du milieu extérieur (Bouwstra et col. 2006) en s'opposant à la perte des fluides biologiques internes ainsi qu'à l'entrée des substances étrangères et des bactéries pathogènes dans l'organisme. Cette fonction est assurée en premier lieu par la partie la plus externe et non vivante de la peau : le stratum corneum (SC). Celui-ci recouvre les trois couches essentielles de la peau que sont l'épiderme (dont il fait partie), le derme et l'hypoderme (Figure 1).



**Figure 1** : Structure générale de la peau (Peau, 2009)

## II.1.1 L'épiderme



**Figure 2** : Structure de l'épiderme (Gilbert, 2004)

L'épiderme, structure hétérogène, est la couche la plus externe de la peau (Figure 2). Il possède une épaisseur moyenne de 100  $\mu\text{m}$  (Martini, 2003). Il est composé de quatre types de cellules et de quatre ou cinq couches distinctes selon les types de peau. Il ne possède aucun vaisseau lymphatique ni sanguin, mais renferme de très nombreuses terminaisons nerveuses libres. Ses fonctions sont multiples, la principale étant la génération du stratum corneum grâce aux kératinocytes qui représentent 90% des cellules épidermiques. Ceux-ci ont la particularité de se transformer progressivement en cornéocytes au cours du phénomène de kératinisation. C'est ainsi que l'on retrouve, de l'intérieur vers l'extérieur, le **stratum basale** (ou couche germinative), le **stratum spinosum**, le **stratum lucidum** (uniquement pour les peaux épaisses) et le **stratum corneum** (Maziere, 1997).

Les cellules les plus importantes qui constituent l'épiderme sont donc les **kératinocytes** (Mackenzie, 1975). Ils proviennent de cellules de la couche basale (la plus profonde) qui se divisent de façon continue par la mitose. Au fur et à mesure

que les kératinocytes migrent vers les couches superficielles de la peau, ils produisent de la kératine molle. Ils subissent ensuite une apoptose au cours de leur migration pour ne devenir que des membranes plasmiques remplies de kératine à la surface de la peau (les cornéocytes). Ces cellules mortes s'éliminent chaque jour et sont sans cesse remplacées par une production continue de kératinocytes au niveau de la couche basale. Le renouvellement de l'épiderme nécessite environ quatre semaines pour une épaisseur moyenne de 100 µm.

Les **mélanocytes** constituent la deuxième population cellulaire de l'épiderme. Ils synthétisent la mélanine (pigment noir) et se situent dans les couches profondes de l'épiderme. Ces cellules étoilées possèdent de nombreux prolongements qui leur permettent d'être en contact avec les kératinocytes qui absorbent ainsi la mélanine. Celle-ci s'accumule à la surface du noyau des kératinocytes du stratum spinosum. Elle forme ainsi un « bouclier » contre les rayonnements ultraviolet du soleil.

Les deux autres types de cellules retrouvées dans l'épiderme sont les **cellules de Langerhans**, produites dans la moelle osseuse et qui contribuent à l'activation des cellules du système immunitaire; et **les cellules de Merkel**, qui se retrouvent à la jonction du derme et de l'épiderme et qui jouent un rôle dans la perception du toucher (Marieb, 1999).

### **II.1.2 Le derme**

Il représente la couche la plus profonde de la peau. Il est constitué de deux couches : le **stratum papillaire** et le **stratum réticulaire**.

Le **stratum papillaire** est la partie superficielle du derme. Il est composé de tissu conjonctif aréolaire contenant des fibres élastiques. La surface du derme est fortement agrandie par les papilles dermiques qui renferment des boucles de capillaires, des corpuscules tactiles capsulés (ou corpuscules de Meissner, terminaisons nerveuses sensibles au contact), ou des terminaisons nerveuses libres qui déclenchent des sensations de froid, de chaleur, de douleur et de démangeaison.

Le **stratum réticulaire**, qui représente environ 80% du tissu dermique, est composé de tissu conjonctif dense, irrégulier contenant des fibres de collagènes et de quelques grosses fibres élastiques. Cette association confère à la peau sa

résistance, son élasticité et son extensibilité. Les espaces entre les fibres renferment quelques adipocytes, des follicules pileux, des nerfs, des glandes sébacées et des glandes sudoripares (Tortora et Grabowski, 2001).

### **II.1.3 L'hypoderme**

Il est constitué de tissus adipeux et renferme aussi un peu de tissu conjonctif aréolaire. Sa répartition et son épaisseur varient en fonction de l'âge, du sexe, des hormones et de l'état nutritionnel (Barry, 1983). Il ne fait pas partie à proprement parler de la peau mais il lui permet d'assurer certaines de ses fonctions de protection. De plus, il relie la peau aux structures sous-jacentes, comme les muscles, et lui permet de s'étirer et de s'adapter aux mouvements de ses structures, ce qui a pour conséquence un certain amortissement des chocs. Il joue également un rôle important dans le contrôle des pertes de chaleur.

### **II.1.4 Les annexes cutanées**

Elles sont dérivées de l'épiderme et comprennent les poils et les follicules pileux, les ongles, les glandes sudoripares et les glandes sébacées.

Les **poils**, que l'on retrouve sur la majeure partie de la peau, sont composés d'une colonne de cellules kératinisées mortes réunies par des protéines extracellulaires. Ils sont entourés du follicule pileux à leur racine et sont composés d'une gaine radicaire interne et d'une gaine radicaire externe. Ils vont avoir un rôle de protection.

Les **ongles** sont des plaques de cellules épidermiques kératinisées, dures et entassées. Ils sont composés d'un corps, d'un bord libre et d'une racine. Ils ont une fonction de préhension (ils nous aident à saisir et manipuler les objets) et ils protègent les extrémités des doigts contre les blessures.

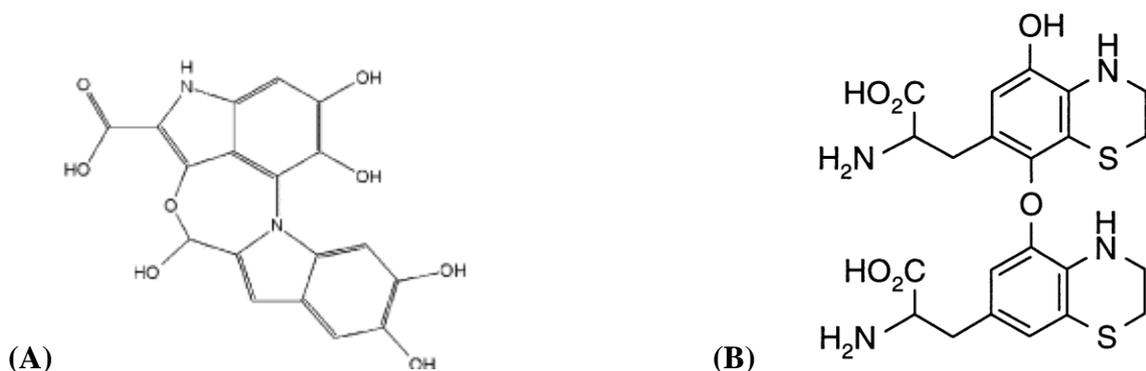
Les **glandes sudoripares**, de l'ordre de trois à quatre millions, peuvent être distinguées en deux classes : les glandes sudoripares **exocrines** et **apocrines**. Les premières sont beaucoup plus nombreuses et réparties sur tout le corps. Ce sont des glandes simples tubuleuses enroulées. Elles sécrètent environ 600 ml de sueur par

jour. Ce volume peut être augmenté par une activité physique importante, une température extérieure élevée ou encore un stress émotionnel. La sueur est essentiellement composée d'eau, d'ions, d'acide urique, d'ammoniaque, d'acides aminés, de glucose, de sels minéraux, d'acide lactique et de toxines. Les glandes sudoripares apocrines, quant à elles, sont principalement situées dans la peau des aisselles, des aines, des aréoles et des régions barbues du visage chez l'homme. Elles sont caractérisées par une libération de la sueur par exocytose. Les glandes sudoripares ont pour rôle de réguler la température.

Les **glandes sébacées** sont des glandes simples acineuses ramifiées réparties sur tout le corps à l'exception de la paume des mains et de la plante des pieds. Elles sécrètent une substance huileuse, le sébum, qui protège les poils et les cheveux du dessèchement et des cassures, prévient l'évaporation excessive de l'eau à la surface de l'épiderme et inhibe la croissance de certaines bactéries.

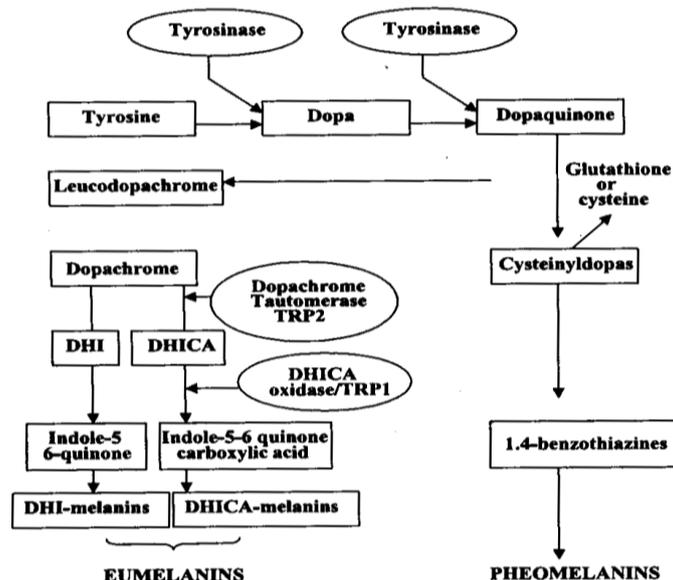
### **II.1.5 La mélanine et la mélanogénèse**

Les radiations ultraviolettes (UV) stimulent la production de mélanine par les mélanocytes contenus dans l'épiderme humain. Cette pigmentation endogène procure une protection contre les cancers de la peau et les dommages causés sur l'ADN induits par les UV (Brown, 2001 ; Giacomoni, 1995).



**Figure 3 :** Exemple de polymère d'Eumélanine (A) et de Phéomélanine (B)  
(Napolitano et col., 2000 ; Tran et col., 2006)

La synthèse se déroule dans un organite appelé mélanosome et la mélanine est ensuite transférée dans les kératinocytes. Deux types de mélanine sont synthétisés dans la peau: les **eumélanines** (noire-brunes) et les **phéomélanines** (jaunes à rouges) (Figure 3). Ces deux types de pigments diffèrent par leurs couleurs respectives mais également par leurs solubilités et la quantité de soufre qu'ils contiennent. Ils proviennent d'une voie métabolique commune dans laquelle intervient une enzyme clé : la tyrosinase. Celle-ci hydroxyle la tyrosine en dihydroxyphenylalanine (DOPA) dans un premier temps. Cette première étape constitue le facteur limitant de la synthèse des pigments de mélanine. Une fois que la DOPA est produite, elle est oxydée en Dopaquinone qui est l'intermédiaire majeur de ce métabolisme et qui est immédiatement converti en un intermédiaire appelé dopachrome. Celui-ci subit une cyclisation interne et se transforme spontanément en 5,6-dihydroxyindole (DHI) qui rentre dans une séquence de polymérisation oxydative dont le résultat est la formation d'eumélanine. La permutation entre l'eumélanogénèse et la phéomélanogénèse apparaît au niveau de l'étape de la DOPAquinone. Un donneur de groupement sulfuré, probablement la cystéine ou la glutathione, réagit avec cette dernière pour produire des cysteinyl dopas qui se cyclisent en benzothiazines et dont la condensation donne naissance aux phéomélanines (Figure 4) (Ortonne, 2002).



**Figure 4** : Schéma simplifié de la mélanogénèse (Ortonne, 2002)

Les mélanines peuvent avoir des propriétés de protection ou non contre les radiations UV, en fonction de leur localisation dans l'épiderme, de la quantité de cellules pigmentées et du type d'irradiation qui atteint la peau (UVA ou UVB) (Hill et col., 2000).

Les mélanines possèdent différentes propriétés qui leur permettent d'agir comme protecteurs de la peau. De façon générale, elles peuvent transformer différents types d'énergie sous forme de chaleur et dissiper ensuite celle-ci. Elles possèdent des activités antioxydantes, en agissant comme des superoxyde-dismutases, et leur structure chimique leur permet d'absorber en continu les rayonnements UV. Ces caractéristiques leur permettent ainsi de prévenir et de protéger l'ADN contre les agressions des UV. Cependant, lorsque les mélanines sont exposées à la lumière de façon continue, elles peuvent se dégrader, s'ioniser ou produire des radicaux libres. Ces phénomènes peuvent causer des dommages sur l'ADN (Giacomoni, 1995 ; Hearing, 2005).

### **II.1.6 Les différents phototypes**

La quantité de mélanine diffère d'un individu à l'autre. Ceci conduit à une classification des **phototypes** basée sur la corrélation entre les différentes couleurs de peau et les réponses face aux irradiations UV (Tableau 1).

**Tableau 1** : Le classement des phototypes (Malvy et col., 2000)

| <b>Phototype</b> | <b>Couleur de peau</b>      | <b>Couleur de cheveux</b> | <b>Susceptibilité aux coups de soleil</b> | <b>Capacité à bronzer</b> |
|------------------|-----------------------------|---------------------------|---|---------------------------|
| <b>I</b>         | Blanche Ivoire              | Roux                      | Toujours                                  | 0                         |
| <b>II</b>        | Blanche                     | Blond                     | Toujours                                  | ±                         |
| <b>III</b>       | Blanche                     | Blond-Châtain             | Souvent                                   | +                         |
| <b>IV</b>        | Beige-Faiblement<br>bronzée | Brun                      | Rarement                                  | ++                        |
| <b>V</b>         | Brune-Bronzée               | Brun                      | Exceptionnellement                        | +++                       |
| <b>VI</b>        | Noire                       | Noir                      | Jamais                                    | +++                       |

Ces variations de pigmentation de la peau sont dues à différents paramètres : les différences génétiques, la quantité de mélanine présente, l'exposition à différentes quantité de rayons UV, la teneur en mélanosomes et le type de pigments trouvés dans la peau (l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine, la mélanine et les caroténoïdes) (Rawlings, 2006). En effet, en fonction des différences génétiques inter individuelles, les enzymes sont plus ou moins actives et la production des diverses mélanines est plus ou moins importante. Les variations de production de mélanine peuvent aussi être expliquées par les différents stades de vie des mélanosomes qui présentent des différences d'activité au niveau des protéines mélanogéniques. En effet, par exemple, les mélanocytes matures ont une activité en Dopachrome tautomérase (enzyme intervenant dans le cycle de la mélanogénèse) que les mélanocytes immatures ne possèdent pas (Maeda et col. 1997). Ainsi, chaque individu n'aura pas la même capacité de protection contre les radiations UV. Les personnes ayant une peau plus foncée auront une meilleure protection naturelle contre les effets néfastes du soleil, par rapport à un individu à peau claire.

## **II.2 Le soleil et la peau**

Toutes les radiations qui proviennent du soleil voyagent sous forme d'onde électromagnétique. Les types de radiations solaires sont caractérisés en termes de longueur d'onde. Celle-ci est la distance qui sépare deux points d'une phase identique entre deux cycles successifs de l'onde (Shaath et col., 1998) :

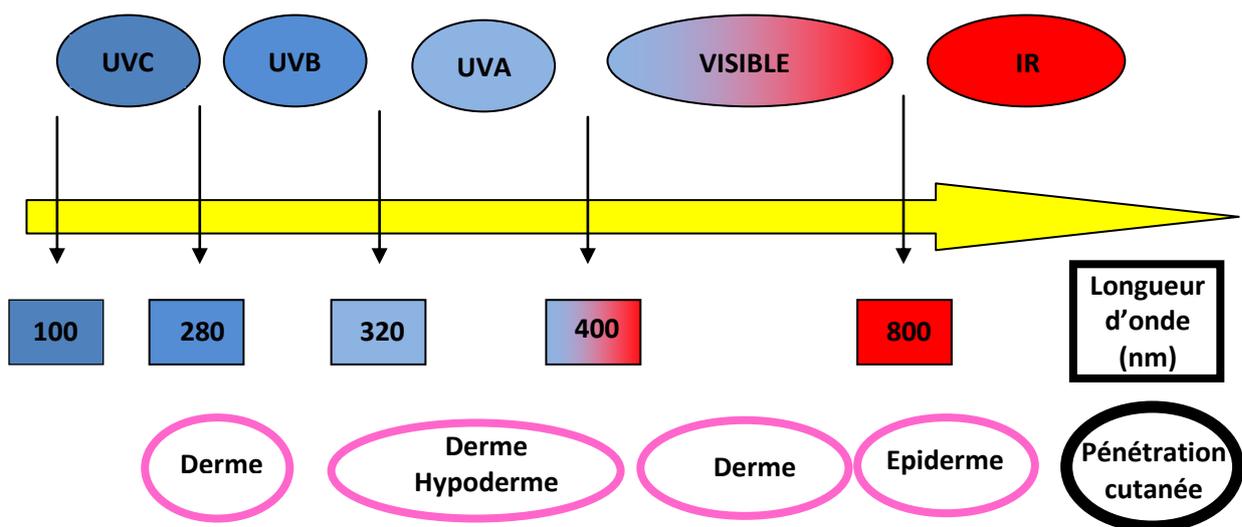
$$\lambda = c / \nu \quad (1)$$

$\lambda$  : longueur d'onde (nm)

$c$  : vitesse de la lumière ( $3 \times 10^8$  m/s)

$\nu$  : fréquence de l'onde (Hz)

Le spectre des radiations solaires se divise en trois parties distinctes : les rayons ultraviolets, les radiations visibles et les radiations infrarouges. Ces radiations pénètrent la couche cutanée de façons différentes (Figure 5). Les longueurs d'onde à peine plus courtes que celle du violet dans le spectre du visible sont mentionnées comme radiations ultraviolettes (UV). Elles sont définies comme toutes radiations situées entre 100 et 400 nm. Même s'il existe d'autres sources, comme les lampes par exemple, la majorité des rayonnements UV qui atteignent la surface de la terre proviennent du soleil. La plupart des rayons UV sont absorbés ou réfléchis par l'atmosphère. En effet, l'ozone ( $O_3$ ), qui est présente dans la stratosphère entre 10 et 50 km au-dessus de la surface de la terre, est une molécule qui absorbe les photons. La couche d'ozone absorbe donc tous les rayonnements UVC, une grande quantité d'UVB courts, et une très faible quantité d'UVA.



**Figure 5:** Schéma récapitulatif du rayonnement solaire et ultraviolet, et de leur pénétration cutanée

### II.2.1 Le rayonnement ultraviolet:

Il est difficile de séparer les différents rayonnements UV pour expliquer les dégâts du soleil sur la peau. Nous pouvons toutefois en distinguer trois types : les UVA, les UVB et les UVC. Les subdivisions sont arbitraires et diffèrent en fonction de la

discipline invoquée. La plupart du temps, les rayons UV sont divisés de la façon suivante :

UVA: 400-320 nm                      UVB: 320-280 nm                      UVC: 280-100 nm

Cependant, les photobiologistes en dermatologie et en environnement définissent les différentes régions des UV comme suit (Diffey, 2002 (A)) :

UVA: 400-315 nm                      UVB: 315-280 nm                      UVC: 280-190 nm

Chacun a une action directe ou indirecte sur la peau (Ravanat et col., 2001), à cause de leur différence d'énergie et de leur site d'action au niveau cutané. Ainsi, les rayons UVC sont plus énergétiques que les UVB et les UVA et leurs effets néfastes sur l'ADN sont plus importants car leur longueur d'onde est plus faible et donc leur énergie plus élevée (Figure 6). L'énergie du rayonnement est en effet inversement proportionnelle à la longueur d'onde et est régie par les équations suivantes :

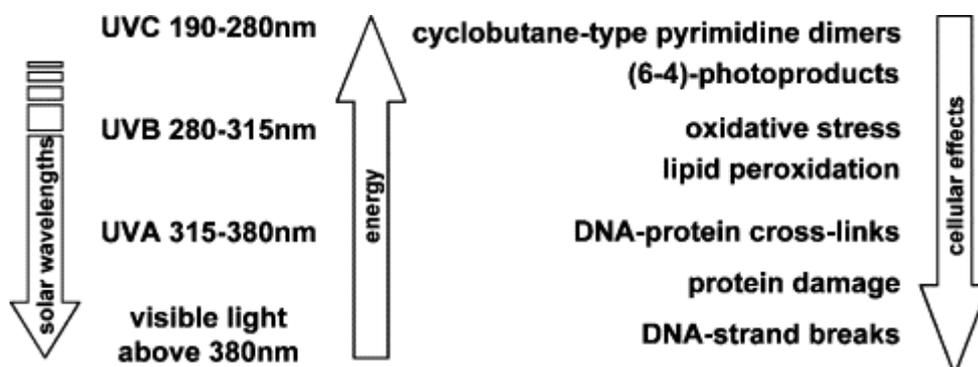
$$E = h \nu \quad (2)$$

E : énergie (eV)

h : Constante de Planck ( $6,62 \cdot 10^{34}$  J.s)

ν : fréquence de l'onde (Hz)

D'où 
$$E = h \cdot c / \lambda \quad (3)$$

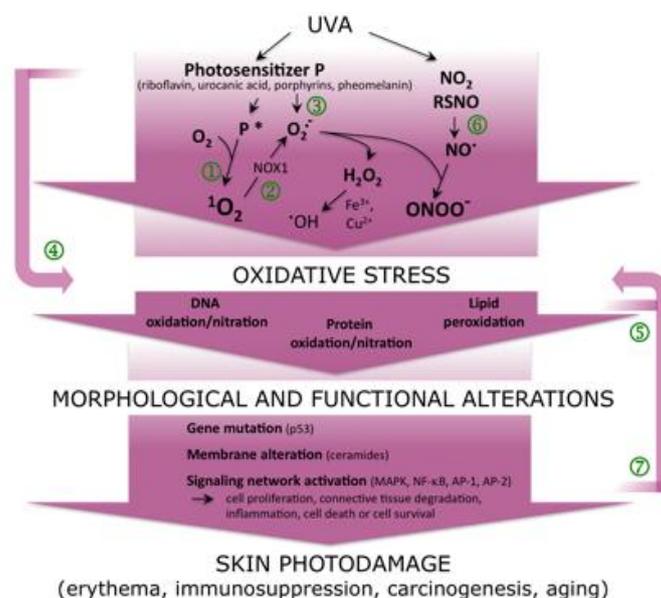


**Figure 6:** Résumé des actions des UV (Latonen, 2005)

### II.2.1.1 Les UVA

Leur longueur d'onde se situe entre 320 et 400 nm. Ils ont été longtemps considérés comme inoffensifs, mais plusieurs études ont démontré leur rôle néfaste sur la peau (Diffey, 2002 ; Nole et Johnson, 2004). En effet, ils ne sont pas responsables des effets immédiats du soleil, et leur énergie est plus basse que celle des rayons UVB mais ils représentent 90% à 95% du rayonnement UV pour une journée ensoleillée car ils ne sont que très peu arrêtés par la couche d'ozone. Ils possèdent en outre une importante capacité à pénétrer dans le derme profond.

Contrairement aux UVB, les UVA réagissent d'abord avec des agents photosensibilisateurs endogènes (porphyrines, flavoprotéines, NADH, NADPH), pour créer des radicaux libres qui vont ensuite causer des dégâts importants au niveau de l'ADN (Abdulla et col., 2005 ; English et col., 1997, Césarini et col., 2003). En effet, l'oxygène singulet et le peroxyde d'hydrogène sont des espèces oxygénées réactives produites de façon importante via les UVA. Ils vont engendrer des dommages biologiques au niveau des tissus exposés via les réactions oxydatives catalysées par le fer (Pourzand et col. 1999) (Figure 7). Ainsi, leurs effets sont **indirects** et sont en général visibles plusieurs années après l'exposition par l'apparition du vieillissement précoce de la peau (Tsukahara et col. 2005). Ils provoquent moins d'érythème que les UVB et favorisent un bronzage rapide en accélérant la maturation des mélanines contenues dans les kératinocytes.

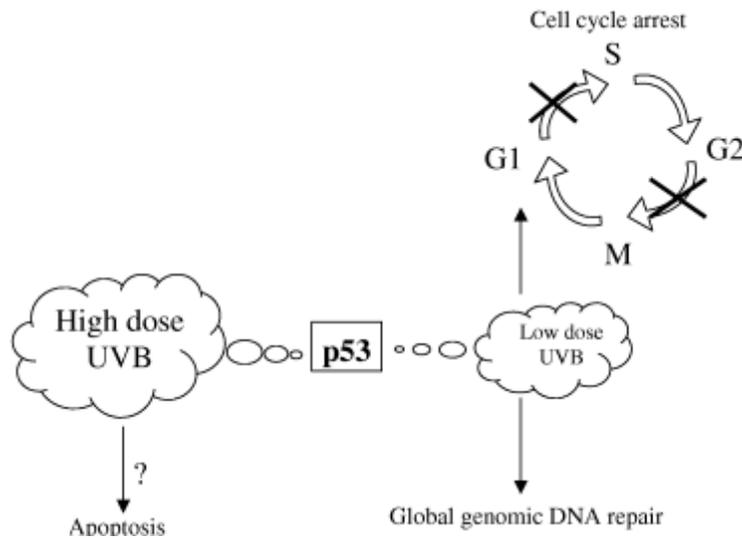


**Figure 7:** Action des UVA au niveau cellulaire (UVA action, 2009)

### II.2.1.2 Les UVB

Leur longueur d'onde se situe entre 280 et 320 nm. La fraction UVB du rayonnement solaire va elle aussi provoquer quelques stress oxydatifs mais elle va surtout exercer ses effets néfastes sur la peau par des dommages **directs** sur l'ADN. En effet, les acides nucléiques de l'ADN et de l'ARN comprennent des chromophores qui absorbent fortement les UVB. Ceci entraîne généralement des dimérisations de la pyridine base et donc des dommages importants au niveau de la réplication de l'ADN. Les rayonnements UVB provoquent ainsi des mutations génétiques. En réponse à ces dégâts, la peau et les cellules de la peau disposent de différents mécanismes d'adaptation : la production de protéines spécifiques, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et finalement, lorsque celle-ci n'est pas possible, l'apoptose cellulaire (Verschooten et col., 2006 ; Hussein, 2005). Il est important de souligner ici l'implication du **gène p53** qui joue un rôle primordial dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Figure 8). Ce gène suppresseur de tumeur code pour une protéine réparatrice, la protéine p53 qui permet la réparation de l'ADN si les dégâts sont peu importants. Si ceux-ci sont trop sérieux, elle provoquera alors la mort cellulaire avec la formation des « sun-burns cells » (ou cellules « coups de soleil »). Au cours du temps, la protéine p53 peut muter et devenir inefficace. Il y a donc prolifération de cellules anormales qui entraîne la photo-carcinogénèse. Les UVB sont aussi responsables des érythèmes provoqués par le soleil et de la destruction des kératinocytes.

De plus, ils présentent un effet négatif sur le système immunitaire. En effet, ils vont agir sur les cellules de Langerhans. Celles-ci sont présentes dans l'épiderme et sont responsables d'une partie de la réponse immunitaire en servant de cellules présentatrices d'antigène et en interagissant avec les lymphocytes. Les UVB agissent en diminuant leur nombre et en altérant leur fonctionnement. Altérées et abîmées, les cellules de Langerhans ne peuvent alors plus jouer leur rôle de reconnaissance et de rejet de cellules anormales. Nous parlons alors d'immunosuppression, entraînant l'accumulation de cellules endommagées et l'apparition de cancers cutanés (Duthie et col., 1999 ; Matsumura et col., 2003 ; Debacq-Chainiaux et col., 2005).



**Figure 8:** Action des UVB sur le gène p53 (Verschooten et col., 2006)

### II.2.1.3 Les UVC

Ils se situent entre 200 et 280 nm. Ils nous concernent encore peu à l'heure actuelle, en effet, ils n'arrivent pas sur la surface de la terre car ils sont arrêtés par la couche d'ozone. Cependant, il ne faut pas négliger les endroits où la couche d'ozone est percée (Arctique ; Antarctique et ses régions limitrophes comme l'Australie et l'Amérique du Sud) car les UVC sont ionisant et ils peuvent donc présenter un risque pour la population générale.

### II.2.2 Actions bénéfiques des rayons UV

Malgré les risques importants de provoquer différentes pathologies cutanées, une exposition naturelle et quotidienne est nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. En effet, la peau doit être soumise à une exposition solaire minimale pour permettre la production de **vitamine D**. Celle-ci est apportée à l'homme par deux voies : l'alimentation et la synthèse endogène initiée par les UVB. Le 7-déhydrocholestérol se photoisomérisé en provitamine qui se transforme, sous l'action de la chaleur, en Vitamine D3. La présence de hautes concentrations en mélanine semble être un facteur limitant de la synthèse de la vitamine D ; les personnes ayant une couleur de peau foncée et vivant dans des régions peu ensoleillées présentent

souvent des déficiences en vitamine D3. Celle-ci joue un rôle important dans l'organisme et permet de diminuer le risque d'apparition de certaines maladies : cancer du colon, problème cardiaques, hypertension, myopathie, ostéoporose, susceptibilité aux infections. Les rayons UVB peuvent aussi être utilisés comme traitement contre le psoriasis, et des analogues de la vitamine D3 peuvent être utilisés en complément à cette thérapie (Malvy et col., 2000 ; Grant et col., 2004).

### **II.2.3 Actions néfastes des rayons UV**

#### **II.2.3.1 Les cancers cutanés**

Les rayons ultraviolets sont considérés comme étant les premiers agents en relation avec les cancers cutanés. Ils sont cependant souvent associés aux facteurs génétiques et constitutionnels de chaque individu. Ils sont associés à une morbidité significative, des coûts de santé importants et, particulièrement pour le mélanome, la mortalité. Les études épidémiologiques montrent que les cas de cancers cutanés ont augmenté ces 30 dernières années. En 2009, plus de 148 000 nouveaux cas de cancers cutanés (cancers cutanés non-mélanomes et mélanomes malins) ont été diagnostiqués aux Etats-Unis, avec plus de 22 000 décès. Ceci représente, en 15 ans, une progression du cancer de la peau de plus de 3,5% (Jemal et col., 2009). En France, le nombre de cas de mélanomes malins a triplé en 20 ans, passant de 2300 en 1980 à 7200 en 2000 avec une mortalité qui a doublé durant cette même période (Philippe et col., 2006). Le risque de développer un cancer cutané est différent d'une région à l'autre du monde. Par exemple, les personnes provenant des régions de l'est asiatique présentent moins de risque de développer des cancers cutanés par rapport aux européens et particulièrement par rapport aux pays scandinaves (Qiu et col., 2006). En effet, les différences génétiques entre les populations (Cf. Partie II.1.6) ainsi que les variations de radiations solaires entre les régions du monde contribuent à une meilleure protection naturelle de certaines ethnies contre les effets néfastes des rayons ultraviolets (Rawlings, 2006). De plus, la société asiatique prône les peaux claires et les expositions volontaires au soleil sont en général évitées (De Vries et col., 2004).

Cette augmentation du nombre de cancers cutanés est liée à différents facteurs. En effet, une grande partie de cet accroissement est due à une surexposition de la peau au soleil liée au mode de vie actuel et surtout aux modes de loisirs. Une autre conséquence de ces changements de mode de vie est un déclin important de l'ozone stratosphérique, qui est le principal bouclier contre les radiations UV à la surface de la terre (Urbach, 1997 ; Hussein, 2005).

Il existe différentes formes de cancers cutanés : **cancers cutanés non-mélanomes** (CCNM) et **mélanome malin cutané** (MMC).

#### II.2.3.1.1 Les cancers cutanés non-mélanomes (CCNM)

Ils représentent la plus grande partie des cancers cutanés chez les personnes blanches. Le terme de cancers non-mélanomes recouvre les cancers cutanés qui ne touchent pas les mélanocytes. Ils sont divisés en deux catégories principales qui comptent pour plus de 95% des CCNM : le **carcinome spinocellulaire** (CSC) et le **carcinome basocellulaire** (CBC). Comme l'indique leurs noms ils vont toucher respectivement les cellules de la couche spinieuse et de la couche basale de l'épiderme. Ces tumeurs sont associées à un faible taux de mortalité mais un taux relativement élevé de lésions cutanées disgracieuses souvent retrouvées au niveau des parties du corps les plus exposées à la lumière : le visage, le cou et les mains (Diepgen et col., 2002 ;Trakatelli et col. 2007).

**Le CSC** est en général moins fréquent que le CBC (rapport 1:4) mais est plus agressif. La cause principale de ce cancer est due à un effet cumulatif au cours du temps d'une exposition chronique au soleil. Les UV traversent l'épiderme et atteignent les couches cellulaires où les précurseurs de CCNM sont présents. Le développement de ce type de cancer est un processus en plusieurs étapes dont les kératoses actiniques sont les premières lésions visibles. Les mutations précoces au niveau de l'ADN, comme les mutations du gène codant pour la protéine p53 (voir II.2.1.2) et les perturbations de l'activité de la glutathion peroxydase provoquées par les UV, engendrent des altérations de l'ADN en cascade et conduisent à l'apparition de carcinomes.

Contrairement au CSC, **le CBC** peut se développer suite à des expositions aux UV importantes mais sporadiques, qui ont lieu tôt dans la vie et bien avant l'apparition du carcinome. Il est également dû à des mutations de l'ADN et apparaît principalement au niveau du visage. La grande fréquence de mutation du gène p53 est accompagnée de nombreuses autres mutations, et notamment de la perte du chromosome 9q qui est un autre gène suppresseur de tumeur important. Leur capacité à développer des métastases est plus faible, ce qui nécessite un suivi moins drastique que pour le CSC. Néanmoins, comme il atteint les cellules de la couche basale, il peut être très invasif.

Ces deux types de CCNM peuvent se manifester par l'apparition de lésions cutanées au niveau des parties du corps les plus exposées au soleil. Ces lésions peuvent évoluer en ulcérations. Les traitements appropriés de ces carcinomes sont la chirurgie et la radiothérapie (Helfand et col., 2001 ; Otley, 2001 ; MacKie, 2006 ; Ahmed et col., 2008).

#### II.2.3.1.2 Les mélanomes malins cutanés (MMC)

Le MMC est la forme la plus sérieuse du cancer de la peau et est la première cause de mortalité par cancer en dermatologie. La probabilité d'avoir un MMC dans les années à venir en Europe augmente considérablement et son incidence est en constante progression (Thomas et col., 1998 ; Giblin et col., 2006). Les facteurs de risques principaux de développer un mélanome sont :

- les facteurs génétiques, avec une susceptibilité accrue de développer un mélanome cutané pour les personnes ayant une pigmentation de la peau caractéristique (surtout les peaux claires)
- les expositions répétées au soleil
- les réactions vis-à-vis du soleil (brûlures, coups de soleil...).

Deux gènes prédisposant fortement à l'apparition de mélanomes cutanés ont été identifiés : CDKN2A et CDK4. Un troisième gène, le p14<sup>ARF</sup> est un candidat sérieux pour l'apparition des mélanomes. Ces gènes codent pour des protéines intervenant dans des cycles de régulation de tumeurs par activation d'apoptose ou par diminution de cycle de division cellulaire. Lorsque ces gènes subissent des mutations,

l'activité de suppression de tumeur des cellules est amoindrie et le cancer se développe (De Snoo et col., 2005).

L'exposition aux UV est un facteur de risque surtout chez les enfants qui peuvent développer dans leur vie adulte un mélanome. Une seule dose provoquant un coup de soleil peut être suffisante. Dans les mélanomes à caractère familial, l'exposition aux UV semble augmenter leur gravité (De Snoo et col., 2005 ; De Vries et col., 2004).

Le développement du mélanome malin est donc multifactoriel. Il se caractérise par l'apparition de taches brunes asymétriques, à bords irréguliers, de couleur inhomogène et de diamètre supérieur à 6 mm. Il montre une augmentation progressive de sa surface au cours du temps. La clé de la réussite de la guérison résulte surtout d'un diagnostic précoce de la tumeur. Les traitements du mélanome sont assez larges et différents en fonction du stade de développement de celui-ci. La chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie et l'immunothérapie restent les traitements classiques du mélanome. Le stade métastatique de ce cancer répond très mal à toutes les sortes de traitements (Bressac-de-Paillerets et col., 2002).

#### II.2.3.1.3 La prévention des cancers cutanés

Le taux de mortalité des mélanomes étant assez élevé, la prévention contre les cancers cutanés reste la meilleure alternative pour combattre cette maladie.

La prévention primaire consiste en une protection contre les radiations UV. Différentes façons de protéger la peau contre ceux-ci existent : la protection naturelle (par le bronzage et les réactions moléculaires qui en résultent), le port de vêtements, éviter les expositions prolongées et répétées au soleil aux heures les plus chaudes de la journée et encourager l'utilisation des **produits de protection solaire**. Les campagnes de prévention contre les cancers cutanés se développent de plus en plus et la prise de conscience de la morbidité et de la mortalité de ces cancers permet aux individus de mieux se protéger.

La prévention secondaire consiste en un dépistage régulier et précoce, surtout pour les personnes présentant des facteurs de risque important (Diffey, 2005 ; Harris et col., 2004).

### II.2.3.2 : Autres pathologies liées aux rayons UV

Les cancers sont les pathologies les plus connues et les plus graves provoquées par une exposition prolongée à de hautes doses de rayons ultraviolets. Cependant, ils sont aussi à l'origine d'autres effets néfastes et d'autres types de dommages. En effet, ils peuvent être à l'origine de l'apparition de la cataracte ainsi que du vieillissement prématuré de la peau.

La cataracte est la plus grande cause de la perte de la vue dans le monde à l'heure actuelle. Les rayons UVB représentent un facteur de risque important pour 10% des cataractes corticales dans la population. Ces effets sont essentiellement dus à une exposition chronique au soleil ce qui provoque des dégâts oxydatifs. La prévention de la cataracte consiste à protéger les yeux vis-à-vis des rayons UV. Dans un deuxième temps, les antioxydants présents dans l'alimentation quotidienne peuvent également ralentir et prévenir l'apparition de la cataracte (Congdon, 2001 ; Javitt et col., 1995). Nous pouvons attribuer 80% du vieillissement cutané au niveau du visage à l'exposition solaire. Celui-ci est associé à une perte de l'élasticité, une augmentation de la rugosité et de la sécheresse, une pigmentation irrégulière et l'apparition de rides. Suite à une infiltration importante de neutrophiles inflammatoires qui correspond à une réponse à des doses importantes de radiations UV, une activité accrue de l'élastase dermique est observée. Ceci entraîne une diminution du nombre de microfibrilles et de fibres élastiques intactes. Ces phénomènes sont aussi accompagnés, entre autres, par l'apparition de nouveau matériel élastique, en réponse à des modifications génétiques (Jenkins, 2002 ; Kennedy et col., 2003 ; Trautinger, 2001).

## **II.3 Les produits cosmétiques et les protections solaires**

### **II.3.1 Définition des produits cosmétiques**

*« Un produit cosmétique est une substance ou une préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain (l'épiderme,*

*les systèmes pileux et capillaires, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes) ou avec les dents et la muqueuse buccale en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect et/ou de corriger les odeurs corporelles et/ou de les protéger ou de les maintenir en bon état.* » (Directive du Conseil des Communautés Européennes 76/768/CEE du conseil du 27/07/76; A.R. du 17 octobre 1997. Moniteur Belge du 16/01/1998).

Le produit cosmétique n'est pas considéré comme un médicament car il ne va pas traiter une maladie. Toutefois, certains produits cosmétiques spécifiques sont prescrits par des dermatologues en vue d'obtenir une amélioration de la santé de la peau ou des muqueuses.

La législation concernant les produits de protection solaire diffère en fonction des continents. En effet, en Europe, ils s'insèrent dans la catégorie des produits cosmétiques alors qu'aux Etats-Unis, ils sont inclus dans les produits pharmaceutiques dits OTC (« Over-the-counter ») et sont ainsi soumis à une législation plus rigoureuse. Leur mise sur le marché américain doit être approuvée par la Food and Drug Administration (FDA).

### **II.3.2 Les produits cosmétiques présents sur le marché européen**

En Europe de l'Ouest, 5 grandes nations se partagent le marché des cosmétiques (Colipa Statistics Working Group, 2006):

- ❖ Allemagne : 18,5% de parts du marché
- ❖ France : 16,8% de parts du marché
- ❖ Royaume-Uni : 15,3% de parts du marché
- ❖ Italie : 14,2% de parts du marché
- ❖ Espagne : 12% de parts du marché

La Belgique arrive en 7<sup>ème</sup> position avec 2,9% des parts du marché.

Le marché des produits cosmétiques est en constante progression depuis 2005. Cependant, comme le montre la figure 9, cette progression a diminué en 2008, avec une progression totale de 0,1%, contre presque 4% en 2007.



**Figure 9:** Evolution du marché européen des produits cosmétiques (Colipa, 2009)

### **II.3.3 Le marché des produits solaires**

Une étude effectuée par l'Oréal en 2002 a montré les tendances de consommation pour les produits solaires : les indices de protection solaire élevés représentent 40% de la demande des consommateurs avec 14,5% des produits avec un FPS supérieur à 30. Les textures différentes se répartissent comme suit :

- ✂ Laits : 43% : émulsions fluides E/H ou H/E
- ✂ Spray : 35% : émulsions fluides E/H ou H/E ; produits aqueux contenant de l'eau, des polymères fixateurs et des épaississant
- ✂ Huiles : 9.4% : mélanges d'huile de paraffine, d'esters gras synthétiques et d'huiles végétales
- ✂ Crèmes : 7,2% : émulsions E/H, H/E, E/Si ou Si/E

Cette étude montre que les consommateurs apprécient les sprays pour leur texture, leur application facile et leur toucher souvent moins gras que les crèmes. Par contre, les indices élevés sont souvent difficiles à obtenir par la difficulté d'incorporer de grandes quantités de filtres UV et notamment des filtres UV inorganiques.

## **II.3.4 Définition des produits solaires**

### II.3.4.1 Protection contre les UV et intérêt des produits de protection solaire

Depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, la perception des peaux claires par rapport aux peaux mates et bronzées a fortement évolué. En effet, pendant des siècles, avoir la peau claire dans l'hémisphère nord a été considéré comme un signe extérieur de richesse associé à l'aristocratie. Les peaux bronzées, au contraire, dévoilaient les travailleurs manuels qui étaient exposés aux rayons du soleil et qui avaient un rang social moins élevé dans la société.

Au début du siècle dernier, l'évolution des modes de vie et des mentalités a inversé cette tendance. Avoir un teint bronzé et halé toute l'année est alors symbole de loisir, de bien-être et de bonne santé. Depuis une trentaine d'années, une prise de conscience des dangers du soleil a fortement amoindri ce désir d'être bronzé tout au long de l'année. Cependant, les conditions de vie d'un grand nombre de personnes réunissent le soleil et les activités à l'extérieur. Ceci a contribué à obliger la population à prendre des mesures effectives de photoprotection.

Différentes mesures de protection contre le soleil sont préconisées (Wolf et col., 2001 A; Rosen, 1999 ; Gonzalez et col., 2008):

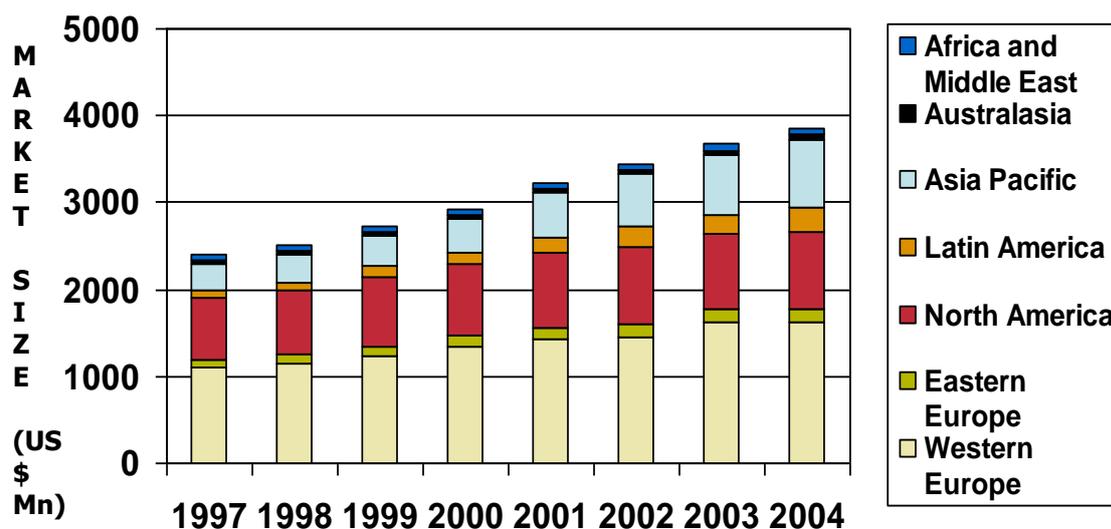
- ∞ Dans un premier temps, il est conseillé de modifier ses habitudes et de rester un maximum à l'ombre lors de toute activité nécessitant d'être à l'extérieur. Dans cette optique, de plus en plus d'infrastructures sont mises en place dans les lieux publics afin de permettre aux personnes de se protéger du soleil.
- ∞ Une deuxième mesure évidente consiste à éviter l'exposition au soleil entre 10h et 16h, quand les rayons UV sont les plus nocifs.
- ∞ Les vêtements constituent une excellente protection contre les rayons UV. Certains tissus protègent mieux que d'autres car ils ont une meilleure capacité à réfléchir les UV. De manière générale, les UVB sont mieux réfléchis que les UVA. Cette aptitude des textiles à protéger des UV s'exprime en « Facteur de Protection des UV » (FPU). Celui-ci est évalué de façon *in vitro* en mesurant la transmission des UVB et des UVA à travers différents textiles à l'aide d'un spectrophotomètre. Le type et la fabrication du tissu, les lavages, la couleur,

l'épaisseur, les traitements chimiques, la distance entre le vêtement et la peau sont des paramètres qui influencent la valeur de PFU. Le port d'un chapeau ainsi que des lunettes de soleil sont aussi vivement recommandés lorsqu'une exposition au soleil est envisagée.

- ∞ Il est important de sensibiliser les enfants et les adolescents aux effets néfastes du soleil car les coups de soleil reçus pendant ces périodes de la vie peuvent engendrer des photodermatoses et sont des facteurs de risque du mélanome. De plus, nous disposons tous d'un « capital soleil » qui diminue avec le nombre d'expositions au soleil, il est donc important de le maintenir en bon état le plus longtemps possible et ce, depuis le plus jeune âge. Les recommandations pour lutter contre les rayons UV sont les mêmes que celles citées ci-dessus avec une vigilance particulière pour les heures d'expositions et les FPS lors de l'utilisation de produits de protection solaire (Puech-Plottova, 2000 ; Meunier, 2009)
- ∞ Enfin, l'utilisation de produits contenant des filtres UV à large spectre est recommandée, en vue de diminuer l'apparition des cancers cutanés et d'autres pathologies liées au soleil.

La première utilisation de produit solaire rapportée dans le monde remonte à 1928 aux Etats-Unis avec une émulsion qui contenait deux filtres anti-UV. Les produits solaires modernes sont apparus lors de la seconde guerre mondiale, lorsque l'armée américaine a commencé ses investigations dans les pays tropicaux.

Leur efficacité contre l'apparition de kératoses actiniques et de carcinomes spinocellulaires a été prouvée dans différentes études, mais pas l'action contre les carcinomes basocellulaires (Thompson et col., 1993). De plus, l'utilisation régulière de produits solaires montre une atténuation de l'apparition de nouveaux naevi chez les enfants à peau très claire et ayant des tâches de rousseur. La prévention des effets aigus du soleil (comme les coups de soleil, les dégâts causés sur l'ADN de la peau et l'immunosuppression) grâce à l'utilisation de produits solaires a également été démontrée (Young et col., 2000 ; Roberts et col., 1996).



**Figure 10** : Evolution du marché des produits solaires dans le monde (Uniqema, 2006 )

Ces considérations et cette prise de conscience du danger du soleil ont eu pour conséquence une augmentation des ventes des produits de protection solaire ces dernières années, et plus particulièrement en Europe de l’Ouest et en Asie (Figure 10).

Cependant, l’efficacité des produits solaires sur la diminution de l’apparition des mélanomes cutanés a été remise en cause il y a quelques années. En effet, plusieurs études ont montré qu’il existait une corrélation entre l’utilisation des protecteurs solaires et l’apparition de ces cancers cutanés (Witheman et col. 1997 ; Westerdahl et col., 2000). Une augmentation de l’apparition des cancers cutanés a ainsi été observée en même temps qu’un accroissement de l’utilisation des produits de protection solaire, mais une relation directe entre ces deux effets n’a pas été mise en évidence. Toutefois, les conclusions de ces études sont à considérer avec quelques précautions et plusieurs paramètres doivent être pris en considération pour expliquer ces observations (Kullavanijaya et col., 2005 ; Lautenschlager et col., 2007 ; Bastuji-Garin et col., 2002 ; Nohynek et col., 2000 ; Urbach, 2001):

- ∞ Avant les années 1990, la plupart des produits de protection solaire présentait un facteur de protection solaire (FPS) bas (valeurs comprises entre 4 et 10) et la protection était généralement limitée aux rayonnements

UVB. Les produits avec des FPS>15 ne sont apparus qu'à partir des années 1980 avec l'apparition d'un plus grand nombre de filtres UV (Wolff et col., 2001 A).

- ∞ Le consommateur diminue sa vigilance face aux méfaits du soleil s'il utilise des produits de protection solaire. En effet, ils sont souvent utilisés uniquement lorsqu'une longue exposition aux UV est envisagée. Ceci révèle une fausse impression de sécurité : les produits de protection solaire ne permettent pas une exposition exagérée au soleil.
- ∞ Le consommateur n'est pas toujours avisé de la bonne utilisation des produits solaires. En effet, la quantité appliquée, l'uniformité ainsi que la fréquence d'application sont des facteurs primordiaux pour disposer d'une bonne efficacité du produit solaire. Il est recommandé de s'appliquer une protection 30 min avant toute exposition au soleil. Celle-ci doit être renouvelée 1h après (pour les FPS bas) puis toutes les deux heures maximum (plus fréquemment quand l'eau et le sable viennent altérer cette protection). Certaines zones du corps (cou, nuque, dos) sont plus difficilement accessibles, elles doivent donc attirer l'attention lors de l'application du produit.
- ∞ Il est important d'utiliser ces protections dès l'enfance (pas avant 6 mois) et l'adolescence.

Les campagnes de prévention des cancers cutanés ont donc un rôle important à jouer pour une bonne utilisation de ces produits qui sont à employer en association avec les autres formes de protection contre le soleil. Il est aussi important de souligner que l'application quotidienne de protection solaire est plus efficace que les applications sporadiques pendant la période estivale, car les petites expositions au soleil répétées comptent pour 80% de l'exposition totale tout au long de la vie (Schaefer et col., 2000).

#### II.3.4.2 Législation des filtres solaires

Les filtres solaires sont issus principalement de la recherche industrielle ou académique. Ils sont soumis à une législation différente en fonction des pays et des

continents. Leur mise sur le marché doit donc être approuvée par les différentes autorités compétentes des pays en fonction de leur sécurité pour le consommateur.

Trois types de législations dominant à l'heure actuelle : celle des Etats-Unis, de l'Union Européenne et de l'Australie.

☞ Etats-Unis : Depuis de nombreuses années, la FDA reconnaît les produits utilisés en prévention des coups de soleil comme des médicaments non soumis à prescription médicale (produits OTC), contrairement aux produits auto-bronzant qui, eux, sont repris dans la catégorie des produits cosmétiques. Cependant, certains produits à finalité cosmétique contiennent des filtres solaires, ils sont alors considérés comme « strictement » cosmétiques si les filtres UV ont un rôle de colorant (pigment), de protecteur de couleur du produit fini ou qu'ils n'ont pas de fonction « thérapeutique ». Les filtres solaires à usage « médicamenteux » sont repris dans des monographies établissant leur sécurité, leur efficacité et leur étiquetage. Les concentrations minimales en filtres ont été rehaussées afin de procurer une concentration permettant d'obtenir un FPS supérieur à 2. Un produit solaire ne pouvant pas avoir un FPS inférieur au nombre de filtres solaires utilisés dans la préparation multiplié par deux. Le terme « écran total » est maintenant totalement interdit (Murphy, 1997 ; Levy 2001).

☞ Union Européenne : Comme cela a été signalé auparavant, les produits solaires en Europe, rentrent dans la catégorie des cosmétiques, car leur fonction est de prévenir des coups de soleil. Le troisième amendement de la directive cadre du conseil des Communautés Européennes relative aux produits cosmétiques (directive 76/768/CEE) définit une liste des filtres UV qui peuvent entrer dans la composition des produits cosmétiques. Cette liste est reprise dans l'annexe VII qui définit les filtres UV comme suit : « *Les filtres ultraviolets au sens de la présente directive sont des substances qui, contenues dans les produits cosmétiques de protection solaire, sont destinés spécifiquement à filtrer certaines radiations UV pour protéger la peau contre certains effets nocifs de ces radiations. Ces filtres UV peuvent être ajoutés à d'autres produits cosmétiques, dans les limites et conditions fixées à la*

*présente annexe.* » Contrairement aux monographies de la FDA, cette liste (Cf. Partie VIII.1) ne reprend pas l'oxyde de zinc qui n'est pas encore reconnu comme filtre inorganique (Directive Européenne, 1976) (Janousek, 1997 ; Levy, 2001). Il est cependant utilisé dans les produits de protection solaire pour en augmenter le FPS car il agit de la même façon que le dioxyde de titane.

Depuis 2001, le Colipa (the European Cosmetics Association), en association avec de nombreuses industries, édite des recommandations qui ont pour but d'uniformiser et de simplifier les différents tests à effectuer sur les produits solaires en Europe. Les recommandations importantes sont les suivantes (Colipa, 2009):

-un produit solaire doit protéger contre les UVA et les UVB (avec 1/3 de protection UVA). La protection contre les UVA doit être indiquée sur l'emballage à l'aide d'un logo spécial :



-le n° de FPS sur l'emballage doit être accompagné du type de protection (faible, moyenne, haute et très haute)

-le FPS doit être mesuré selon une méthode *in vivo* (Cf. Partie II.3.5.1) ou par une mesure *in vitro* qui donne un degré de protection équivalent

-les produits ayant un FPS < 6 ne peuvent pas être nommés comme protecteurs solaires

-le terme d'écran total ne peut pas être utilisé

-les instructions d'utilisation doivent être clairement indiquées sur l'emballage

☞ Australie : En raison de périodes d'intense radiation solaire et d'une prédominance de population à peau claire, l'Australie doit prendre des mesures adaptées afin de procurer une protection adéquate contre les effets délétères du soleil. Jusqu'en 1992, les filtres UV étaient déclarés comme médicaments. Depuis 1993, ils sont classés en deux catégories : les filtres UV primaires et secondaires. Les premiers ont comme fonction primaire de protéger contre les UV contrairement à la deuxième catégorie qui a pour fonction principale une approche cosmétique. En général, la nomenclature

australienne est proche de l'américaine, à quelques exceptions près. (Groves, 1997 ; Levy, 2001)

☞ Autres pays : La plupart des pays non membres de la Communauté Européenne, en Europe et ailleurs dans le monde, suivent la directive CEE. Au Japon, par exemple, les produits solaires sont aussi classés dans la catégorie des produits cosmétiques.

Il est important de consulter la législation propre à chaque pays avant de mettre sur le marché un produit de protection solaire (Levy, 2001).

Au Royaume-Uni, la protection contre les rayonnements UVA doit être indiquée sur les emballages à l'aide du système « Boots Star Rating », qui consiste à spécifier la protection contre les UVA à l'aide d'étoiles (Tableau 2) et qui est basée sur une mesure *in vitro* du rapport de protection UVA/UVB d'un produit (Poon et col. 2003).

**Tableau 2** : Classification de la protection contre les UVA au Royaume-Uni (Diffey, 1994)

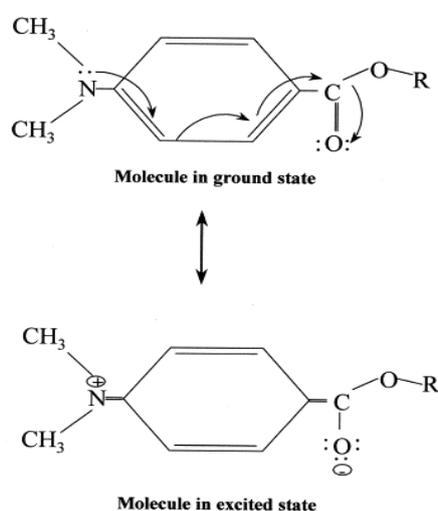
| Rapport UVA/UVB | Catégorie d'étoile | Type de protection                                  |
|-----------------|--------------------|---|
| 0,0 à < 0,2     | -                  | Trop basse pour pouvoir indiquer une protection UVA |
| 0,2 à < 0,4     | *                  | Modérée   |
| 0,4 à < 0,6     | **                 | Bonne   |
| 0,6 à < 0,8     | ***                | Supérieure  |
| ≥ 0,8           | ****               | Maximale  |

#### II.3.4.3 Chimie et mode d'action des filtres solaires

La relation entre leur structure chimique, leur mode d'action et leur efficacité est très étroite. Leur classification peut se faire en fonction de leur chimie ou de leur nomenclature. Il existe deux grandes catégories de filtres solaires : les filtres organiques (d'origine synthétique, aussi dénommés « filtres chimiques ») et les filtres inorganiques (d'origine minérale, appelés aussi « filtres physiques »).

### II.3.4.3.1 Filtres organiques

Ils sont, pour la plupart, d'origine synthétique. Ils ont une action plus spécifique que les filtres physiques et ne sont qu'anti-UVA et/ou anti-UVB (Tableau 3). La plupart de ces filtres chimiques sont des composés aromatiques, avec des doubles liaisons conjuguées. Ils possèdent en outre un ou plusieurs groupements carbonyles associés à un substituant donneur d'électron en position ortho ou para. Cette configuration permet la délocalisation d'électron à travers la molécule (Figure 11). Cette alternance de doubles et simples liaisons crée une structure de résonance qui permet l'absorption de la faible énergie de la lumière correspondant aux radiations ultraviolettes.

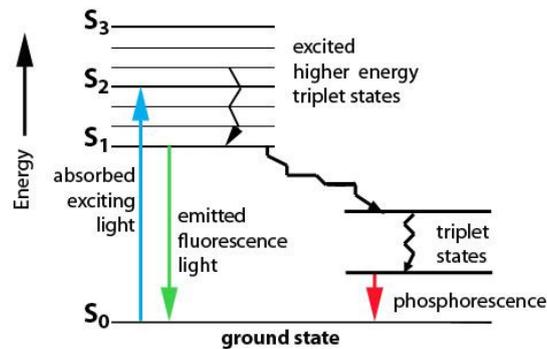


**Figure 11:** Délocalisation d'électron lors de l'absorption de radiation UV : exemple du N,N-dimethylPABA (Wolf et col., 2001 B)

Lorsque la molécule absorbe l'énergie des radiations UV, le filtre chimique passe de l'état fondamental à un état excité (Figure 12). A ce moment là, l'énergie électromagnétique est convertie en énergie chimique. Le photon en tant que tel n'existe plus et son énergie est stockée par la molécule à l'état excité. Les radiations UV absorbées sont ainsi réémises sous forme d'une radiation de plus faible énergie et donc inoffensive. Le retour à l'état fondamental peut s'effectuer de différentes façons :

- photodégradation de la molécule

- désactivation par émission de rayonnement de plus faible énergie dans l'infrarouge avec dégagement de chaleur ; dans le visible avec apparition de fluorescence ; ou dans l'ultra-violet par phénomène d'isomérisation cis-trans (Kimbrough, 1997 ; Wolf et col., 2001 B).



**Figure 12:** Diagramme d'énergie de Jablonski simplifié (Jablonski, 2009)

La plupart de ces filtres chimiques sont solubles en phase huileuse.

Ils peuvent être classés comme suit :

- ∞ Filtres UVA : les molécules reprises dans cette catégorie ont un point commun, elles sont toutes disubstituées en ortho. En effet, la délocalisation des électrons est ainsi plus facile, et requiert un niveau d'énergie plus bas qui correspond à une plus grande longueur d'onde coïncidante avec les UVA. Trois de ces molécules sont des dérivés de benzophénone. Comme elles sont substituées également en position para, elles présentent un deuxième pic d'absorption dans les UVB. Leur grand désavantage est qu'elles sont souvent responsables de réactions allergiques. Quand elles sont présentes à plus de 0,5% dans une préparation solaire cela doit être spécifié sur l'emballage par l'inscription suivante : « contient de l'oxybenzone ». Le menthyl anthranilate et le butylmethoxydibenzoylmethane sont des filtres strictement UVA.
- ∞ Filtres UVB : un des premiers filtres UVB utilisé a été l'acide p-Aminobenzoïque (PABA). Il n'est presque plus utilisé à l'heure actuelle à cause de son potentiel allergisant et de sa grande solubilité dans l'eau. Les principaux filtres UVB sont les dérivés du PABA, les esters cinnamiques, les salicylates, les dérivés du

camphre et l'acide 2-phényl benzimidazole 5-sulfonique (la seule famille soluble dans l'eau) et ses sels (Shaath et col., 1998).

**Tableau 3 :** Classification et concentrations maximales autorisées dans les produits cosmétiques des principaux filtres solaires organiques

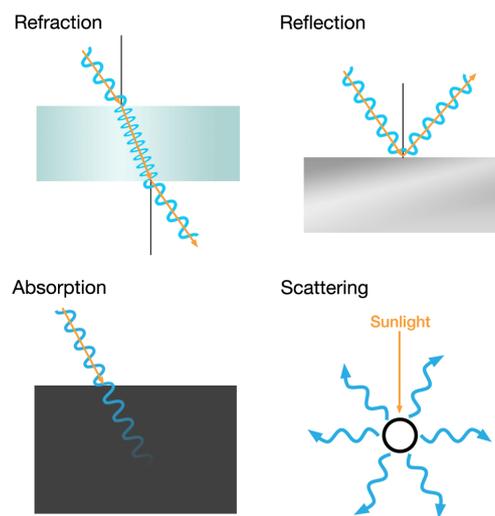
| Nom INCI (EU + USA)                            | CAS         | Einecs    | Type de filtres | Europe | USA  | Australie | Japon |
|--|-------------|-----------|-----------------|--------|------|-----------|-------|
| Benzophenone-3                                 | 131-57-7    | 205-031-5 | UVA + UVB       | 10%    | 6%   | 10%       | 5%    |
| Benzophenone-4                                 | 4065-45-6   | 223-772-2 | UVA + UVB       | 5%     | 10%  | 10%       | 10%   |
| Benzophenone-8                                 | 131-53-3    | 205-026-8 | UVA + UVB       | -      | 3%   | 3%        | -     |
| 3-Benzylidene Camphor                          | 1507-24-8   | 239-139-9 | UVB             | 2%     | -    | -         | -     |
| Benzylidene Camphor Sulfonic acid              | 56039-58-8  | -         | UVB             | 6%     | -    | 6%        | -     |
| Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine | 187393-00-6 | -         | UVB+UVA         | 10%    | -    | -         | -     |
| Butyl Methoxydibenzoylmethane                  | 70356-09-1  | 274-581-6 | UVA             | 5%     | 3%   | 5%        | 10%   |
| Ethylhexyl Dimethyl PABA                       | 21245-02-3  | 244-289-3 | UVB             | -      | 8%   | -         | -     |
| Ethylhexyl Methoxycinnamate                    | 5466-77-3   | 226-775-7 | UVB             | 10%    | 7,5% | 10%       | 20%   |
| Ethylhexyl Salicylate                          | 118-60-5    | 204-263-4 | UVB             | 5%     | 5%   | 5%        | 10%   |
| Homosalate                                     | 118-56-9    | 204-260-8 | UVB             | 10%    | 15%  | 15%       | 10%   |
| Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate     | 302776-68-7 | 443-860-6 | UVA             | 10%    | -    | -         | -     |
| Isoamyl p-methoxycinnamate                     | 71617-10-2  | 275-702-5 | UVB             | 10%    | -    | 10%       | -     |
| 4- Methylbenzylidene camphor                   | 36861-47-9  | 253-242-6 | UVB             | 4%     | -    | 4%        | -     |
| Methylene Bis-Benotryzoyl                      | 103587-45-1 | -         | UVB+UVA         | 10%    | -    | -         | -     |
| Octocrylene                                    | 619721-30-4 | 228-250-8 | UVB             | 10%    | 10%  | 10%       | 10%   |
| PABA   | 150-13-0    | 205-753-0 | UVB             | 5%     | 15%  | 15%       | 4%    |
| Phenylbenzimidazole Sulphonic Acid             | 27503-81-7  | 248-502-0 | UVB             | 8%     | 4%   | 4%        | 3%    |

#### II.3.4.3.2 Filtres inorganiques

Ce sont des filtres minéraux. Ils sont représentés par l'**Oxyde de Zinc** (ZnO) et le **Dioxyde de Titane** (TiO<sub>2</sub>). Ils ont été les premiers filtres à être utilisés, surtout par les gardes côtes et les autres professionnels nécessitant une importante protection. Cependant, leur utilisation par les autres consommateurs a été longtemps limitée car leur opacité leur procurait une apparence cosmétique non acceptable. Depuis les années 1990, les formes dites « micronisées », c'est-à-dire sous formes finement pulvérisées, de ces deux oxydes sont apparues et leur utilisation par le grand public est devenue plus populaire. En effet, la diminution de la taille de ces pigments dans la gamme du nanomètre diminue leur interaction avec la lumière visible, ce qui leur permet d'avoir un aspect transparent. De plus, la micronisation ne diminue pas la capacité des oxydes à bloquer les rayons ultraviolets. En effet, la granulométrie optimale à partir de laquelle les oxydes deviennent transparents (0,2 µm) permet de diminuer considérablement la diffraction de la lumière visible tout en conservant une bonne capacité à diffracter les rayons UV. Le TiO<sub>2</sub> opaque a en général une taille particulaire moyenne comprise entre 150 et 300 nm tandis que les autres formes qui donnent des produits non opaques se situent entre 20 et 150 nm, ce qui atténue de façon optimale les UVB. Les particules de ZnO sous forme pigmentaire ont une taille comprise entre 200 et 400 nm, tandis que leur taille optimale pour bloquer les UV se situe entre 20 et 100 nm pour les formes micronisées. Il faut cependant éviter de diminuer la taille en-dessous de 20 nm afin d'éviter toute pénétration cutanée des nanoparticules.

Cependant, ces formes doivent rester sous forme micronisée et l'apparition d'agglomérats doit être évitée afin de minimiser une augmentation de l'interaction avec la lumière et ainsi éviter une diminution de l'efficacité contre les UV (Fairhurst et col., 1997 ; Mitchnick et col., 1999). Les formes non micronisées assurent une protection solaire par réflexion et diffusion du rayonnement UV, contrairement aux formes micronisées qui diffractent et absorbent la lumière (Dunford et col., 1997) (Figure 13). Il faut cependant ne pas négliger le risque potentiel des nanoparticules lors de leur utilisation dans les produits cosmétiques. Cependant, de nombreuses études ont montré que les nanoparticules insolubles (comme le TiO<sub>2</sub> et le ZnO) ne

pénètrent pas la barrière cutanée, si la limite de taille inférieure de 20 nm n'est pas dépassée. De plus, les résultats de tests *in vivo* ne révélaient pas de toxicité pour ces deux oxydes. Les effets toxiques qui pouvaient survenir lors d'études *in vitro* étaient surtout dus à une exposition des cellules à des concentration excessives en TiO<sub>2</sub> et Zn (Nohynek et col., 2008).



**Figure 13:** Réfraction, réflexion, absorption et diffraction de la lumière  
(Photoprotection, 2009)

Comme les oxydes métalliques sont semi-conducteurs, lors de l'absorption des radiations UV, ils peuvent former des paires d'ions qui vont s'adsorber à la surface des oxydes et réagir avec l'eau ou d'autres substances pour former des espèces d'oxygène réactif. Il a ainsi été établi que les capacités photocatalytiques du TiO<sub>2</sub> peuvent avoir un certain nombre d'actions négatives sur les tissus vivants (au niveau de la perméabilité membranaire des cellules, intégrité de l'ADN, de l'ARN et des protéines). Afin d'éviter au maximum les effets néfastes de ces oxydes, la plupart sont enrobés pour diminuer ces interactions. Il est donc important de vérifier qu'ils ne pénètrent pas à travers le stratum corneum pour éviter qu'ils réagissent avec les tissus vivants (Wamer et col., 1997 ; Sakai et col., 1994). Les oxydes métalliques ne sont donc pas totalement inertes chimiquement.

Ces filtres minéraux sont souvent associés à des filtres organiques car ils présentent une synergie d'action avec ceux-ci, ce qui permet d'obtenir des FPS plus

élevés. De plus, ils sont moins allergisants que les filtres chimiques. L'Oxyde de Zinc a une action anti-UVA et anti-UVB et le Dioxyde de Titane est anti-UVB avec une très faible action anti-UVA (Popov et col., 2005).

### **II.3.5 Les indices de protection anti UV**

#### **II.3.5.1 Anti UVB : Le facteur de protection solaire (FPS)**

Il permet de définir l'efficacité des produits solaires en donnant une échelle de valeur comprise de tous. Il est défini comme le rapport de l'énergie nécessaire pour produire l'érythème minimum détectable d'une peau protégée par rapport à une peau non protégée :

$$\text{FPS} = \frac{\text{Dose érythémateuse minimale en zone protégée}}{\text{Dose érythémateuse minimale en zone non protégée}} \quad \mathbf{(4)}$$

La dose érythémateuse minimale (DEM) est la dose minimale d'énergie apportée par les rayons UV nécessaire pour produire une réaction érythémateuse par unité de surface de peau humaine lors d'une exposition au soleil en extérieur (Katsambas et col. 1991).

Le Colipa (The European Cosmetic Association) a accepté et révisé, en 2006, un protocole de mesure du FPS. Ce protocole est aussi valable pour la législation japonaise, américaine et sud-africaine.

Ce protocole est le suivant : une portion de peau non exposée, comme le bas du dos par exemple, est soumise à des doses connues de rayons UV. La lampe est déplacée tous les cm<sup>2</sup> pour soumettre la peau à des doses croissantes et connues d'UV. Le jour suivant, le patient retourne se faire examiner et la mesure de l'intensité des érythèmes est effectuée. La quantité nécessaire d'exposition pour générer un érythème détectable est ainsi déterminée.

Le jour d'après, le produit solaire est appliqué, en quantité connue et uniformément, puis séché pendant 15 min. Le sujet est ensuite exposé aux UV avec des temps de plus en plus longs. Le volontaire doit se faire examiner 24h après. Le FPS est ensuite calculé à l'aide du rapport entre la dose érythémateuse minimale en zone protégée et la dose érythémateuse minimale en zone non protégée.

Comme ce sont surtout les UVB qui sont à l'origine des coups de soleil et des érythèmes, la mesure du FPS est avant tout une mesure de la protection contre les UVB (CTFA, 2006). Il existe ainsi une classification (Tableau 4) des produits solaires en fonction du FPS et donc de leur capacité à protéger la peau contre les UVB.

**Tableau 4 :** Classification des produits solaires en fonction du FPS

| <b>Catégorie indiquée</b> | <b>FPS indiqué</b> | <b>FPS mesuré</b> |
|---------------------------|--------------------|-------------------|
| « Faible protection »     | 6                  | 6-9,9             |
|                           | 10                 | 10-14,9           |
| « Protection moyenne »    | 15                 | 15-19,9           |
|                           | 20                 | 20-24,9           |
|                           | 25                 | 25-29,9           |
| « Haute protection »      | 30                 | 30-49,9           |
|                           | 50                 | 50-59,9           |
| « Très haute protection » | 50+                | > 60              |

#### II.3.5.2 Anti UVA

Jusque dans les années 1980, les spécialistes s'intéressaient essentiellement aux protections anti-UVB car les rayonnements UVB sont responsables des dommages visibles et rapides causés par le soleil. A partir de ce moment-là, les recherches ont montré les dangers (non visibles) que représentaient les UVA. Chaque continent a ainsi développé ses propres méthodes pour évaluer l'efficacité des produits solaires contre les UVA.

Il y a un protocole de mesure anti-UVA approuvé pour chaque continent :

- ∞ Les USA : la FDA suggère l'utilisation des méthodes de Gange et Lowe basées sur la mesure des DEM après exposition de la peau, protégée ou non, aux UVA (Gange et col., 1986 ; Lowe et col., 1987).
- ∞ Le Japon : la JCIA (Japanese Cosmetic Industry Association) a développé une méthode d'évaluation de l'efficacité anti-UVA. Pour cela elle a proposé l'utilisation d'un nouveau rapport qui détermine le facteur de protection contre les UVA (FPA) qui est basé sur le noircissement de la peau juste après l'exposition solaire. Ce facteur est égal au rapport entre la dose minimale d'UV provoquant une pigmentation noire permanente avec protection solaire et la dose minimale d'UV provoquant une pigmentation noire permanente sans protection solaire. Si un produit offre une protection contre les UVA mais pas contre les UVB, il ne peut pas avoir comme dénomination : UV Protection. Pour cette raison, les 2 facteurs : le FPS et le FPA doivent être indiqués sur l'emballage.
- ∞ L'Union Européenne : la réglementation est régie par le Colipa. La méthode préconisée est la même que celle utilisée au Japon.
- ∞ L'Australie : les produits solaires sont soumis à la réglementation de la TGA (Therapeutic Goods Administration) qui délivre une licence spéciale donnant l'autorisation de fabriquer des produits de protection solaire. Pour pouvoir revendiquer une protection UVA, les produits doivent démontrer une absorption d'au moins 90% des UVA. Il existe 3 méthodes qui sont approuvées pour déterminer la protection anti-UVA, en fonction de la composition du produit de départ, elles sont toutes basées sur la mesure du pourcentage de transmission du produit. Les différentes méthodes sont les suivantes :
  - la méthode solution : adaptée aux produits qui se dissolvent dans des solvants adaptés à la spectroscopie
  - la méthode du film : adaptée aux produits opaques qui réfléchissent la lumière et absorbent les UV. Elle requiert l'utilisation d'une cellule de quartz spéciale pour pouvoir avoir le produit sous forme d'un film de 8 mm d'épaisseur

- la méthode de la plaque : adaptée à toutes les formules, y compris celles qui contiennent des particules telles que le Dioxide de Titane et l'Oxyde de Zinc.

## **II.4 Les aérosols**

### **II.4.1 Définition et marché des aérosols**

Le terme aérosol désigne des suspensions dans un gaz, le plus souvent l'air, de très fines particules liquides ou solides, soumises à l'action de deux types de forces : des forces de gravité qui tendent à les faire sédimenter et le mouvement brownien qui tend à rassembler les plus fines d'entre elles. La taille des particules et des gouttelettes est en général plus petite que 50  $\mu\text{m}$  et, pour les formes pharmaceutiques à usage pulmonaire, plus petites que 10  $\mu\text{m}$ . Les nuages, par exemple, sont des aérosols naturels. Par extension, le terme aérosol qui définit un état, a été appliqué au terme « générateur d'aérosol » qui fait référence à tout équipement nécessaire pour produire de façon mécanique des particules ou des gouttelettes de taille comprises entre 0,15 et 5  $\mu\text{m}$  (Rieger, 2000).



**Figure 14:** Répartition des aérosols sur le marché européen en 2008  
(Aérosol, 2009)

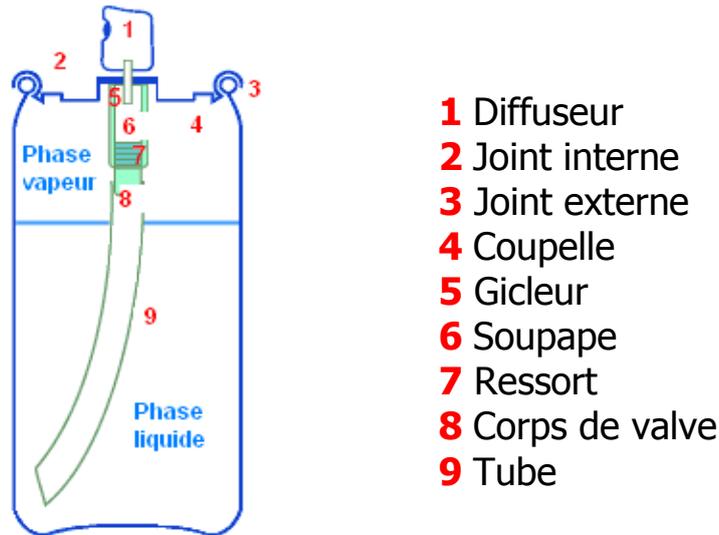
En 2008, près de 5,3 milliard d'aérosols ont été produits en Europe. La répartition en fonction de leur finalité est représentée sur la figure 14. Il est très difficile d'obtenir les statistiques exactes des produits solaires en aérosols présents sur le marché. Il est toutefois possible d'estimer leur proportion à moins de 5% de la production totale en aérosols.

Deux types de générateur d'aérosol sont employés pour les produits solaires : ceux sans gaz propulseur, communément appelés « sprays » et ceux avec gaz propulseur, communément appelés « aérosols ».

Les sprays comptent pour plus de 30% des produits solaires sur le marché (Cf. Partie II.3.3). Ils vont générer un aérosol sous l'action mécanique exercée par le consommateur sur un diffuseur relié à un levier qui active une pompe. Celle-ci active le transport du produit jusqu'à la sortie du boîtier où il va passer à travers le diffuseur. Le spray n'est pas continu et chaque pression exercée sur le diffuseur délivre une quantité définie de produit. Le travail n'ayant pas porté sur les sprays, ils ne sont donc pas exposés en détails. Les aérosols, quant à eux, sont décrits ci-dessous.

#### **II.4.2 Les différents composants**

Un produit fini en aérosol comprend : le produit, le propulseur (gaz sous forme liquide ou gazeuse), le boîtier, la valve qui est attachée à un tube plongeur et le diffuseur (Figure 15). La pression exercée par le propulseur pousse le mélange (ou le produit seul, le gaz étant miscible ou non au produit) dans le tube plongeur jusqu'à la valve. En appuyant sur le diffuseur, la valve s'ouvre et la solution ainsi que le propulseur sont expulsés. Dans le cas d'un gaz liquéfié, le propulseur agit également comme solvant du produit et permet ainsi sa pulvérisation.



**Figure 15:** Représentation schématique d'un aérosol (Aérosol, 2009 A)

#### II.4.2.1 Le boîtier

Il doit résister à toute déformation, même après un contact prolongé avec le gaz propulseur.

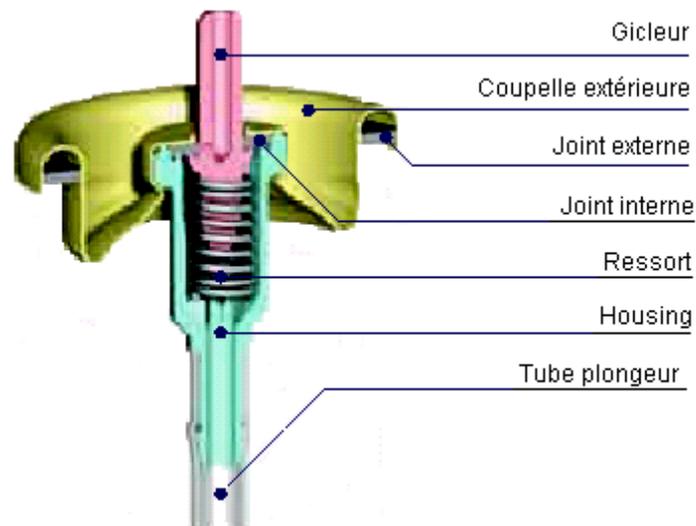
Les matériaux de choix utilisés pour leur fabrication sont les suivants : le fer blanc, l'aluminium, le verre et, dans certains pays, le polyéthylène téréphthalate. Les boîtiers en fer blanc sont reconnaissables par leur soudure, en effet, ils ne sont pas constitués d'une seule pièce. Ils ont tendance à s'oxyder plus facilement que les boîtiers en aluminium, et ce, au contact de l'air ou des produits qu'ils contiennent. Ils sont souvent protégés par un revêtement intérieur et/ou extérieur de résine époxy ou de divers polymères. Les étuis en aluminium n'ont pas de soudure mais ils coûtent plus chers. Leur principal avantage est d'être moins sujets à la corrosion.

Il existe aussi d'autres types de boîtier appelés « Bag-in-Can ». Ils sont constitués d'un sac souple qui est à l'intérieur du container et qui est rempli du produit cosmétique. Le gaz n'est alors pas en contact avec le produit car il est à l'extérieur du sac. La pression exercée sur le gaz par pression comprime le sac qui libère ensuite le produit à l'extérieur du boîtier (cf. Partie II.4.2.5.3).

### II.4.2.2 Les valves

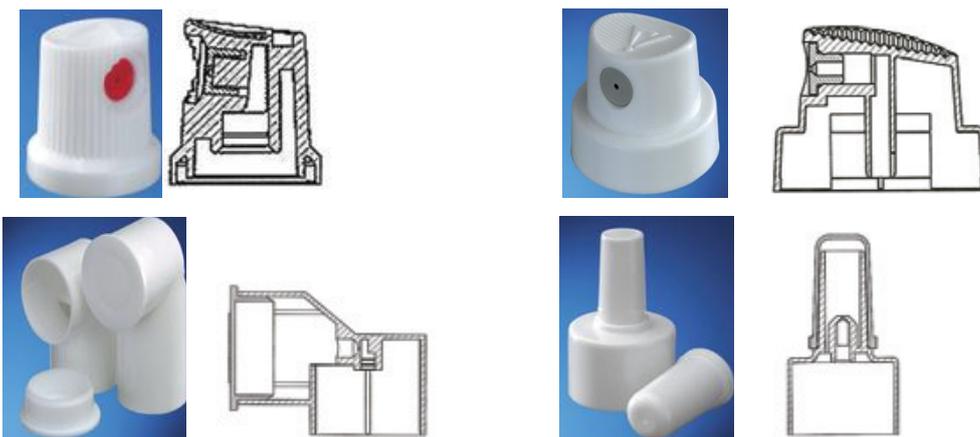
Il existe différents types de valves en fonction du produit que l'on a, du flux et de la forme du produit que l'on veut obtenir à la fin de la pulvérisation.

La figure 16 représente une valve classique. Les composants d'une valve sont les suivants : gicleur, coupelle extérieure, joints internes et externes, ressort et tube plongeur.



**Figure 16:** Schéma d'une valve (Coster, 2002)

### II.4.2.3 Les diffuseurs



**Figure 17:** Différents types de diffuseur et leur schéma (Lindal 2009)

Ils représentent le mécanisme final pour le fonctionnement d'un produit en aérosol (Figure 17). Ce sont eux qui déterminent la forme finale du produit à la sortie de l'aérosol (mousse, spray...). Ils existent avec différentes tailles d'orifice.

#### II.4.2.4 Les gaz propulseurs

Le principe de dispensation d'un produit sous pression est le suivant : la pression exercée lors de l'activation sur le diffuseur ouvre une valve qui va provoquer l'expansion du propulseur contenu dans le boîtier. Ceci force le produit à remonter par le tube plongeur jusqu'à la sortie du boîtier. Le propulseur est un gaz liquéfié ou comprimé.

##### II.4.2.4.1 Les différents gaz utilisés

Ils peuvent être liquéfiés ou comprimés. Les gaz liquéfiés sont préférés car la pression au sein du récipient ne diminue pas au cours de l'utilisation. En effet, dès qu'une fraction du produit a été vaporisée, une partie du gaz liquéfié s'évapore et prend la place du volume resté libre, de sorte que la pression interne reste constante au cours du temps, pour autant qu'il subsiste encore une petite quantité de gaz liquéfié.

**Les gaz comprimés** : les plus couramment utilisés sont  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  et  $\text{N}_2$ . Leurs avantages sont qu'ils ne sont pas toxiques, qu'ils ne coûtent pas chers et qu'ils n'ont pas d'effets néfastes sur la couche d'ozone. Cependant, le  $\text{CO}_2$  peut avoir un effet de corrosion sur le boîtier. De plus, les aérosols peuvent perdre jusqu'à 50% de leur pression au cours de l'utilisation.

**Les gaz liquéfiés** : les plus communs sont les hydrocarbures et le diméthylether (DME).

- ∞ Les hydrocarbures : on utilise en général un mélange de propane, butane et isobutane (appelé aussi LPG), dont les concentrations sont respectivement les suivantes : 27% de propane et 73% de butane/ isobutane. Ils ont l'avantage

de ne pas être corrosifs pour les métaux, ils sont solubles dans de nombreux solvants organiques et ils sont plus appropriés pour les phases à tendance grasses, car ils sont apolaires.

- ∞ Le diméthyléther : sa solubilité dans l'eau le rend attractif pour travailler avec des systèmes à haute teneur en eau. Il n'est pas corrosif mais comme il est utilisé surtout avec des systèmes aqueux, c'est l'eau présente dans le milieu qui attaque les parois du boîtier.

**Les chlorofluorocarbones** (CFC) ont été les gaz liquéfiés les plus utilisés pendant de nombreuses années car ils présentent une faible toxicité pour les voies pulmonaires, une bonne stabilité chimique et une faible inflammabilité. Néanmoins, suite au protocole de Montréal de 1991 sur les gaz à effet de serre, ils sont interdits car ils contribuent à la destruction de la couche d'ozone et ont donc un impact négatif sur l'environnement (Smith et col., 2005).

#### II.4.2.4.2 Rappel des lois physiques

Tous les générateurs d'aérosol sont des systèmes pressurisés et contiennent du gaz. Celui-ci occupe l'espace libre du boîtier dans lequel il exerce sa pression, permettant ainsi au produit de sortir de l'emballage après ouverture de la valve.

Les gaz liquéfiés et comprimés montrent presque la même activité qui peut être décrite, en grande partie, à partir de la théorie de la cinétique des gaz et de différentes lois les caractérisant.

Les paramètres importants qui décrivent les gaz sont les suivants :

- le volume change considérablement avec la température et la pression
- les gaz n'ont pas de volume ou de forme propre, ils prennent la place que le conteneur leur procure
- ils sont miscibles avec les autres gaz, ils sont pourvus de faible densité et viscosité

##### *II.4.2.4.2.1 Théorie de cinétique des gaz*

Cinq principes importants sont à prendre en considération (Arnaud, 2002) :

1. Les gaz sont composés de très petites molécules de taille et de poids identiques. Ceux-ci diffèrent en fonction du gaz. Ces molécules sont parfaitement élastiques et ne perdent pas de vitesse lorsqu'elles rentrent en collision.
2. Ces molécules sont soumises principalement à l'action de deux types de forces: le mouvement brownien et les forces de Van der Waals (interactions électromagnétiques).
3. Les gaz ont une énergie qui leur est propre et qui se manifeste par une augmentation de leur température.
4. Lorsque le gaz est comprimé, la pression à l'intérieur du boîtier augmente car les molécules s'entrechoquent en permanence.
5. La pression augmente avec la température (de manière plus prépondérante pour les gaz liquéfiés).

Différentes lois sur les gaz ont été élaborées à partir de ces considérations.

#### *II.4.2.4.2.2 Gaz comprimés : Loi des gaz parfaits*

Elle s'exprime de la façon suivante : (Arnaud, 2002)

$$PV=nRT \quad (5)$$

P= Pression (Pa)

V= Volume (litre)

T= Température absolue (°K)

R= constante des gaz parfaits=  $8,314472 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

n = Quantité de matière (mole)

La plupart des gaz s'éloignent de cette loi car ils ne sont pas toujours composés de molécules parfaitement élastiques. Ainsi, la loi de Van Der Waals corrige cette imperfection en ajoutant un facteur correcteur à l'équation des gaz parfaits.

Cette loi est très importante afin de déterminer la quantité de gaz que l'on peut incorporer dans le boîtier, la pression à l'intérieur du conteneur après avoir dispensé une certaine quantité de produit et quelle est la pression une fois que tout le produit a été délivré. Cette loi s'applique pour les gaz comprimés.

#### *II.4.2.4.2.3 Gaz liquéfiés : Loi de Raoult*

Les gaz liquéfiés peuvent être considérés comme des liquides volatiles dont les mélanges peuvent être considérés comme des solutions. La pression de vapeur de la solution est dépendante de la tendance des molécules à passer de l'état liquide à l'état gazeux. La loi de Raoult concerne la pression de vapeur de solutions parfaites qui dépend de la pression de vapeur de chaque constituant pris individuellement. Elle s'exprime comme suit :

$$p_A = n_A p_A^0 \quad (6)$$

$p_A$  = pression de vapeur partielle de A

$p_A^0$  = pression de vapeur de A pur

$n_A$  = fraction molaire du constituant considéré

Ceci exprime le fait que lorsque les gaz propulseurs sont solubles ou miscible avec la phase liquide de l'aérosol, une diminution de la tension de vapeur du propulseur est observée. La diminution de pression est proportionnelle à la fraction molaire (Atkins, 2004).

#### *II.4.2.4.2.4 Solubilité des gaz*

##### **Gaz comprimés**

Le **coefficient de Bunsen** peut être utilisé afin de calculer la solubilité d'un gaz dans un solvant comme l'eau par exemple. Par définition, la solubilité de Bunsen est

le nombre de litre de gaz à 0°C et 760 mmHg qui se dissout dans un litre de solvant à cette même pression et à une température spécifique.

Le **coefficient d'Ostwald**, lui, peut être utilisé afin de déterminer la pression totale d'un système comportant un gaz comprimé. Il est défini comme le rapport du volume de gaz dissout et du volume total de liquide à une température et une pression données. Ce coefficient a comme avantage qu'il ne varie pas en fonction de la pression mais de la température.

Ces coefficients sont utiles pour calculer la quantité de gaz qui peut être incorporée dans le produit fini (Sciarra, 1974).

### ***Gaz liquéfiés***

Le comportement des gaz liquéfiés comme solvant dans d'autres substances peut être apparenté à une solution de mélange de liquides où le gaz est considéré comme solvant et l'autre substance comme un soluté. La loi de Raoult va alors s'appliquer pour les liquides parfaits et des déviations apparaissent pour les liquides non parfaits. En général, pour les composés polaires, la solubilité augmente et elle diminue pour les composés non polaires ou semi polaires. L'augmentation de solubilité est attribuée aux forces attractives en présence (liaison hydrogène, solvation...). Ces forces qui peuvent apparaître forme la « pression interne ».

Pour être liquéfié, un gaz doit se trouver en dessous de sa température critique et la pression doit être assez grande pour provoquer sa liquéfaction. Celle-ci va donc dépendre de la pression de vapeur qui est définie comme la pression existante au point d'équilibre entre la phase vapeur et la phase liquide. Cette pression est indépendante de la quantité mais dépendante de la température et de la pression atmosphérique.

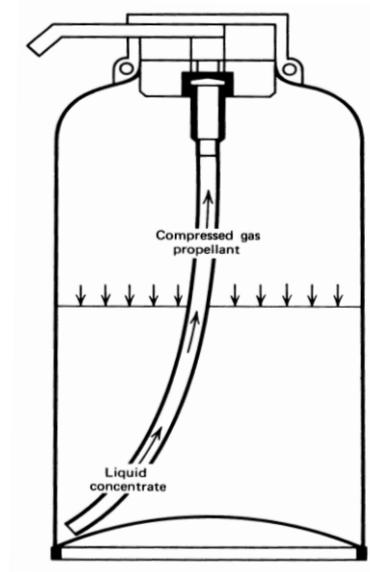
#### II 4.2.5 Les différents systèmes d'aérosol

Il existe deux types d'aérosols : les homogènes et les hétérogènes, ils sont fonction de la miscibilité du propulseur avec le produit. De plus, des différences

existent aussi en fonction du type de pulvérisation produite ou de la description physique du produit fini.

#### II 4.2.5.1 Les gaz comprimés

∞ **Les gaz insolubles** sont incorporés dans des systèmes qui n'ont pas besoin d'être secoués avant utilisation (Figure 18). Si l'on procède ainsi, cela provoque une dispersion du gaz insoluble dans le produit et provoque une perte trop importante de gaz. Les produits dispensés par ce système doivent avoir un écoulement libre. Lorsque la valve est pressée, le gaz pousse le produit en dehors de celle-ci. Si le produit est semi-solide, il va sortir tel quel, contrairement à un liquide qui sortira sous forme de spray (Sanders, 1974).



**Figure 18:** Système d'aérosol conditionné avec un gaz comprimé insoluble (Sanders, 1974)

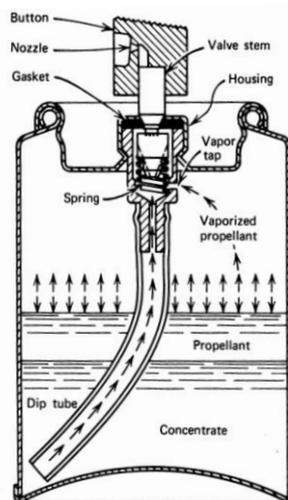
∞ **Les gaz solubles** présentent comme avantage d'être solubles dans les produits et ainsi de donner un réservoir de propulseur. Lorsque le produit est dispensé, il sort sous forme de très fines gouttelettes car le gaz se détend lorsqu'il est à l'air libre. Comme la pression diminue en même temps que le produit est dispensé, une partie du gaz sort du produit et restaure partiellement la pression interne originale (Sanders, 1974).

∞ **La production de mousse** peut être réalisée par l'utilisation d'un gaz soluble ( $\text{NO}_2$  ou  $\text{CO}_2$ ) ou d'un mélange des deux gaz, et d'une émulsion. Le mélange des deux gaz est préféré, car ils possèdent ainsi des caractéristiques physico-chimiques complémentaires pour permettre la sortie du produit sous forme de mousse (Sanders, 1974 ; Abram et Tomlinsen, 2001).

#### II 4.2.5.2 Les gaz liquéfiés

La pression sera constante tout au long de la durée de vie de l'aérosol car lorsque le gaz va se détendre, la phase vapeur de celui-ci va combler la perte de phase liquide de gaz.

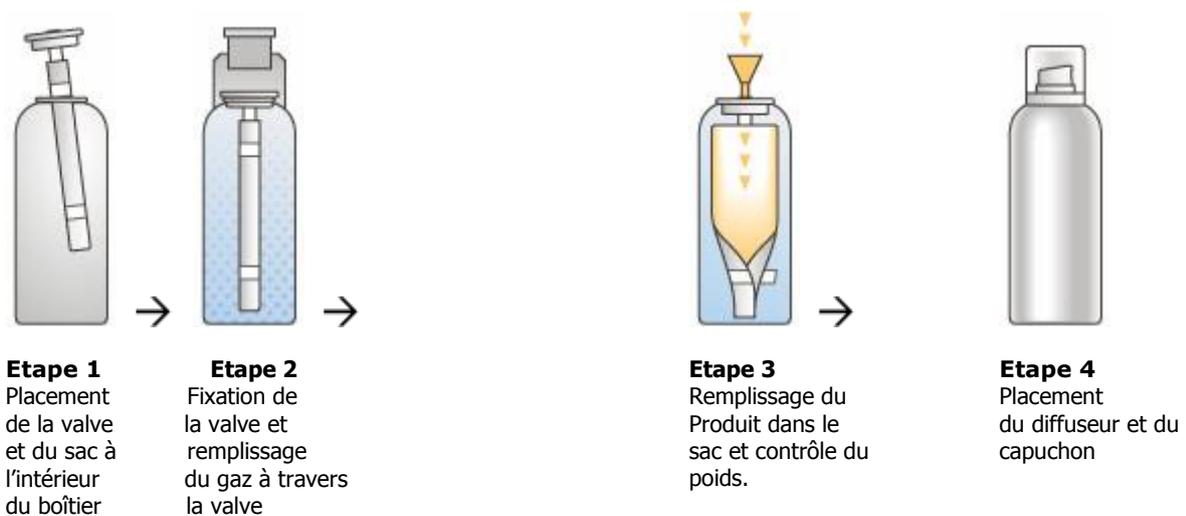
∞ **Les systèmes solution** consistent en deux phases distinctes : une liquide et une vapeur (Figure 19). Lorsque la valve est pressée, un mélange d'ingrédient, de solvant et de propulseur est émis dans l'atmosphère. Le gaz s'évapore dans l'air et provoque une fine pulvérisation des ingrédients et des solvants.



**Figure 19:** Système d'aérosol conditionné avec un gaz liquéfié, système solution (Sanders, 1974)

- ∞ **Les systèmes suspension** sont indiqués pour les substances qui sont insolubles dans le propulseur ou lorsque les cosolvants ne sont pas désirés. Lorsque la valve est pressée, la suspension est émise dans l'air et est suivie d'une rapide vaporisation du propulseur faisant apparaître alors une fine dispersion des actifs.
- ∞ **Les systèmes émulsionnés** désignent les aérosols où l'eau et le propulseur ne sont pas miscibles. Le produit est alors stabilisé à l'aide de surfactants et il sort du boîtier sous forme de mousse ou de spray. Il existe des systèmes triphasés qui sont formés de la solution aqueuse qui contient les ingrédients actifs à l'état solide et du propulseur. Les systèmes de mousse contiennent une grande partie de propulseur qui peut faire partie de la phase non miscible ou qui est inclus dans la phase interne (Sanders, 1974).

#### II.4.2.5.3 Les systèmes de séparation entre propulseur et produit



**Figure 20:** Principales étapes de remplissage des aérosols avec le système bag on valve (Bag on valve, 2009)

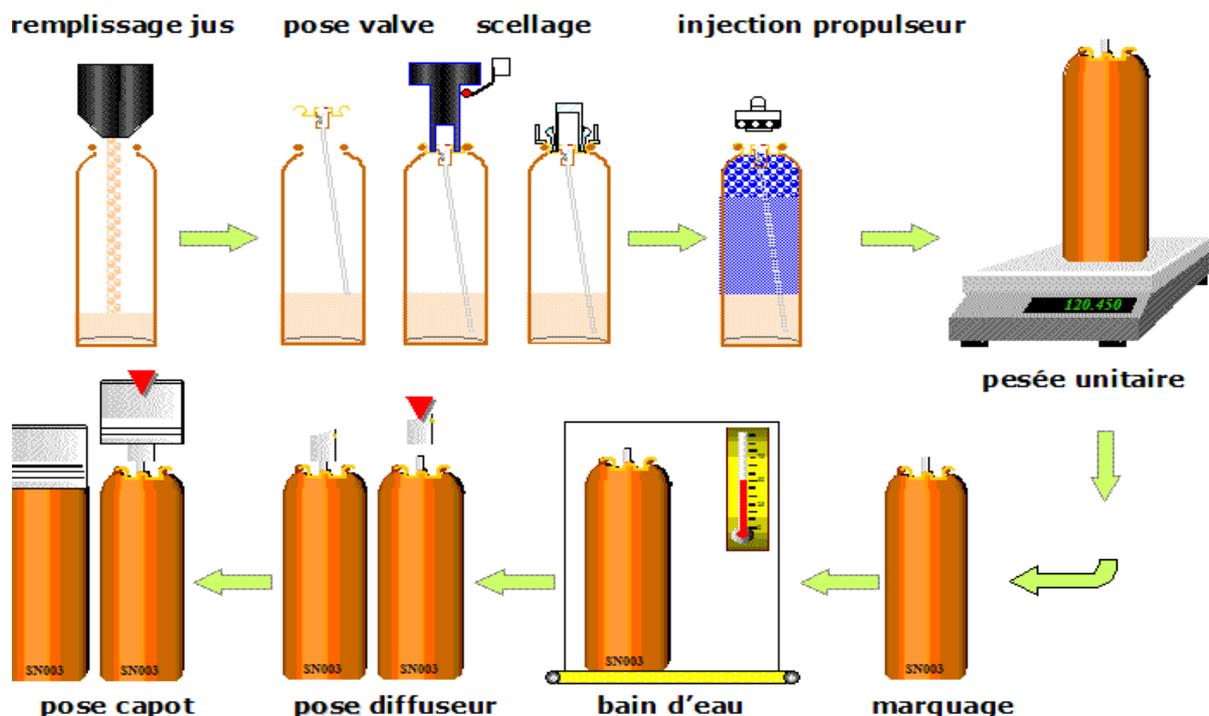
Ces systèmes permettent de séparer le propulseur du produit. Ainsi, les inconvénients liés à l'utilisation des gaz en mélange avec les produits ne sont plus gênants. Plusieurs systèmes existent mais le plus utilisé est le système « bag in can ». Il se présente avec un sac flexible rattaché à la valve à l'intérieur du boîtier (Figure 20). Le produit est dans le sac et le gaz propulseur à l'extérieur du sac.

Lorsqu'une pression est exercée sur la valve, le gaz comprimé se détend et exerce ainsi une pression sur le sac qui fait sortir le produit de l'aérosol. Il n'y a pas de gaz libéré dans l'air.

### **II.4.3 Remplissage des aérosols**

Après avoir sélectionné le boîtier, la valve et le diffuseur (qui sont différents en fonction du produit que l'on a au départ), le produit actif et le gaz diffuseur, le remplissage d'un aérosol s'effectue en plusieurs étapes (Figure 21):

- Opération de soufflage d'air et aspiration permettant d'éliminer les poussières et débris à l'intérieur du boîtier
- Remplissage avec le produit actif
- Pose et fixation de la valve
- Sertissage de la valve
- Remplissage avec le gaz propulseur
- Ajout du diffuseur
- Ajout du capuchon



**Figure 21:** Les différentes étapes du conditionnement en aérosol (Aérosol , 2009 B)

Seulement 3 techniques de remplissage sont pratiquées en industrie : le remplissage sous vide, le remplissage sous pression et le remplissage à froid. Ces 2 dernières méthodes sont basées sur les deux principes de base de liquéfaction des gaz, à savoir sur l'augmentation de pression à des valeurs supérieures à la tension de vapeur des gaz à température ambiante et sur l'abaissement de température en dessous du point de liquéfaction des gaz.

- Remplissage sous vide : le produit est incorporé dans le container vide à température ambiante. Ensuite, la valve est posée sur l'ouverture du boîtier et la tête de remplissage est abaissée pour pouvoir sertir la valve par la suite. Après avoir légèrement remonté la valve, un vide se crée dans le haut du boîtier et le gaz est injecté à ce niveau-là. Finalement, la valve est sertie et la tête de remplissage s'éloigne. C'est une technique rapide mais qui provoque une grande perte de gaz qui n'est alors plus disponible.
- Remplissage à froid : la solution de matières actives et le propulseur liquéfié sont refroidis séparément à une température légèrement inférieure au point d'ébullition du composé le plus volatil. Le propulseur liquéfié prélevé dans son container d'origine est emmené dans les boîtiers où il est introduit en quantité exacte (en poids). Les valves sont ensuite mises en place et serties immédiatement. Ce procédé ne convient pas pour les produits sensibles au froid et en particulier aux émulsions qui risquent de se casser ou d'être prises en masse.
- Remplissage sous pression : ce procédé peut être appliqué à tous les types d'aérosols. Après mise en place de la valve sur le boîtier, l'air enfermé dans le récipient est évacué, le plus souvent au moyen d'une pompe à vide puis le gaz est introduit sous pression à travers l'orifice des valves jusqu'à ce que les quantités nécessaires aient été distribuées.

#### **II.4.4 Les tests à effectuer**

De nombreux contrôles sont à effectuer sur les aérosols une fois qu'ils ont été fabriqués :

- contrôles d'inflammabilité : surtout pour les aérosols à base de butane et de propane. Le test d'extinction de flamme est le plus connu. Il consiste à projeter, d'une distance de 5 cm, un jet d'aérosol sur la flamme d'un bec bunsen et d'observer le comportement du retour de flamme.
- contrôles de vaporisation : ils portent sur la mesure du débit des valves, la quantité de produit délivré en une seule fois, la forme du jet.
- contrôles de vieillissement : ils sont destinés à l'étude de la corrosion des récipients et des éléments des valves, au maintien de la pression interne et les caractéristiques de vaporisation sont également effectués. Ces essais se font normalement sur des récipients conservés à 40°C pendant 3 mois et après 6 mois à 1 an sur des récipients conservés à 25°C.
- contrôle d'étanchéité : On procède par simple pesée des récipients. Ceux qui perdent plus de 2,5 % de leur poids par an sont considérés comme non étanches.
- contrôle d'immersion : il consiste à immerger les récipients à tester dans un bain-marie chauffé à une température de 50°C pendant 10 min et à observer la non apparition de bulles qui confirme l'étanchéité du récipient.
- contrôle de la dimension des gouttelettes: ces tests sont effectués à l'aide d'une technique utilisant la diffraction laser.

## **III.BUT DU TRAVAIL**

### **III. But du travail**

---

---

Depuis le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle, l'exposition d'un nombre croissant de personnes au soleil est une conséquence de plus en plus fréquente du mode de vie et surtout des loisirs. Une prise de conscience des dangers du soleil sur la santé humaine a accru les recherches sur le développement de nouveaux produits de protection solaire.

Le but du travail a été de développer et d'évaluer de nouvelles formulations d'aérosols pour des produits solaires à haute concentration en filtres UV valables pour le marché européen. Pour ce faire, des émulsions à phase grasse externe ont été sélectionnées (E/H et E/Si) afin d'être incorporées dans des aérosols contenant des gaz propulseurs liquéfiés. L'association de filtres organiques et inorganiques était une condition supplémentaire lors de la formulation des produits. En effet, les produits solaires en aérosol ne sont pas très présents sur le marché européen essentiellement pour deux raisons :

- Difficulté de réalisation des formulations : en effet, pour pouvoir être mis en aérosols, les produits doivent présenter une certaine fluidité et avoir une viscosité basse. Ce qui n'est pas facile à mettre en œuvre pour des émulsions qui contiennent de grandes quantités de filtres solaires, et surtout de filtres minéraux car ils ont tendance à sédimenter au cours du temps et ainsi à déstabiliser l'émulsion qui pourra montrer une séparation de phase.
- Coût de ces produits : ceux-ci reviennent plus chers que des formulations classiques. Cette augmentation du prix est surtout due aux emballages ainsi qu'à la fabrication, ceux-ci étant plus sophistiqués et plus compliqués que pour des produits standards.

L'évaluation de l'influence de différents paramètres (concentration en gaz, viscosité...) sur la taille des gouttelettes générées était un objectif supplémentaire

afin d'évaluer la sécurité des produits et d'éviter ainsi une éventuelle inhalation pulmonaire.

L'évaluation de la sécurité au niveau cutané des produits formulés, qui contiennent de grandes quantités en filtres solaires, organiques et inorganiques, était l'étape suivante de l'étude. Une expérimentation *in vitro* de pénétration cutanée a donc été envisagée afin de vérifier que ces concentrations élevées en filtres solaires restent à la surface de la peau. En effet, il est important d'évaluer le potentiel de pénétration cutanée de ces filtres solaires pour éviter d'éventuels effets néfastes. De plus, afin d'avoir une efficacité maximale, il est préférable que les filtres UV restent à la surface de la peau. Afin de diminuer le temps des analyses, des méthodes analytiques pour l'analyse simultanée des filtres solaires organiques d'une part et inorganiques d'autre part ont dû être mises au point.

Les résultats de cette étude *in vitro* devaient être ensuite confirmés par une étude *in vivo* sur des volontaires humains. Cette étude permet de vérifier si une bonne corrélation entre les expériences *in vivo* et *in vitro* est possible.

Le dernier objectif de ce travail était de formuler des nanoparticules lipidiques afin d'encapsuler un des filtres solaires utilisés dans les formulations. En effet, l'Ethylhexyl Methoxycinnamate (EMC), qui est un des filtres UVB le plus utilisé à l'heure actuelle dans les produits de protection solaire se dégrade sous l'effet des rayonnements UV. La protection vis-à-vis de ceux-ci est donc envisagée par la formulation de nanoparticules lipidiques.

## **IV.MATERIEL ET METHODES**

## **IV. Matériel et méthodes**

### **IV.1 Matériel**

#### **IV.1.1 Choix des matières premières pour l'émulsion E/H**

Le tableau 5 résume les matières premières utilisées lors de la mise au point de l'émulsion E/H. Comme ce sont des formules destinées au marché européen, les noms INCI pour les Etats-Unis ne sont pas repris.

##### ↪ Solvant phase interne

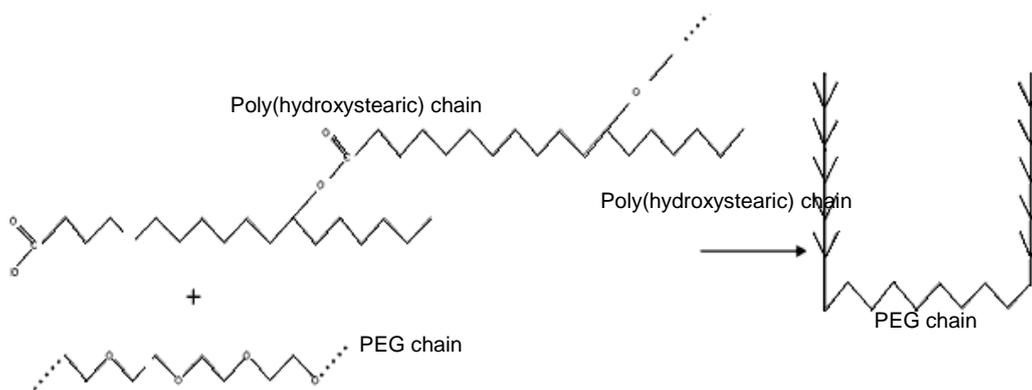
##### Eau déminéralisée (INCI EU : Aqua)

Elle est le solvant principal de la phase interne. C'est une phase sensible car elle est propice au développement de différents micro-organismes dont les moisissures. C'est pour cela que des agents conservateurs sont utilisés afin d'éviter leur croissance.

##### ↪ Tensio-actif

##### Arlacel™ P135 (INCI EU : PEG-30 Dipolyhydroxystearate)

C'est un émulsifiant E/H (Figure 22), utilisé pour les crèmes et les lotions, qui a la propriété de formuler des émulsions de faible viscosité. Celles-ci présentent une bonne stabilité aux changements de température. Sa concentration usuelle d'utilisation se situe entre 1 et 2%. Il peut aussi être utilisé dans les émulsions E/Si pour aider à stabiliser les émulsions.

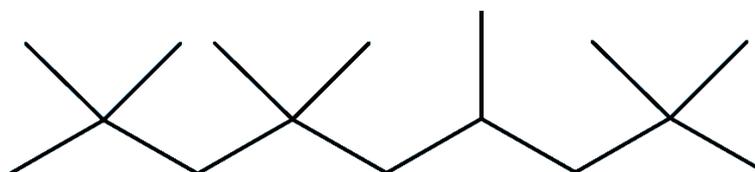


**Figure 22 :** Structure chimique de l'Arlancel™ P135 (Tadros,2009)

↪ Emollients et phase grasse externe

Arlamol HD® (INCI EU : *Isohexadecane*)

Ce dérivé synthétique ressemble à l'huile de paraffine (Figure 23). C'est donc un hydrocarbure qui est insoluble dans l'eau et qui forme, comme l'huile de paraffine, une barrière lipophile qui va éviter l'évaporation de l'eau et donc garder l'hydratation de la peau en évitant ainsi son dessèchement. Il présente l'avantage d'être moins comédogène que l'huile de paraffine. Il possède de bonnes propriétés d'étalement. De plus, les préparations qui contiennent de l'Arlamol HD® ont un meilleur toucher que les préparations qui ne contiennent que de l'huile de paraffine. Cette huile synthétique ne possède pas de groupements hydroxyles, contrairement aux huiles végétales. Elle est donc moins polaire et montrera moins d'interactions avec les autres constituants et donc une meilleure stabilité.



**Figure 23 :** Structure chimique du principal isomère de l'isohexadecane (Ineos, 2006)

**Tableau 5 : Résumé des matières premières utilisées pour la fabrication de l'émulsion E/H**

| Nom Commercial           | INCI EU   | Fabricant                                 | N° CAS  | FONCTION                                    |
|--------------------------|---|---|---|---|
| Arlacel P 135®           | PEG-30 Dipolyhydroxystearate  | Croda International Plc (Goole, RU)       | -   | Emulsifiant                                 |
| Arlamol HD®              | Isohexadecane   | Croda International Plc (Goole, RU)       | 4390-04-9   | Emollient/ Phase grasse externe             |
| Nexbase® 2004 et 2006 FG | Hydrogenated Polydecene   | Neste Oil N.V (Keilaranta, Finlande)      | 25189-70-2  | Emollient/ Phase grasse externe             |
| Crodamol AB®             | C12-15 Alkylbenzoate  | Croda International Plc (Goole, RU)       | 68411-27-8  | Phase grasse externe/Booster FPS            |
| DC 245 Fluid®            | Cyclomethicone  | Dow Corning (Seneffe, Belgique)           | 69430-24-6  | Emollient/ Phase grasse externe             |
| Huile arachide           | Arachis Hypogaea Oil  | Bertin (France)                           | 8002-03-7   | Phase grasse externe-Emollient              |
| Lanette 16®              | Cetyl Alcohol   | Certa (Braine l'Alleud, Belgique)         | 36653-82-4  | Facteur de consistance-phase grasse externe |
| Arlamol E®               | PPG-15 Stearyl Ether  | Croda International Plc (Goole, RU)       | 25231-21-4  | Emollient/ Phase grasse externe             |
| Chlorure de sodium       | Sodium Chloride   | Certa (Braine l'Alleud, Belgique)         | 7647-14-5   | Electrolyte                                 |
| Sulfate de magnésium     | Magnesium Sulfate   | Certa (Braine l'Alleud, Belgique)         | 7487-88-9   | Electrolyte                                 |
| Uvinul® A+B              | Ethylhexyl Methoxycinnamate, Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate   | BASF (Ludwigshafen, Allemagne)            | 5466-77-3<br>302776-68-7  | Filtre organique anti-UVA et UVB            |
| Escalol®557              | Ethylhexyl Methoxycinnamate   | ISP (Wayne, Etats-Unis)                   | 5466-77-3   | Filtre organique anti-UVB                   |
| Escalol®507              | 2-Ethylhexyl Dimethyl PABA  | ISP (Wayne, Etats-Unis)                   | 21245-02-3  | Filtre organique anti-UVB                   |
| Tinosorb™M               | Methylene Bis-benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol   | Ciba Specialties Chemicals (Bale, Suisse) | 103587-45-1   | Filtre organique anti-UVA                   |
| Tinosorb™S               | Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine  | Ciba Specialties Chemicals (Bale, Suisse) | 187393-00-6   | Filtre organique anti-UVA                   |
| Solaveil®CT-10 W         | Aqua, Titanium Dioxide, Isodeceth-6, Oleth-10 Alumina, Aluminium Stearate, Simethicone, Diazolodinyl Urea, Propylene Glycol, Methylparaben, Propylparaben | Croda International Plc (Goole, RU)       | 13463-67-7/9004-99-2/<br>1344-28-1/7047-84-9/80<br>50-81-5/78491-02-8/57-<br>55-6/<br>99-76-3/94-13-3 | Filtre inorganique anti-UVB et UVA          |
| Z Cote®Max               | Zinc Oxide, Diphenyl Capryl Methicone   | BASF (Ludwigshafen, Allemagne)            | 1312-13-2/827036500   | Filtre inorganique anti-UVA et UVB          |
| Rhodicare®T              | Xanthan Gum   | Rhodia Food (Aubervilliers, France)       | 11138-66-2  | Viscosifiant                                |
| EDTA dissodique          | Dissodium EDTA  | Merck (Darmstadt, Allemagne)              | 139-33-3  | Chélatant                                   |
| Propylene Glycol         | Propylene Glycol  | Certa (Braine l'Alleud, Belgique)         | 57-55-6   | Humectant                                   |
| Paratrexine®             | Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, Propylparaben   | MGS Micropure (Newport, RU)               | 122-9-6/99-76-3/<br>120-47-8/94-26-8  | Conservateur                                |
| Vanirea®                 | Propylene Glycol, Aqua, Vanilla tahitensis Extract  | Cep-Solabia groupe (Pantin, France)       | 57-55-6<br>94167-14-3   | Ingrédient actif/Protecteur solaire         |
| Vitamine E Acetate       | Tocopheryl Acetate  | BASF (Ludwigshafen, Allemagne)            | 7695-91-2   | Ingrédient actif/Antioxydant                |
| Ronacare®bisabolol       | Bisabolol   | Merck (Darmstadt, Allemagne)              | 515-69-5  | Ingrédient actif/Hydratant                  |

Nexbase 2006 et 2004 FG<sup>®</sup> (INCI EU : *Polydecene*)

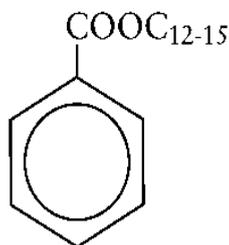
Les Nexbases sont formées de polydécènes hydrogénés (Figure 24). Ils sont préconisés pour formuler des laits semi-fluides. Le dernier chiffre du numéro qui suit le nom, correspond à la viscosité (en mm<sup>2</sup>/s) et au type de polydécène. En effet, il existe les qualités suivantes : 2004, 2006 et 2008 dans l'ordre croissant de viscosité. Dans un premier temps la 2006 a été retenue car elle est aussi utilisée dans l'industrie alimentaire, il y a ainsi un facteur de sécurité en plus. L'avantage d'un tel produit est qu'il est synthétique et donc de qualité égale et plus facilement contrôlable d'une production à l'autre. Ces substances sont photo-stables car elles sont saturées et elles ne forment pas de radicaux libres, ce qui est un atout supplémentaire dans une formulation de produit solaire (Lohman, 1999).



**Figure 24** : Structure chimique d'un polydécène (Pubchem, 2009)

Crodamol AB<sup>®</sup> (INCI EU : *C12-15 Alkylbenzoate*)

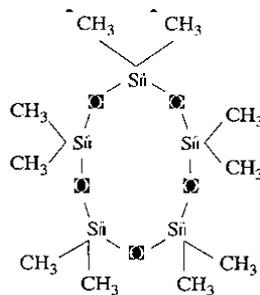
C'est un ester liquide transparent (Figure 25). Il possède un toucher très sec et non gras. C'est un bon solubilisant des composés huileux et des filtres solaires. Il mouille très bien les poudres. Il a été souvent remarqué qu'il augmente le FPS quand il est utilisé en même temps que des filtres solaires organiques. Les concentrations conseillées se situent entre 1 et 5%.



**Figure 25** : Structure chimique du C12-15-Alkylbenzoate (Hughes et col., 2006)

### DC<sup>®</sup> 245 Fluid (INCI EU: Cyclomethicone)

C'est un polydiméthylcyclosiloxane volatil principalement composé de cyclométhicone (Figure 26). Contrairement aux autres produits fluides utilisés en cosmétique, les silicones fluides ne refroidissent pas la peau en s'évaporant. Cette caractéristique est la conséquence de leur chaleur de vaporisation qui est exceptionnellement basse. Comme les autres silicones, il est utilisé pour améliorer le toucher de la formulation, il diminue le toucher collant et il n'est pas gras (Dow Corning, 2002).



**Figure 26** : Structure chimique de DC<sup>®</sup>245 fluid

### Huile d'arachide (INCI EU : Arachis Hypogea Oil)

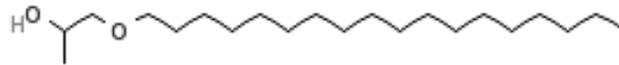
Cette huile végétale possède des propriétés antioxydantes et une capacité à agir contre les brûlures. De plus, c'est une huile alimentaire. Cette caractéristique permet d'augmenter la sécurité finale du produit fini (Edrees et col, 2008).

### Lanette 16 (INCI EU : Cetyl Alcohol)

Ce facteur de consistance est composé de mélange d'alcools gras solides (essentiellement en C16). Il est utilisé comme facteur de consistance et de stabilisation et son point de fusion est compris entre 48 et 56°C. Il doit donc être chauffé pour pouvoir être incorporé à la phase grasse.

### Arlamol E<sup>®</sup> (INCI EU : PPG-15 Stearyl Ether)

Cette huile synthétique est utilisée comme émoullient et comme phase grasse externe (Figure 27). Elle a été utilisée dans les premières formulations, mais a été rejetée par la suite.



**Figure 27** : Structure chimique du PPG-15 Stearyl Ether

### ↪ Les électrolytes

#### Sulfate de magnésium (INCI EU : Magnesium Sulfate)

Il sert à stabiliser la viscosité dans le temps de l'émulsion. Il est efficace à des concentrations allant de 0,5 à 1,0%.

#### Chlorure de sodium (INCI EU : Sodium Chloride)

Il sert à faire résister l'émulsion contre les fortes températures. Il est efficace aux mêmes concentrations que le sulfate de magnésium.

### **Remarques** : Mécanisme d'action des 2 électrolytes

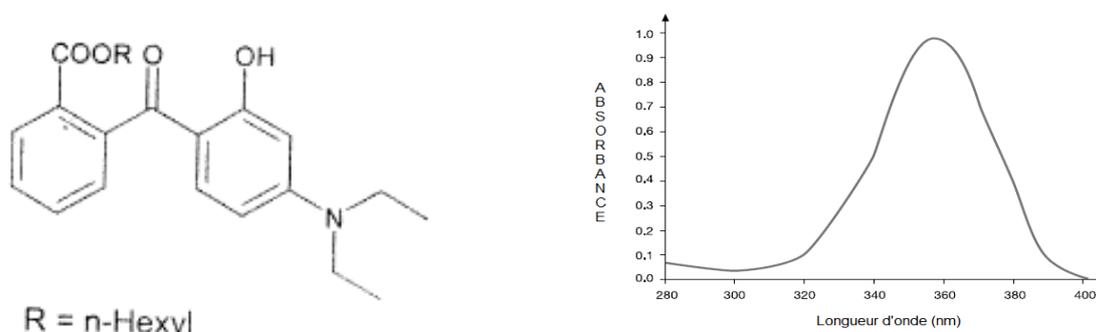
Ils ont tendance à consommer les molécules d'eau qui solvatent les polymères utilisés. Il y a donc une désolvatation des polymères qui sont fortement solvatés au départ. C'est l'effet « salting out » qui conduit au rapprochement des macromolécules.

De plus, il y a aussi un effet électro-visqueux qui consiste en un rapprochement des chaînes de macromolécules par neutralisation des charges qui provoquent le déploiement des chaînes. La répulsion va diminuer avec la présence des électrolytes et on assiste à la floculation du polymère. Attention, s'il y a trop d'électrolytes, le polymère précipite dans le milieu et par conséquent la viscosité diminue et il peut alors se produire une séparation de phase (Attwood, 1983).

### **Filtres solaires organiques**

Uvinul A+B (INCI EU : *Ethylhexyl Methoxycinnamate, Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate*)

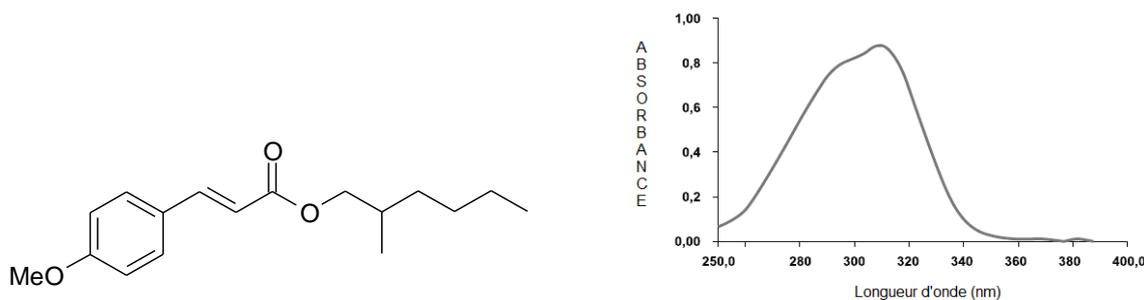
C'est une dispersion de Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate (Figure 28) (anti-UVA, à 35%) dans de l'Ethylhexyl Methoxycinnamate (Figure 29) (anti-UVB, à 65%). Il est facilement dispersible dans une large gamme d'huiles cosmétiques et de solvants. Il est efficace contre les UVB et les UVA (Klein et col, 1998).



**Figure 28** : Structure chimique et spectre d'absorption du Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate (0,4 mg/ml d'éthanol) (BASF, 2009)

Escalol<sup>®</sup> 557 (INCI EU : *Ethylhexyl Methoxycinnamate=EMC*)

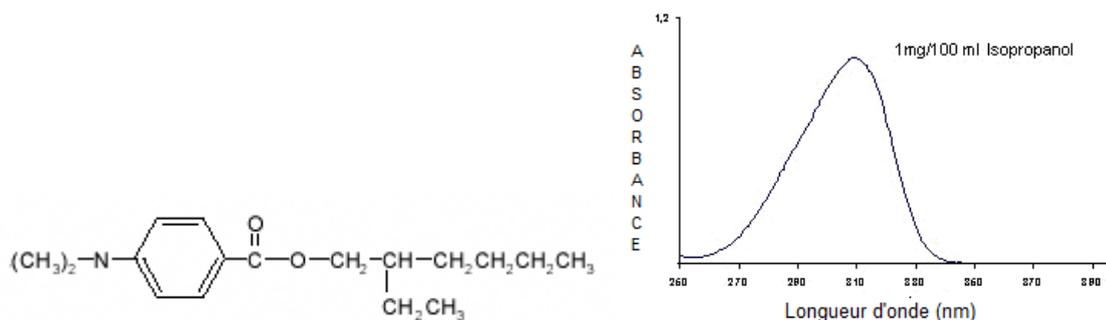
C'est un filtre anti-UVB, soluble dans les phases huileuses (Figure 29). C'est un des filtres UVB le plus utilisé à l'heure actuelle dans la plupart des produits de protection solaire (Klein, 1997).



**Figure 29** : Structure chimique et spectre d'absorption de l'EMC (0,4 mg/ml d'éthanol) (BASF, 2009)

Escalol<sup>®</sup> 507 (INCI EU : 2-Ethylhexyl Dimethoxy PABA)

C'est un filtre anti-UVB (Figure 30), soluble dans les phases huileuses, chimiquement inerte, non coloré, non odorant et souvent utilisé en association avec l'Escalol<sup>®</sup>557 (Klein, 1997).



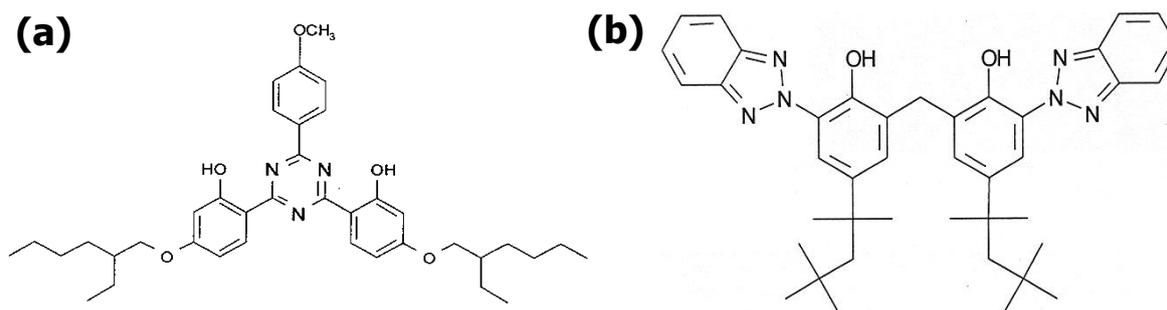
**Figure 30** : Structure chimique et spectre d'absorption de l'Escalol<sup>®</sup> 507

Tinosorb<sup>™</sup>S (INCI EU : Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine)

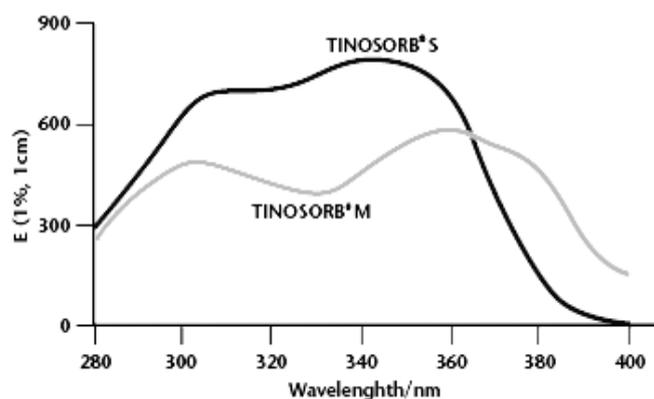
C'est un filtre anti-UVA (Figures 31(a) et 32). Il se présente sous forme de poudre dispersible dans les phases huileuses. Il est photostable, facile à utiliser et a un effet synergique avec les filtres solaires anti-UVB. La concentration d'utilisation recommandée est de 5%. Il a un effet synergique avec le Tinosorb M (Mongiat et col., 2003).

Tinosorb<sup>™</sup>M (INCI EU Methylene Bis Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol)

C'est une dispersion aqueuse à 50% de filtre anti-UVA (Figures 31(b) et 32). Sa concentration d'utilisation est de 15% maximum. Il est dispersible dans l'eau et insoluble dans les phases huileuses (Ciba, 2004).



**Figure 31:** Formule du Tinosorb<sup>®</sup> S (a) et du Tinosorb<sup>®</sup> M (b) (Ciba, 2006)

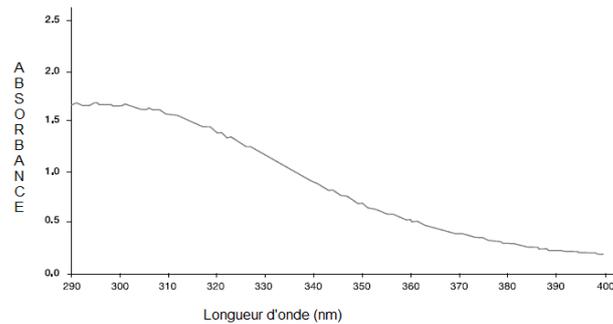


**Figure 32:** Spectres d'absorption UV des Tinosorb<sup>®</sup> M et S (1% dans l'isopropanol) (Ciba, 2009)

### **Filtres solaires inorganiques**

Solaveil<sup>®</sup> CT 10W (INCI EU : Aqua, Titanium Dioxide, Isodeceth-6, Oleth-6, Alumina, Aluminium Stearate, Simethicone, Diazolodinyl Urea, Propylene Glycol, Methylparaben, Propylparaben)

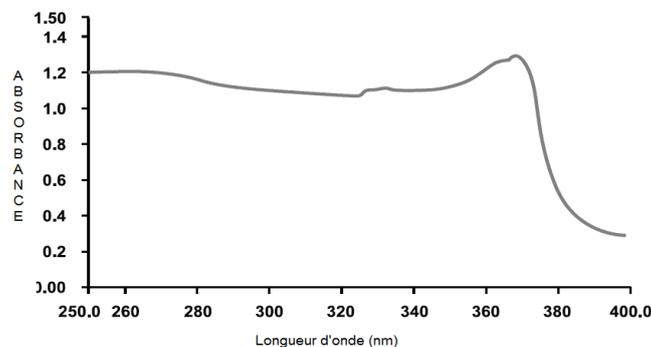
C'est une dispersion aqueuse de Dioxyde de Titane nanoparticulaire. La distribution particulaire est étroite ce qui permet d'optimiser la transparence sur la peau. La taille moyenne des particules est de l'ordre de 0,1 µm. La concentration en TiO<sub>2</sub> représente 50% du produit, qui est sous forme pâteuse. Les dispersions aqueuses sont préférées car elles procurent une meilleure sécurité vis-à-vis d'une toxicité potentielle (Bennat et Müller-Goymann, 2000).



**Figure 33:** Spectre d'absorption d'une dispersion de 15% de dioxyde de titane dans la vaseline (BASF, 2009)

Z-Cote® max : (INCI EU : Zinc Oxide, Diphenyl Capryl Methicone)

C'est un filtre à la fois anti-UVA et anti-UVB (Figure 34). Il se présente sous forme de poudre blanche facilement dispersible dans les phases lipophiles, car il est enrobé de méthicone. De plus, ce type d'enrobage permet de résister aux forts cisaillements et il possède une bonne compatibilité avec les autres matières premières (Seu-Salerno, 2006). Il est très finement pulvérisé sous forme de particules de diamètre moyen de 0,2 µm. Ceci correspond à une forme non micronisée et opaque de ZnO. Cependant, il est employé par la suite à une concentration (1%) qui ne permet pas de rendre le produit fini opaque sur la peau.



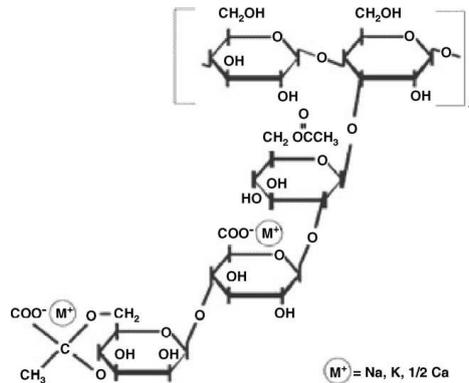
**Figure 34:** Spectre d'absorption d'une dispersion de 5% d'oxyde de zinc dans la vaseline (BASF, 2009)

↪ Autres

Rhodicare® T (INCI EU : Xanthan Gum) (Muguet, 2006)

La gomme xanthane est constituée de chaînes de polysaccharides composées de glucose, mannose et d'acide glucuronique (Figure 35). Elle se disperse dans l'eau

froide sous agitation importante pour éviter la formation de grumeaux. C'est un hydrocolloïde qui a une action viscosifiante.



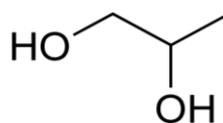
**Figure 35:** Structure chimique de la gomme xanthane (Rosalam et col., 2006)

#### EDTA dissodique (INCI EU : Dissodium EDTA)

C'est un agent chélatant. Il a pour rôle de complexer les cations présents éventuellement dans l'eau et sur la peau afin de stabiliser le produit final.

#### Propylène glycol (INCI EU : Propylene Glycol)

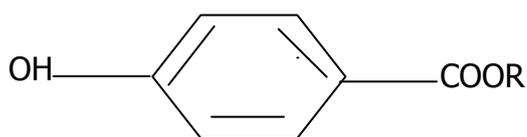
C'est un solvant hygroscopique (Figure 36) qui permet d'aider à la solubilisation des ingrédients actifs dans la phase aqueuse.



**Figure 36 :** Structure chimique du propylène glycol

#### La Paratrexine<sup>®</sup> (INCI EU : Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, Propylparaben) (Sharon, 1998)

C'est un agent conservateur.



**Figure 37** : Formule générale des parabènes (avec R= Methyl, Ethyl, Propyl, butyl ou isobutyl)

Les différents parabènes (Figure 37) présents dans ce mélange sont : Méthylparaben (15-30%), Ethylparaben (<5%), Propylparaben (<5%), Butylparaben (<5%) et Isobutylparaben (<5%). (Le phenoxyethanol y est présent à une concentration de plus de 60%).

Les parabènes sont des agents conservateurs très utilisés, en raison de leur large spectre d'action contre les champignons et les bactéries, et ceci avec de faibles concentrations.

Normalement, il n'est pas nécessaire de mettre une telle matière première dans la phase huileuse, car les microorganismes ne se développent pas dans celle-ci. Cependant, de par la solubilité différente des parabènes (solubles en phase huileuse) et du phénoxyéthanol (soluble en phase aqueuse), il a été souhaitable d'incorporer une partie de l'agent conservateur dans la phase huileuse et l'autre partie dans la phase aqueuse.

#### ↪ Ingrédients actifs

Vanirea® (INCI EU : *Propylene Glycol, Aqua, Vanilla Tahitensis Fruit Extract*)

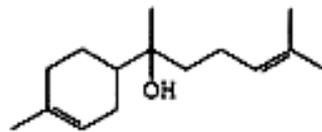
C'est un actif végétal, titré en polyphénols et riche en parahydroxybenzoate, obtenu à partir de l'extraction hydroglycolique de gousses mûres de vanille de Tahiti. C'est un actif qui va renforcer la protection solaire de la peau par l'activité de la vanilline, composé majeur de l'extrait de vanille. Celle-ci possède des propriétés anti-oxydantes, anti-mutagènes et anti-tumorales (Mourtzinou et col., 2009 ; Gustafson et col., 2000 ; Durant et col., 2003). De plus, elle apporte une odeur vanillée qui constitue une alternative aux parfums et qui va couvrir l'odeur des matières premières.

### Acétate de Vitamine E (INCI EU : Tocopheryl Acetate)

Celle-ci est soluble en phase huileuse et possède des propriétés antiradicalaires. Elle va donc protéger les huiles de la dégradation par l'air et la lumière. Elle est particulièrement utilisée pour la protection des composants insaturés des phases huileuses, des préparations pharmaceutiques et cosmétiques, vis-à-vis des détériorations oxydatives et contre la formation de radicaux libres.

### Bisabolol (INCI EU : Bisabolol)

C'est un alcool sesquiterpénique monocyclique et insaturé (Figure 38). Le Bisabolol possède des propriétés anti-inflammatoires et bactériostatiques (Jalil et col., 2003). Il a une bonne stabilité et une bonne compatibilité avec la peau. En général, il est utilisé comme agent protecteur au niveau de la peau.



**Figure 38** : Structure chimique du Bisabolol (Urzua, 2004)

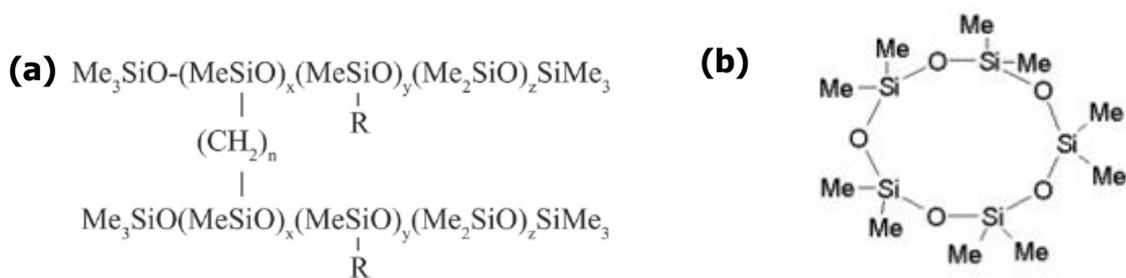
## **IV.1.2 Choix des matières premières pour l'émulsion E/Si** (Tableau 6)

↪ Eau déminéralisée (Cf. émulsion E/H)

↪ Tensioactif

### DC<sup>®</sup> 9011 (INCI EU : Cyclopentasiloxane, PEG-12 Dimethicone Crosspolymer)

C'est un tensioactif utilisé pour la formulation d'émulsion E/Si (Figure 39). Il est compatible avec les filtres solaires. Il a été choisi car il permet de réaliser des émulsions fluides (Dow Corning, 2002).

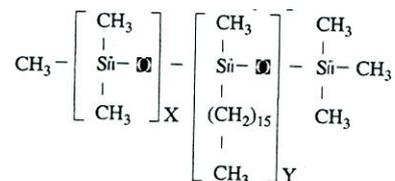


**Figure 39** : Structure chimique d'un polymère de diméthicone (a) et du cyclopentasiloxane (b) (Newton et col., 2005 ; Wacker, 2009)

↪ Phase grasse externe

DC<sup>®</sup> 2502 (*INCI EU : Dimethicone Hexadecylique*)

C'est un alkylmethylsiloxane composé de polysiloxane linéaire dont les chaînes d'alkyle sont réparties de façon aléatoire (Figure 40).



**Figure 40** : Structure chimique du DC<sup>®</sup>2509 (Dow Corning, 2002)

Il est recommandé d'utiliser le DC<sup>®</sup>2509 à des concentrations allant de 1% à 10% pour obtenir des émulsions stables (Dow Corning, 2002). Il possède des propriétés hydratantes de couches superficielles de l'épiderme et il doit être ajouté à la phase hydrophobe.

DC 245 fluid<sup>®</sup> (Cf. Emulsion E/H)

DC 5329<sup>®</sup> (*PEG-12 Dimethicone*)

Cette silicone a été utilisée comme co-émulsionnant du DC 9011<sup>®</sup>, mais il n'a été retenu pour le produit final (Cf. Partie V.1.1.2.1).

### ☞ Filtres solaires

Eusolex® UV-Pearl (INCI *EU* : *Ethylhexyl Methoxycinnamate, Silica, PVP, Chlorphenesin, BHT*)

C'est une dispersion aqueuse d'Ethylhexyl Methoxycinnamate à 37%. Elle se présente sous forme de liquide blanc visqueux dispersible dans l'eau. Le filtre est encapsulé par de la silice et du PVP pour permettre sa dispersion dans l'eau. Les concentrations utilisées sont comprises entre 1 et 28% (Merck, 2006). Il est utilisé sous cette forme dans l'émulsion E/Si car il n'est pas dispersible dans la phase siliconée lorsqu'il est utilisé tel quel. Il était donc préférable de le disperser dans la phase aqueuse afin d'éviter une déstabilisation du système.

Solaveil CT-10W, Tinosorb™M, Z-Cote Max (Cf. Emulsion E/H)

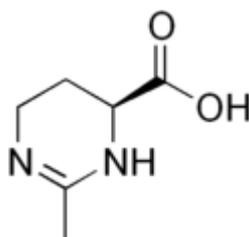
### ☞ Autre

Propylene glycol, EDTA dissodique, NaCl, Paratrexine (Cf. émulsion E/H)

### ☞ Ingrédients actifs

Ronacare® Ectoin (INCI *EU* : *Ectoin*) (Figure 41)

C'est un produit complémentaire de l'action immunoprotectrice des filtres solaires anti-UV. Elle aide à régénérer les cellules de la peau et à les protéger contre les dommages environnementaux (Buenger et Driller, 2004 ; Graf et col., 2008).



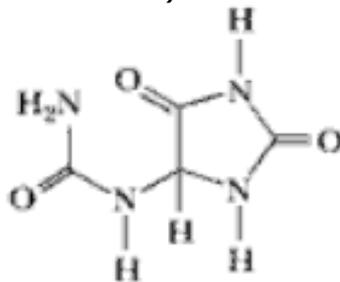
**Figure 41** : Structure chimique de l'Ectoïne (Graf et col., 2008)

Les actions de cet ingrédient actif sont les suivantes :

- prévention du dommage et de la destruction des cellules de Langerhans
- protection contre les stress oxydatifs externes
- réduction significative de la formation de coup de soleil
- diminution du dommage sur les membranes cellulaires dû au soleil.

Vitamine E acetate (Cf. Emulsion E/H)

Ronacare® Allantoïne (*INCI EU : Allantoin*)



**Figure 42:** Structure chimique de l'allantoïne (Garret et Grisham, 2000)

Son nom chimique est : Glyoxyldiuréide (Figure 42). Cette poudre cristalline se solubilise dans la phase aqueuse. Elle a un rôle émollient, protecteur et agent de conditionnement de la peau. Elle possède une bonne stabilité dans les formes hydratées qui ont un pH acide ou neutre. Par contre, elle est détruite par un chauffage prolongé de la phase aqueuse, c'est pourquoi il n'est pas recommandé de l'incorporer à la phase aqueuse lorsque celle-ci dépasse la température de 70°C. Dans notre cas, cela ne pose pas de problème car les formulations s'effectuent à froid. Son mécanisme d'action est assez complexe et reste encore mal connu. Elle a une action antiinflammatoire et joue un rôle de promoteur de prolifération cellulaire. (Lee et col., 2010). Sur une peau intacte, l'allantoïne possède une apparence soyeuse, lisse et elle maintient une peau saine. Elle est très bien tolérée et ne provoque pas d'allergie. Elle peut être utilisée à des concentrations très faibles, en effet 0,2% suffisent pour avoir de bons résultats.

**Tableau 6 : Matières premières utilisées pour l'émulsion E/Si**

| <b>Nom Commercial</b>            | <b>INCI EU</b>   | <b>Fabricant</b>                    | <b>N° CAS</b>   | <b>Fonction</b>                  |
|----------------------------------|--|-------------------------------------|---|----------------------------------|
| DC <sup>®</sup> 9011             | Cyclopentasiloxane, PEG-12 Dimethicone Crosspolymer  | Dow Corning (Seneffe, Belgique)     | 541-02-6  | Tensio actif                     |
| DC <sup>®</sup> 2502             | Cetyl Dimethicone  | Dow Corning (Seneffe, Belgique)     | -   | Phase grasse externe/Booster FPS |
| DC <sup>®</sup> 245 Fluid        | Cyclomethicone   | Dow Corning (Seneffe, Belgique)     | 541-02-6  | Phase grasse externe             |
| DC <sup>®</sup> 5329             | PEG-Dimethicone  | Dow Corning (Seneffe, Belgique)     | -   | Co-emulsifiant                   |
| Eusolex UV pearl <sup>®</sup>    | Aqua, Ethylhexyl Methoxycinnamate, Silica, PVP Chlorphenesine, BHT   | Merck (Darmstadt, Allemagne)        | 5466-77-3/9003-39-8<br>104-29-0/128-37-0  | Filtre anti-UVB                  |
| Solaveil <sup>®</sup> CT-10W     | Aqua, Titanium Dioxide, Isodeceth-6, Oleth-10, Alumina, Aluminium Stearate, Simethicone, Diazolodinyl Urea, Propylene Glycol, Methylparaben, Propylparaben | Croda International Plc (Goole, RU) | 13463-67-7/9004-99-2/13<br>44-28-1/7047-84-9/8050-<br>81-5/78491-02-8/57-55-6/<br>99-76-3/94-13-3 | Filtre anti-UVB                  |
| Tinosorb <sup>™</sup> M          | Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol  | Ciba (Bale, Suisse)                 | 103587-45-1   | Filtre anti-UVA                  |
| Z Cote <sup>®</sup> Max          | Zinc Oxide, Diphenyl Capryl Methicone  | BASF (Ludwigshafen, Allemagne)      | 1314-13-2/827036-50-0   | Filtre anti-UVA                  |
| Propylene Glycol                 | Propylene Glycol   | Merck (Darmstadt, Allemagne)        | 57-55-6   | Humectant                        |
| EDTA disssodique                 | Disodium EDTA  | Merck (Darmstadt, Allemagne)        | 139-33-3  | Chélatant                        |
| Chlorure de Sodium               | Sodium Chloride  | Merck (Darmstadt, Allemagne)        | 7647-14-5   | Electrolyte                      |
| Paratrexine <sup>®</sup>         | Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Butylparaben Isobutylparaben, Propylparaben   | MGS Micropure (New Port, RU)        | 122-9-6/99-76-3/<br>120-47-8/94-26-8/<br>4247-02-3/94-13-3  | Conservateur                     |
| Vitamine E Acetate               | Tocopheryl Acetate   | BASF (Ludwigshafen, Allemagne)      | 7695-91-2   | Ingrédient actif/Antioxydant     |
| Ronacare <sup>®</sup> Ectoine    | Ectoin   | Merck (Darmstadt, Allemagne)        | 96702-03-3  | Ingrédient actif                 |
| Ronacare <sup>®</sup> Allantoine | Allantoin  | Merck (Darmstadt, Allemagne)        | 97-59-6   | Ingrédient actif                 |

### **IV.1.3 Réactifs**

Le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN), le tétrahydrofurane (THF) et l'acide acétique (Merck, Darmstadt, Allemagne) étaient de pureté HPLC et étaient utilisés dans la phase mobile des méthodes CLHP. L'albumine de sérum de bovin (ASB) (Sigma Aldrich, Angleterre) a été utilisée lors des études de pénétration cutanée *in vitro*. L'eau milli-Q de très haute qualité était obtenue à partir d'un système de purificateur d'eau de type Synergy (Millipore, Molsheim, France) basé sur le principe de l'osmose inverse.

### **IV.1.4 Lipides et tensio-actifs utilisés pour la formulation des nanoparticules**

Les trois lipides investigués ont été les suivants : le béhénate de glycérol (Compritol<sup>®</sup> 888 ATO ; Gatefossé, St-Priest, France), l'ozokérite (Ozokerite Wax no.7726, Poth Hille, Essex, Angleterre) et la cire de tégument de riz (Rice Bran Wax # 224P (RBW) ; Koster Keunen Holland B.V, Bladel, Hollande). Les différents tensioactifs utilisés pour la préparation des nanosuspensions étaient : Poloxamer 188 (Lutrol<sup>®</sup> F68; BASF, Ludwigshafen, Allemagne), Monostéarate de sorbitane et Monostéarate de sorbitane polyoxyéthylène (Span<sup>®</sup>60 et Tween<sup>®</sup>60 (Merck, Darmstadt, Allemagne)) et Cocoamphoacétate Sodique (Miranol Ultra C32<sup>®</sup>, C.H. Erbslöh KG, Krefeld, Allemagne).

## **IV.2 Méthodes**

### **IV.2.1 Formulation des émulsions**

#### **IV.2.1.1 Le mélangeur « Silverson »**



**Figure 43** : Photographie du mélangeur

Le mélangeur Silverson L4RT (Silverson Machines Limited, Chesham, Angleterre) est utilisé pour la fabrication des émulsions (Figure 43). Il consiste en un stator et un rotor dont la grande vitesse de rotation est réglée en fonction du produit final désiré. Il permet d'obtenir des résultats constants et reproductibles. De plus, il est bien adapté aux productions à petite échelle (au niveau laboratoire).

L'anneau (Stator) utilisé est spécifiquement adapté pour la fabrication des émulsions et pour les mélanges liquide/liquide. Il comporte de multiples perforations. Il existe différents types de stators qui présentent différents modèles de perforations dont le diamètre varie en fonction du mélange que l'on veut effectuer et de la finesse de l'émulsion voulue.

Conditions expérimentales :

- Type de stator : tête pour émulsions à perforations moyennes (standard)
- Vitesse de rotation : 5000 rpm
- Volume des préparations : 300 ml
- Temps d'émulsification : 2 min

Pendant les manipulations expérimentales, nous ne travaillons pas sous vide, ce qui favorise l'incorporation d'air dans les formulations et donc une éventuelle contamination par les micro-organismes présents dans l'air. Il est évident que pour la fabrication en vrac des produits cosmétiques, envisageable pour la suite, le vide devrait être instauré et donc les contaminations microbiologiques qui peuvent éventuellement apparaître par l'air seront ainsi évitées.

#### IV.2.1.2 L'agitateur à hélice



**Figure 44:** Photographie de l'agitateur à hélice

Le modèle utilisé était un agitateur à hélice avec régulation mécanique de type RW 20 (Ika® Werke-Staufen, Allemagne). Il permet de faire l'émulsion E/Si pour laquelle des taux de cisaillement trop élevés vont empêcher la formation d'émulsion stable. Il est aussi utilisé afin de mélanger les matières premières avant l'émulsification. Plusieurs vitesses de rotation de l'hélice sont possibles : de 400 RPM pour les simples mélanges à 1500 RPM pour réaliser des émulsions (Figure 44).

Conditions expérimentales :

- Vitesse de rotation 1400 rpm
- Volume des préparations : 300 ml
- Temps d'émulsification : 40 min

#### IV.2.1.3 Le viscosimètre (modèle RV-DV-II+)



**Figure 45** : Photographie d'un viscosimètre Brookfield

Le viscosimètre utilisé est un modèle Brookfield DV-II+ (Brookfield Engineering, Middleboro, Etats-Unis) (Figure 45). Il sert à mesurer la viscosité et à déterminer le comportement des fluides lorsqu'ils sont soumis à des contraintes extérieures. La mesure de la viscosité permet donc de suivre l'évolution des produits au cours du temps ainsi que leur stabilité. Cette mesure de viscosité est un outil essentiel pour améliorer les formules et contrôler la reproductibilité d'une fabrication à l'autre.

La viscosité est le caractère de ce qui est visqueux, c'est la résistance d'un fluide ou d'un produit pâteux à l'écoulement uniforme et sans turbulence (Brookfield, 1998).

La **viscosité absolue ou dynamique**  $\eta$  est l'expression de la force tangentielle par unité de surface appelée tension de cisaillement  $\tau$  et exprimée en pascals, nécessaire pour déplacer parallèlement au plan de glissement une couche de liquide de 1 mètre carré à une vitesse de 1 mètre par seconde. La viscosité dynamique s'exprime en Pa.s.

La **viscosité cinématique**  $\nu$  s'obtient en divisant la viscosité dynamique  $\eta$  par la masse volumique  $\rho$  du liquide (exprimée en kilogrammes par mètre cube). La viscosité dynamique et la masse volumique étant mesurées à la même température. La viscosité cinématique est le plus souvent exprimée en  $\text{mm}^2/\text{s}$  ou en stokes (1 St =  $1 \text{ mm}^2/\text{s}$ ).

*Remarque:*

- Les fluides à étudier ont différentes propriétés rhéologiques qui sont décrites par des mesures de viscosité. Il existe deux catégories de fluides: les fluides newtoniens et non-newtoniens. Les fluides newtoniens ont la même viscosité à différents taux de cisaillement (c'est-à-dire à différentes vitesses). Les fluides non-newtoniens ont des viscosités différentes selon le taux de cisaillement appliqué ; ceux-ci se divisent en 2 groupes: indépendant du temps (fluide pseudo plastique) ou dépendant du temps (fluide thixotropique).

- Pour que le test de la viscosité soit reproductible sur un même produit ou sur des lots différents, il y a lieu de contrôler les points suivants:

- \* La température à laquelle est réalisé l'essai
- \* La taille du conteneur de l'échantillon à analyser
- \* Le volume de l'échantillon
- \* La tige mobile utilisée
- \* La vitesse de rotation de la tige mobile
- \* La durée de rotation de la tige mobile pour déterminer la viscosité

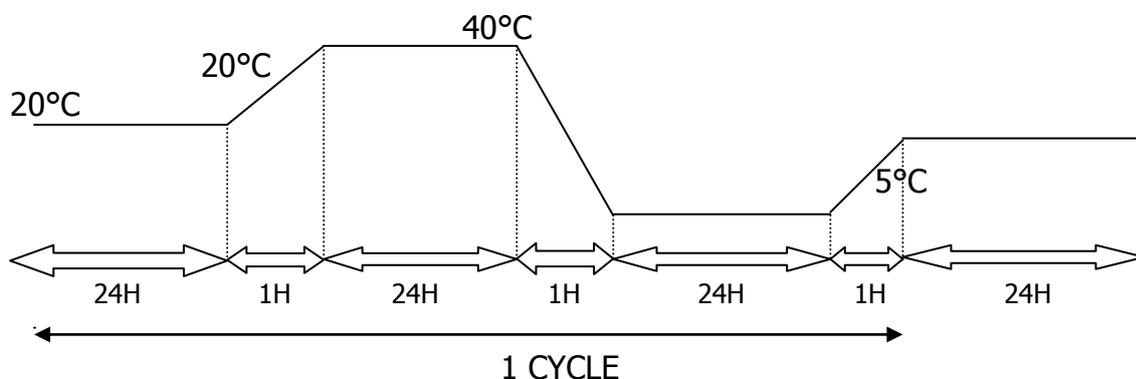
#### IV.2.1.4 L'étuve à cycle

Elle permet de suivre la stabilité de l'émulsion. La stabilité est le caractère d'un système dynamique de revenir à son état de départ après avoir été écarté par une perturbation. Un produit est considéré comme stable, s'il résiste à la décomposition, et ce, au bout d'un temps déterminé.

##### Principe de la méthode

Un échantillon du produit à analyser est placé dans un incubateur (IPP 400, Memmert - Schwabach, Allemagne) où il subit une série de 6 cycles de températures différentes.

Celles-ci doivent être situées entre 0 et 60°C, et, ici, elles sont de 5°C, 20°C et 40°C. Un cycle correspond au passage du produit par 3 températures différentes (Figure 46), chaque température étant stabilisée pendant 24 heures.



**Figure 46** : Schéma d'un cycle de température

#### IV.2.1.5 Estimation du FPS : le simulateur du groupe CIBA

Le FPS a été évalué, pour chaque formulation, par calcul, à l'aide du simulateur du groupe CIBA. Ceci est valable pour avoir une orientation au départ.

Ce programme informatique est basé sur la relation entre l'absorbance dans le spectre UV de chaque filtre, en fonction de leur concentration, et l'indice de protection. Pour la mise au point de ce simulateur, la corrélation a d'abord été

vérifiée entre la mesure du FPS in vivo et la mesure du FPS in vitro en utilisant un « step-film ». En effet, il a été démontré que l'utilisation d'un film dont la surface n'est pas uniforme est plus proche de la réalité que l'utilisation d'un film uniforme. Une étude a ensuite été réalisée sur l'absorbance dans l'UV, sur ce « step-film » des différents filtres, individuellement ou en combinaison dans des préparations (émulsions standards de FPS 4, 15 et 35). L'équation mathématique suivante permet ensuite le calcul du FPS :

$$\text{FPS} = \frac{\sum_{\lambda=290}^{400} S(\lambda) \cdot EA(\lambda)}{\sum_{\lambda=290}^{400} S(\lambda) \cdot EA(\lambda) \cdot T(\lambda)} \quad (7)$$

Avec:  $S(\lambda)$  =longueur d'onde des rayons solaires

$EA(\lambda)$  = longueur d'onde à action érythémale

$T$  = Transmission à la longueur d'onde  $\lambda$

La même méthode est appliquée pour mesurer la protection anti-UVA, en utilisant une longueur d'onde correspondant aux UVA. Elle peut ainsi être aussi utilisé afin de concevoir des produits solaires avec des performances anti-UVA spécifiques.

Ce modèle mathématique reproduit les effets synergiques induits par la présence de filtres UVA et UVB.

#### **IV.2.2 Diffraction laser : caractérisation de la taille des gouttelettes et des nanoparticules**

La diffraction laser est fondée sur la théorie de la sphère équivalente. On identifie chaque particule (ou gouttelette) à une sphère dont la mesure du diamètre nous donne une idée précise de la taille de la gouttelette ou de la particule. La méthode de mesure par diffraction laser se base sur le fait que l'angle de diffraction d'un rayon laser sur la particule est inversement proportionnel à la taille des gouttelettes ou des particules. Lorsque celles-ci traversent un faisceau de lumière monochromatique, habituellement produite par une source laser, la lumière est diffractée dans toutes les directions et est alors détectée au moyen d'un multidétecteur. Le signal reçu est alors converti en données numériques. L'intensité

de la diffraction dépend de la taille des particules ou des gouttelettes. Les particules de grande taille correspondent à une intensité importante avec un angle de diffraction faible. Une diminution graduelle de l'intensité du flux lumineux, lorsque l'on va vers des angles plus larges, caractérise des particules de petite taille (Rawle 2006 ; Kippax 2005 ; Kippax et col., 2006 ; Fracassi, 2006).

#### IV.2.2.1 Le Spraytec®

L'évaluation de la taille des gouttelettes d'aérosol générées est importante pour le développement des formulations et pour le choix des dispositifs à utiliser. Cette détermination est aussi utile pour le contrôle de qualité des produits. De plus, elle permet de vérifier que les gouttelettes ne puissent pas se déposer au niveau du tractus respiratoire.

La mesure de la taille des gouttelettes s'effectue à l'aide du Spraytec® (Malvern, Worcestershire, Royaume-Uni). Il permet de déterminer la taille des gouttelettes après pulvérisation du produit dans l'air. Ceci est très important pour définir la qualité et la reproductibilité du spray dans son domaine d'application.

Différents paramètres ont été pris en considération :

- D(0,5) : Diamètre volumétrique médian qui correspond à la valeur de part et d'autre de laquelle se trouvent 50% des particules en volume.
- D[4,3] : Diamètre volumétrique moyen qui est calculé en utilisant cette formule mathématique :  $D_{[4,3]} = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$
- % de gouttelettes en volume ayant un diamètre <10 µm
- % de gouttelettes en volume ayant un diamètre <30 µm
- % de gouttelettes en volume ayant un diamètre compris entre 10 et 20 µm.

Pour effectuer ces mesures, le Spraytec® est utilisé en mode « aérosol », ou mode ouvert (Figure 47). Le laser est ainsi à l'extérieur, ce qui permet de pulvériser l'aérosol directement au niveau du rayon. La mesure de taille se déclenche dès que le produit est pulvérisé et qu'il est détecté au niveau du laser.



**Figure 47** : Photographies du Spraytec<sup>®</sup> utilisé en mode ouvert

Résumé des paramètres de mesure :

- Position de l'aérosol par rapport au rayon laser : les distances de 1 cm et 11 cm ont été testées à une hauteur de 12 cm et à égale distance entre le détecteur et le générateur du rayon laser.
- Durée du test : 3000 ms
- Donnée d'acquisition : 1000 Hz
- Transmission : 95%
- Répétition des essais : n = 3

IV.2.2.2 Le Mastersizer 2000<sup>®</sup>

Les analyses de taille et de distribution de taille de nanoparticules lipidiques en suspension ont été effectuées à l'aide d'un diffractomètre laser de type Mastersizer 2000<sup>®</sup> (Malvern, Worcestershire, Royaume-Uni), équipé d'un système d'échantillonnage par voie humide (Hydro 2000 S) qui permet de réaliser les mesures pour les suspensions contenant ces nanoparticules. Le rayon laser unipolarisé est de type He-Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), il est utilisé en parallèle avec une source de lumière bleue ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) qui permet d'améliorer la résolution des plus fines particules. Les limites de détection de cet équipement sont comprises entre 0,02 et 2000  $\mu\text{m}$ .

Les échantillons ont été dispersés dans l'eau afin d'éviter toute solubilisation particulaire, et les diamètres des particules ont été calculés en utilisant la distribution

volumique (cinq mesures répétées trois fois pour chaque caractérisation). Afin que les particules soient bien individualisées et pour éviter la formation de tout agrégat, des ultrasons et une agitation constante sont utilisés lors des mesures. Les indices de réfraction utilisés pour les mesures étaient de 1,46 ; 1,44 et 1,47 pour le béhénate de glycérol, l'ozokérite et la cire de tégument de riz, respectivement. Le  $D(0,5)$ , et le  $D[4.3]$ , ont été les paramètres de caractérisation des particules.

### **IV.2.3 Etudes *in vitro* et méthode d'évaluation *in vivo* de la pénétration cutanée**

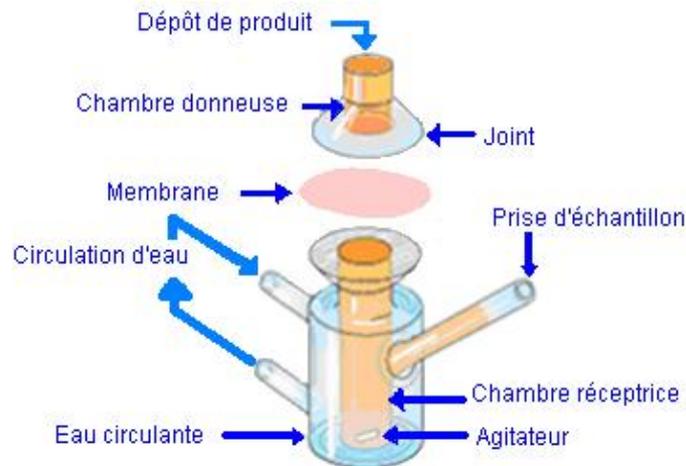
Deux méthodes ont été utilisées pour l'évaluation du potentiel de pénétration cutanée des filtres solaires contenus dans les produits solaires. Dans un premier temps, une étude *in vitro* a été conduite avec les cellules de diffusion de Franz. Dans un second temps, une étude *in vivo* sur des volontaires humains sains a été réalisée pour compléter les résultats obtenus lors de la première évaluation.

#### **IV.2.3.1 Cellule de Franz**

Les cellules de diffusion de Franz ont été utilisées pour l'étude de la pénétration cutanée des filtres solaires. Ce type de cellule consiste en un compartiment donneur supérieur, dans lequel est placé l'émulsion ou la suspension à tester, et un compartiment inférieur contenant le fluide récepteur (Figure 48). Ces deux compartiments sont séparés par une membrane (de peau excisée ou membrane artificielle). La chambre réceptrice contenait une solution constituée d'albumine de sérum de bovin (ASB) dans une solution de tampon phosphate salin (PBS), à pH 7,4, dans le but de mimer les conditions physiologiques humaines. Le fluide récepteur, d'un volume de 13,5 ml, était agité à l'aide d'un barreau magnétique à une vitesse de 500 rotations par minute (rpm) et était maintenu à une température de 37°C à l'aide d'un circuit d'eau. Ceci permettait d'obtenir une température de la membrane à  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ , qui correspond à la température cutanée dans les conditions physiologiques normales. Le diamètre de l'orifice de la chambre donneuse était de 26 mm et l'aire

de diffusion était ainsi de 5,31 cm<sup>2</sup>. Les expérimentations ont été réalisées en 6 répliques (n=6).

Le protocole expérimental est détaillé ultérieurement (Cf. Partie V.2.2.2).



**Figure 48** : Schéma d'une cellule de Franz

#### IV.2.3.2 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

##### IV.2.3.2.1 Dosage des cinq filtres organiques simultanément

Les filtres UV organiques (2-Ethylhexyl Dimethyl PABA (ED-PABA), Ethylhexyl Methoxycinnamate (EMC), Methylene Bis Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol (MBBT), Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine (BEMT), Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate (DHHB)) contenus dans les produits solaires ont été analysés par CLHP. La complexité et la difficulté d'analyser tous les filtres organiques à l'aide d'une méthode analytique unique a nécessité une mise au point et une validation qui seront détaillées dans la partie expérimentale. Cependant, les conditions générales des analyses sont résumées ci-dessous.

Appareillage : Système HP 1200 séries (Agilent technologies, Allemagne) composé de:

- Une pompe à haute pression à gradient de solvant quaternaire
- Un injecteur automatique

- Un échantillonneur
- Un four thermostatisé
- Un détecteur UV/visible DAD
- Une interface d'intégration pilotée par un logiciel d'acquisition de données (Agilent ChemStation, B.04.01)

Conditions chromatographiques pour les cinq filtres UV :

- Colonne chromatographique : Zorbax SB-CN (5 µm) 4,6 x 150 mm (Agilent technologies, Waldbronn, Allemagne)
- Colonne de garde : Zorbax SB-CN (5 µm) 4,6 x 12.5 mm
- Phase mobile : gradient de solvant (Tableau 7)
- Débit : 1,5 ml/min
- Volume d'injection : 50 µl
- Température : 30°C
- Longueur d'onde de détection : 310 et 360 nm pour les filtres UVB et UVA respectivement
- Durée d'analyse : 35 min

**Tableau 7:** Composition de la phase mobile pour l'analyse des filtres UV

| <b>Temps<br/>(min)</b> | <b>Méthanol</b> | <b>Tetrahydrofurane</b> | <b>Acétonitrile</b> | <b>H<sub>2</sub>O:Acide acétique<br/>(99,5:0,5)</b> |
|------------------------|-----------------|-------------------------|---------------------|---|
| 0                      | 35              | 10                      | 15                  | 40  |
| 8                      | 35              | 10                      | 15                  | 40  |
| 23                     | 70              | 10                      | 15                  | 5   |
| 28                     | 70              | 10                      | 15                  | 5   |
| 32                     | 35              | 10                      | 15                  | 40  |
| 35                     | 35              | 10                      | 15                  | 40  |

#### IV.2.3.2.2 Dosage de l'EMC seul (Ethylhexyl Methoxycinnamate)

Une étude a été réalisée sur l'encapsulation de l'EMC. Une autre méthode CLHP a donc été employée pour son dosage afin de diminuer le temps des analyses.

L'appareillage utilisé était le même que pour la méthode précédente.

#### Conditions chromatographiques pour l'EMC :

- Colonne chromatographique : Prevail Select C18 (5  $\mu\text{m}$ ) 4,6 x 150 mm (Alltech, Allemagne)
- Colonne de garde : Prevail C18 (5  $\mu\text{m}$ ) 4,6 x 12.5 mm
- Phase mobile : MeOH : Eau (85 : 15)
- Débit : 1 ml/min
- Volume d'injection : 50  $\mu\text{l}$
- Température : 35°C
- Longueur d'onde de détection : 310 nm
- Durée d'analyse : 10 min

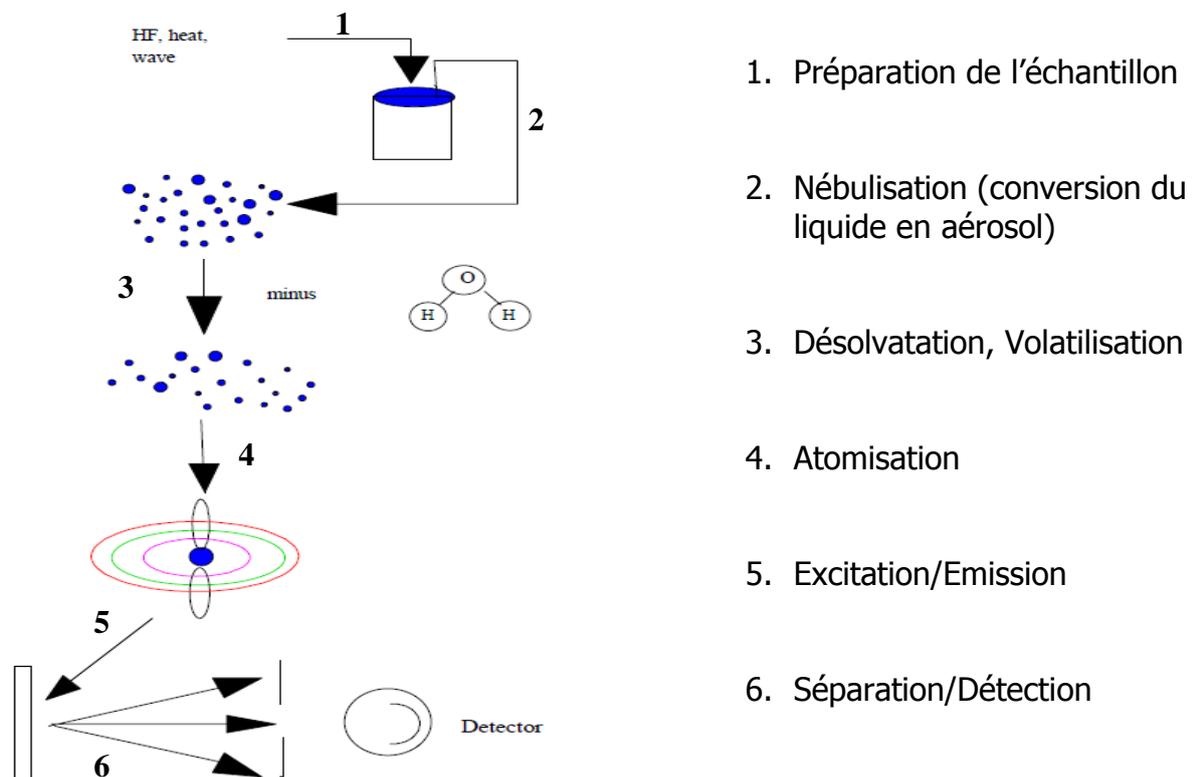
#### IV.2.3.3 ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy)

Cette technique a été utilisée pour analyser les filtres solaires inorganiques. Ceux-ci sont représentés dans les formulations solaires par le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc ( $\text{TiO}_2$  et  $\text{ZnO}$ ). Les éléments  $\text{Ti}^{4+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , peuvent être déterminés et quantifiés par la technique spectrométrique d'émission d'ICP-OES.

Le principe de l'ICP-OES peut être décrit comme suit: les atomes ou les ions sont excités à un état d'énergie supérieur par une torche à plasma qui donne une température de plusieurs milliers de degrés Celsius. Cette très haute température permet de décomposer la plupart des éléments et d'exciter la majorité des atomes du tableau périodique. Elle peut être décrite comme une source simultanée multi-élémentaire qui offre une haute sensibilité pour les mesures d'émission optique. Le retour à l'état stable de ces ions et de ces atomes s'accompagne d'une réémission d'énergie sous forme de lumière. Les longueurs d'onde de cette lumière émise sont

spécifiques pour chaque élément contenu dans les échantillons qui sont présentés au plasma. La quantité de lumière émise par les atomes ou les ions excités est proportionnelle à leur concentration dans les différents échantillons (Figure 49).

Les avantages de cette technique sont : la rapidité de l'analyse ainsi que la très faible limite de détection et de quantification pour la plupart des éléments (Coffey et col., 1995 ; Boevski et col., 2000, Atanassova et col., 1998).



**Figure 49:** Schéma du principe de l'ICP-OES (Manning et Grow, 1997)

Appareillage :

Le système utilisé était un ICP-OES Vista MPX-CCD simultané (Varian, Allemagne).

Les paramètres d'analyse ont été les suivants :

- Débit de plasma : 15 l/min
- Tension : 1,20 kW
- Débit du flux d'argon auxiliaire : 0,5 l/min
- Pression de nébulisation : 200 kPa
- Longueur d'onde d'analyse

- 334,94 nm ; 336,12 nm ; 337,28 nm et 368,52 nm pour le titane

- 202,54 nm ; 206,20 nm ; 213,85 nm et 334,50 nm pour le zinc

Une moyenne sur cinq mesures a été utilisée comme résultat final.

La détermination des quantités de titane et de zinc a été réalisée en utilisant des courbes de calibration allant de 0 à 20 ppm. Les solutions standard commerciales ont été utilisées pour ces déterminations : CertiPUR<sup>®</sup> Titanium Standard solution (1000 mg/l Ti, dilution dans l'eau milliQ) et 1 09953 Titrisol<sup>®</sup> Zinc Standard (1000 mg/l Zn, dilution dans l'eau milliQ) (Merck, Darmstadt, Allemagne).

Ces analyses s'effectuent sur des solutions limpides. Des méthodes d'extraction ont donc été mises au point et sont décrites dans la partie expérimentale (Cf. Partie V.2.2.2.2.2).

#### IV.2.3.4 Strippings

Les prélèvements de stratum corneum sont effectués à l'aide de disques adhésifs (Standard D-Squame<sup>®</sup> disc, diamètre de 2,6 cm Cuderm, Dallas-USA).

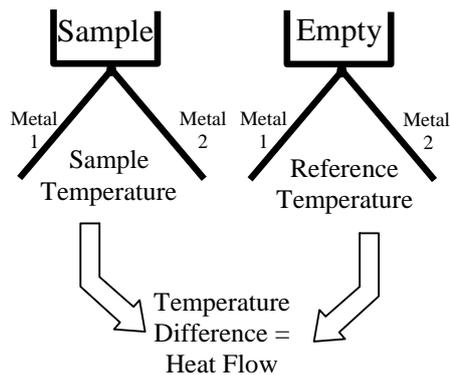
### **IV.2.4 Evaluation des mélanges lipidiques ; formulation et évaluation de l'EMC encapsulé**

Une partie du travail a consisté à formuler des nanoparticules lipidiques afin de protéger un des filtres solaires utilisé (EMC) contre la dégradation due à une exposition aux rayons UV. La procédure entière est décrite dans la partie expérimentale (Cf. Partie V.4), alors que les méthodes utilisées pour la caractérisation et l'étude des mélanges lipidiques sont détaillées ici.

#### IV.2.4.1 Calorimètre différentiel à balayage (Differential Scanning Calorimeter=DSC)

La DSC mesure les flux de chaleur associés aux structures et aux changements de structure des matériaux en fonction du temps et de la température dans une atmosphère contrôlée. Le principe de cette technique est le suivant (Figure 50):

deux cupules sont placées dans un four, la première contenant l'échantillon à tester, la deuxième, vide sert de référence. Les deux cupules sont chauffées à la même température. Lorsqu'une phase de transition exothermique ou endothermique apparaît au niveau de l'échantillon, le flux de chaleur nécessaire pour garder les deux cupules à la même température doit être respectivement diminué ou augmenté, ce qui provoque l'apparition d'un pic endothermique ou exothermique.



**Figure 50:** Schéma du principe de la DSC

Cette technique est fréquemment utilisée lors de tests préliminaires afin d'évaluer l'état cristallin, la présence de polymorphes ou l'existence de formes amorphes pour un échantillon donné. Elle est aussi utilisée pour étudier les interactions éventuelles entre différents composants.

Dans cette étude, la DSC a été utilisée afin de caractériser l'homogénéité et les états de cristallinité de mélanges lipidiques utilisés pour la formulation de nanoparticules. Ces études préliminaires ont été effectuées à l'aide d'un calorimètre différentiel à balayage de type Q 2000 (TA instrument, New Castle, Delaware, Etats-Unis). La quantité d'échantillon utilisé était de 5,00 mg, pesée dans des cupules hermétiques en aluminium. Une cupule vide étant utilisée comme référence. Les expérimentations ont été réalisées de 25°C à 95°C avec une vitesse de chauffage de 5°C.min<sup>-1</sup>, suivie d'une étape de refroidissement à la même vitesse. Deux cycles de chauffage et de refroidissement ont ainsi été réalisés. Les points de fusion (°C) ainsi que les enthalpies (J.g<sup>-1</sup>) des échantillons ont été analysés à l'aide des thermogrammes obtenus un jour après la production des mélanges lipidiques. Les valeurs ont été obtenues sur une seule mesure.

#### IV.2.4.2 Hot Stage Microscopy (HSM)

La HSM est une technique qui permet de visualiser les transitions de phase qui apparaissent dans un échantillon (fusion, cristallisation, etc.). Elle est ainsi complémentaire de la DSC.

Plusieurs cycles de chauffage et de refroidissement peuvent être appliqués sur les échantillons analysés.

Le dispositif de chauffage utilisé était un Linkam THMS 600 (Linkam Scientific Instruments, Waterfield, Royaume-Uni), couplé à un modulateur de température Linkam LNP/TMS 94 (Linkam Scientific Instruments, Waterfield, Royaume-Uni). Ce dispositif était relié à un microscope de type Olympus-Bx 60 (Olympus-Nihon Kodan, Japon) équipé d'une caméra couleur JVC TK-C1381.

Grâce à la présence d'une résistance chauffante en platine qui contrôle la température et d'un support en argent qui permet d'assurer l'uniformité de la chaleur sur tout l'échantillon, il est possible d'appliquer plusieurs cycles de chauffage et de refroidissement à l'échantillon analysé. Une petite quantité du mélange lipidique a été appliquée sur une lame en verre. Puis l'HSM était programmée pour avoir une vitesse de chauffage de  $5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  entre  $25^{\circ}\text{C}$  et  $70^{\circ}\text{C}$ , suivi d'une vitesse de chauffage de  $0,1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  jusqu'à  $80^{\circ}\text{C}$  ou  $90^{\circ}\text{C}$  en fonction des mélanges lipidiques étudiés (Cf. Partie V.4.2.2.1).

#### IV.2.4.3 Homogénéisateur haute vitesse

L'homogénéisation à haute vitesse, à l'aide d'un Ultra-Turrax (T-25 Basic, IKA-Werk, Staufen, Germany) a été la première étape lors de la fabrication des nanoparticules. Celle-ci consistait en la préparation d'une pré-émulsion à chaud. Les phases lipidiques ont été dispersées dans les phases aqueuses contenant les tensio-actifs. Le temps d'homogénéisation était de 1 min avec une vitesse de rotation de 20500 rpm. Cette opération a été réalisée à une température de  $10^{\circ}\text{C}$  au-dessus de la température de fusion des lipides afin de pouvoir réaliser l'émulsification.

#### IV.2.4.4 Homogénéisateur Haute Pression (HHP)

Cette étape a suivi l'homogénéisation à haute vitesse. L'HHP est une méthode utilisée pour réduire la taille des particules et obtenir ainsi des nanoparticules.

La diminution des tailles particulières s'effectue à travers une valve d'homogénéisation dont l'ouverture est réglable. Un piston force alors le passage de l'émulsion à travers celle-ci. Plus l'ouverture de la valve est faible, plus la pression est élevée. Cette diminution de taille est ainsi la résultante de grandes forces d'impaction dues à d'intenses collisions interparticulaires, d'importantes forces de friction et des forces de cavitation, ces dernières étant les plus prononcées (Kipp, 2004).

Les forces de cavitations qui se créent pendant l'utilisation de l'HHP sont la conséquence d'une réduction du diamètre tubulaire à travers lequel passe la microémulsion contenant les particules lipidiques. En effet, le réservoir contenant la dispersion a un diamètre final de 3 mm environ et le diamètre de la valve d'homogénéisation peut aller jusqu'à 25  $\mu\text{m}$  (taille de l'orifice à une pression de 1500 bars) (Müller et col., 2001). Le passage de la solution s'effectue à grande vitesse et de façon continue. En accord avec la loi de Bernouilli qui établit que le flux d'un liquide est constant pour une section donnée dans un système clos, la diminution du diamètre à travers lequel passe la microémulsion provoque simultanément une augmentation de la pression dynamique et une diminution de la pression statique au niveau des pistons. Ces variations conduisent la pression statique en-dessous de la valeur de la tension de vapeur du liquide à la température ambiante, provoquant ainsi le début de l'ébullition de l'eau avec la formation de bulles de gaz (bulles de cavitation). Quand les microémulsions quittent les pistons et que la pression initiale est restaurée, ces bulles implosent et la grande énergie qui accompagne ce phénomène est responsable de la cassure des particules (Kipp, 2004 ; Keck et Müller, 2006).

L'efficacité de l'HHP est dépendante de la pression durant l'homogénéisation, du nombre de cycle d'homogénéisation, des caractéristiques de dureté des matières premières et, éventuellement des températures utilisées lors du processus de formulation (Hecq, 2006).

L'HHP présente plusieurs avantages: c'est un processus simple, rapide, peu cher et qui ne consomme pas de solvants.

Les nanoparticules ont été obtenues en utilisant un homogénéisateur haute pression de type Emulsiflex-C5<sup>®</sup> (Avestin Inc., Ottawa, Canada). Les conditions d'utilisations ont été les suivantes :

- Nombre de cycles : 3
- Pression : 500 bars
- Température : 85°C (L'homogénéisateur étant maintenu dans un bain d'eau chaude)

Un refroidissement rapide est ensuite réalisé à l'aide d'un bain de glace afin que les échantillons se retrouvent à une température inférieure à la température ambiante. En effet, la température élevée pendant le processus d'homogénéisation permet la production d'une nanoémulsion à cause de l'état liquide des lipides. Les particules solides seront alors formées lors d'un refroidissement rapide.

#### IV.2.4.5 Le simulateur de lumière (Suntest CPS +)

C'est un simulateur solaire équipé d'une lampe Xénon qui reproduit la lumière du soleil et d'un bloqueur d'infrarouge pour éviter les augmentations trop importantes de température. Il permet d'avoir un spectre de lumière solaire stable et reproductible. L'appareil utilisé était un Suntest CPS+ (Atlas, Linsengericht, Allemagne) (Figure 51).



**Figure 51:** Photographie du Suntest CPS+

Il a permis d'irradier les suspensions de nanoparticules afin de vérifier l'efficacité de l'encapsulation du filtre solaire et la protection amenée vis-à-vis des rayonnements UV (Cf. Partie V.4.2.2.3). Pour cela des cellules de quartz de 1 mm d'épaisseur ont été utilisées, et ce, après avoir vérifié que celles-ci n'absorbent pas dans les UV et donc n'interfèrent pas avec les expérimentations. Ce contrôle a été réalisé à l'aide du test actinique qui consiste à vérifier la dégradation de la quinine lorsqu'elle est irradiée par les UV (Yoshioka et col., 2004).

Les conditions d'irradiations ont été les suivantes :

- Temps d'exposition : 2 h
- Exposition : 250 W/m<sup>2</sup>
- Température : 30°C
- Présence d'un contrôle qui est gardé dans l'obscurité

Avant et après exposition des nanosuspensions aux UV, le spectre d'absorbance ainsi que l'absorbance à 310 nm ont été mesurés et analysés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible HP 8453 (Agilent, Allemagne). Les diminutions d'absorbance de chaque formulation dues à l'irradiation sont ainsi comparées, ce qui nous permet d'évaluer l'efficacité de la protection par les lipides.

#### IV.2.4.6 Mesure du potentiel zêta

Elle a été effectuée dans le but d'évaluer la stabilité des suspensions de nanoparticules lipidiques. Le potentiel zêta est une propriété physique qui caractérise l'ensemble des nanoparticules en suspension. Il peut être utilisé pour optimiser les formulations de suspensions et d'émulsions.

Le potentiel zêta résulte de la théorie DVLO. Celle-ci suggère que la stabilité d'une particule dans une solution est dépendante de son potentiel total d'énergie  $V_T$  qui dépend lui-même de plusieurs paramètres:

$$V_T = V_A + V_R + V_S \quad (8)$$

$V_A$  = Potentiel d'attraction (Forces de Van der Waals)

$V_R$  = Potentiel de répulsion (double couche électrique à la surface des particules)

$V_S$  = potentiel d'énergie dû au solvant

La théorie DLVO suggère que la stabilité d'un système colloïdal est déterminée par la somme de ces forces attractives et répulsives qui existent entre les particules lorsqu'elles se rapprochent les unes des autres à cause du mouvement brownien. Si les particules ont une répulsion suffisante, la dispersion va résister à la floculation et le système sera stable.

Les charges qui peuvent apparaître à la surface des particules peuvent avoir plusieurs origines : ionisation de groupements chimiques, perte d'ions, adsorption d'espèces chargées. Tout ceci a pour conséquence l'apparition d'une couche de charges électriques à la surface des particules.

La couche de liquide qui entoure les particules est constituée de deux parties : une couche interne où les contre-ions sont fortement liés et une couche extérieure où ils sont plus libres. A l'intérieur de cette double couche diffuse, il existe une limite où les contre-ions et les particules forment une entité stable. Lorsque les particules bougent, par exemple à cause de la gravité, les contre-ions sont également en mouvement au niveau de cette limite. Le potentiel qui y apparaît est appelé le potentiel zêta. La valeur de celui-ci donne une indication de la stabilité du système colloïdal. Les particules dont la valeur absolue de potentiel zêta est supérieure à 30 mV sont considérées comme stables. Ainsi, lorsqu'il est compris entre 30 mV et 50 mV (en valeur absolue), le système est considéré comme stable (Malvern, 2000 ; Shaw, 1992).

Le Zetasizer 2000 (Malvern, Royaume-Uni) a été utilisé pour réaliser les mesures de zêta potentiel des nanosuspensions. Les échantillons ont été dilués extemporanément à raison de 1  $\mu$ l dans 10 ml d'eau milliQ. La valeur moyenne est le résultat de cinq mesures réalisées par l'appareil.

# **V.PARTIE EXPERIMENTALE**

## **V. Partie expérimentale**

### **V.1 Formulation des émulsions solaires et influence de différents paramètres sur les formes aérosol**

Cette partie du travail a porté sur la formulation de produits solaires, puis de leur incorporation en boîtier aérosol. Dans un premier temps, des émulsions H/E ont été formulées en parallèle avec des émulsions de type E/H et E/Si qui ont une phase grasse externe. Ceci permet de garder le produit plus longtemps sur la peau lorsque celle-ci est en contact avec l'eau. Ceci permet d'augmenter la capacité de protection du produit contre les rayons UV. Les émulsions H/E ne convenant pas, à cause de leur non miscibilité dans les gaz utilisés, elles ont été abandonnées très rapidement.

Dans un premier temps, des émulsions simples ont été formulées. Celles-ci devaient être assez fluides et stables dans le temps au niveau de la texture, de la viscosité et de l'aspect général. Chaque formulation a été testée au niveau de sa capacité à être pulvérisée sous forme de brume à l'aide d'une pompe. Lorsque le produit ne sortait pas sous forme d'une brume, mais sous forme d'un jet, elle était catégorisée comme non sprayable. Il a été constaté que la viscosité à partir de laquelle les émulsions ne pouvaient plus être pulvérisées sous forme de brume était de 3200 mPa.s (Viscosimètre RV-DV-II+ ; tige : LV3 ; vitesse : 5 rpm). Puis il a fallu choisir des protecteurs solaires ainsi que des ingrédients actifs pour les incorporer dans ce type d'émulsions. La dernière étape de la formulation a consisté à améliorer les formulations pour que celles-ci soient acceptables au niveau cosmétique et à les mettre en aérosol. Pour cela, une étude de l'influence de différents paramètres (concentration en gaz, viscosité, concentration en filtres inorganiques, types de valves et de diffuseurs) sur la taille des gouttelettes a ensuite été réalisée par diffraction laser.

### **V.1.1 Formulation des produits solaires**

Pour rappel, la démarche effectuée pour la mise au point des émulsions (E/H et E/Si) est la suivante : 1 -Formulation sans protecteurs solaires

2 -Formulation avec protecteurs solaires

3 -Ajout des ingrédients actifs

Les mesures de viscosités lors de la fabrication des émulsions ont été effectuées à différents moments : juste après l'émulsification, 1 semaine après et un mois après pour les formulations qui étaient stables. Les valeurs reprises dans les tableaux suivants sont les viscosités mesurées 1 mois après l'émulsification pour les émulsions stables ou juste après l'émulsification pour les émulsions non stables.

#### **V.1.1.1 : Emulsion E/H**

##### **V.1.1.1.1 : Choix des matières premières**

Les matières premières utilisées ainsi que leurs caractéristiques sont décrites dans la partie matériel et méthode (Cf. Partie IV.1.1).

##### **V.1.1.1.2 : Formulation sans protecteur solaire**

Les premières formulations, **06A2701** et **06A2702** (Tableau 8), ont été formulées dans le but de faire une première base émulsionnée E/H sans les filtres solaires. Elles ont été réalisées en utilisant un tensio-actif E/H, l'Arlacel<sup>®</sup>P135, dont la concentration d'utilisation préconisée se situe entre 1 et 2%. Ces deux concentrations ont ainsi été testées. La viscosité et la stabilité de l'émulsion augmentent avec celle-ci. Une phase externe huileuse contenant différents types d'huiles a été choisie. En effet, les huiles minérales (Crodamol<sup>®</sup>AB, Arlamol<sup>®</sup>E et Nexbase<sup>®</sup>2004 et 2006) et la silicone DC 245<sup>®</sup>fluid apportent un toucher moins gras à l'émulsion. L'huile végétale d'arachide a été choisie pour ses propriétés antioxydantes et sa capacité à agir contre les brûlures. De plus, c'est une huile alimentaire. Cette caractéristique permet

d'augmenter la sécurité finale du produit. L'alcool cétylique a été incorporé dans la phase grasse afin d'optimiser la consistance et la stabilité du produit fini. Les fonctions des ingrédients utilisés dans la phase aqueuse sont décrites dans la partie matériel et méthode (Cf. Partie IV.1.1). Ces émulsions ont été préparées à chaud, en effet, l'alcool cétylique est solide à température ambiante et il doit être chauffé pour pouvoir se mélanger avec le reste de la phase huileuse. La phase grasse contenant le tensioactif est chauffée à 85°C, la phase aqueuse est chauffée à 80°C et est ajoutée à la phase huileuse sous agitation à l'aide du Silverson (Cf. Partie IV.2.1 pour les conditions). Ces deux premières formulations présentaient une mauvaise stabilité ; une séparation de phase des émulsions était observée après une semaine de stockage de celles-ci dans une étuve à 40°C. En effet, l'Arlacel®P135 peut réagir avec les fonctions hydroxyles présentes dans l'huile d'arachide ainsi que dans l'alcool cétylique pour déstabiliser le système.

L'alcool cétylique a donc été supprimé et la concentration en huile d'arachide a été diminuée de 10% à 5%. La perte de ces ingrédients est compensée dans l'émulsion par l'augmentation de la proportion en eau. La formulation **06B1701** a ainsi été obtenue. L'augmentation de la concentration en phase interne aqueuse a eu pour conséquence une augmentation de la viscosité du produit qui empêchait celui-ci d'être pulvérisé sous forme de brume à partir d'un spray en pompe.

La viscosité étant toujours trop élevée, le Nexbase®2006 a été remplacé par du Nexbase®2004 de viscosité plus faible. De plus, la concentration du Nexbase®2004 a été augmentée de 5% à 10% afin d'augmenter la quantité de phase grasse externe. Enfin, le NaCl a été supprimé pour aboutir à la formulation **06C0801**. En effet, un seul électrolyte suffit et le sulfate de magnésium est celui qui est habituellement employé en présence de l'Arlacel® P135. Cela a ainsi contribué à diminuer la viscosité du produit qui était trop élevée au départ (de 9934 mPa.s à 8535 mPa.s).

Un déphasage de l'émulsion est toujours observé à l'étuve à 40°C. L'Arlamol E a été remplacé par l'Arlamol®HD (Isohexadecane) qui ne contient pas de fonctions hydroxyles qui pourraient interagir avec le tensioactif et dont la quantité a aussi été augmentée par rapport à l'Arlamol®E (10% au lieu de 5%). La silicone (DC 245 fluid®) a ensuite été aussi supprimée pour diminuer les interactions entre les groupements Si et l'Arlacel P135. La formulation **06C1501** a ainsi été obtenue.

Toutes ces modifications ont alors permis de réaliser les formulations à froid. Ceci est un avantage par rapport à un mode opératoire effectué à chaud. En effet, lors de l'étape de refroidissement de la formulation, les feuillettes qui constituent la structure lamellaire de l'émulsion ont tendance à se resserrer, ce qui contribue à obtenir une structure plus condensée et plus rigide et donc moins adaptée pour des formes sprayables.

Afin d'optimiser la stabilité des émulsions, la phase aqueuse interne a été viscosifiée à l'aide de Rhodicare T (gomme xanthane) à différentes concentrations (0,1% **(06C2102)** ; 0,15% **(06C2902)** ; et 0,2% **(06C2901)**), afin de diminuer les transferts de matière entre la phase aqueuse interne et la phase grasse externe.

La formule avec 0,1% de Gomme Xanthane **(06C2102)** étant stable à l'étuve à cycle et à l'étuve à 40°C (Cf. Partie IV.2.1.4), et ayant la plus faible concentration en hydrocolloïde, c'est celle-ci qui a été conservée pour la suite des formulations.

**Tableau 8:** Les étapes de la formulation E/H sans filtre solaire

| <b>Formulations<br/>N° Batch</b> | <b>Phases</b> | Emul. E/H<br><b>06A2701</b> | Emul. E/H<br><b>06A2702</b> | Emul. E/H<br><b>06B1701</b> | Emul. E/H<br><b>06C0801</b> | Emul. E/H<br><b>06C1501</b> | Emul. E/H<br><b>06C2102</b> | Emul. E/H<br><b>06C2901</b> | Emul. E/H<br><b>06C2902</b> |
|----------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Ingrédients                      |               |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                             |                             |
| Eau Déminéralisée                | 1             | 68,55%                      | 67,55%                      | 71,55%                      | 71,25%                      | 68,25%                      | 68,15%                      | 68,05%                      | 68,10%                      |
| Rhodicare <sup>®</sup> T         | 1             |                             |                             |                             |                             |                             | 0,10%                       | 0,20%                       | 0,15%                       |
| EDTA Dissodique                  | 2             | 0,05%                       | 0,05%                       | 0,05%                       | 0,05%                       | 0,05%                       | 0,05%                       | 0,05%                       | 0,05%                       |
| NaCl                             | 2             | 0,70%                       | 0,70%                       | 0,70%                       | -                           | -                           | -                           | -                           | -                           |
| MgSO4                            | 2             | 0,70%                       | 0,70%                       | 0,70%                       | 0,70%                       | 0,70%                       | 0,70%                       | 0,70%                       | 0,70%                       |
| Propylene Glycol                 | 2             | 3%                          | 3%                          | 3%                          | 3%                          | 3%                          | 3%                          | 3%                          | 3%                          |
| Paratrexine <sup>®</sup>         | 2             | 1%                          | 1%                          | 1%                          | 1%                          | 1%                          | 1%                          | 1%                          | 1%                          |
| Arlacel <sup>®</sup> P135        | 3             | 1%                          | 2%                          | 2%                          | 2%                          | 2%                          | 2%                          | 2%                          | 2%                          |
| Arlamol <sup>®</sup> E           | 4             | 5%                          | 5%                          | 5%                          | 5%                          | -                           | -                           | -                           | -                           |
| Arlamol <sup>®</sup> HD          | 4             | -                           | -                           | -                           | -                           | 10%                         | 10%                         | 10%                         | 10%                         |
| DC <sup>®</sup> 245 Fluid        | 4             | 3%                          | 3%                          | 5%                          | 5%                          | -                           | -                           | -                           | -                           |
| Huile arachide                   | 4             | 10%                         | 10%                         | 5%                          | -                           | -                           | -                           | -                           | -                           |
| Crodamol <sup>®</sup> AB         | 4             | 1%                          | 1%                          | 1%                          | 2%                          | 5%                          | 5%                          | 5%                          | 5%                          |
| Nexbase <sup>®</sup> 2006 FG     | 4             | 5%                          | 5%                          | 5%                          | -                           | -                           | -                           | -                           | -                           |
| Nexbase <sup>®</sup> 2004 FG     | 4             | -                           | -                           | -                           | 10%                         | 10%                         | 10%                         | 10%                         | 10%                         |
| Alcool Cétylique                 | 4             | 1%                          | 1%                          | -                           | -                           | -                           | -                           | -                           | -                           |

**Viscosité** (mPa.s)

| Spindle | RPM |   |   |      |      |      |      |      |      |
|---------|-----|---|---|------|------|------|------|------|------|
| LV3     | 5   | - | - | 9934 | 8535 | 7798 | 2903 | 4871 | 2927 |

|   |  |                     |                     |                     |                     |                     |     |     |     |
|---|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----|-----|-----|
| <b>Sprayabilité</b><br>(pompe)            |  | Non                 | Non                 | Non                 | Non                 | Oui                 | Oui | Non | Oui |
| <b>Stabilité étuve</b><br><b>40°C</b>     |  | déphasage<br>sem. 1 | OK  | OK  | OK  |
| <b>Stabilité étuve à</b><br><b>cycles</b> |  | -                   | -                   | -                   | -                   | -                   | OK  | OK  | OK  |

### V.1.1.1.3 Formulations avec protecteurs solaires

Le choix des filtres a été effectué en prenant en compte différentes considérations. En effet, la combinaison adéquate des filtres solaires organiques et inorganiques permet de minimiser les risques d'allergie et d'augmenter le FPS de façon significative. De plus, il faut utiliser des filtres anti-UVA et anti-UVB.

#### **Filtres inorganiques :**

Le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc ont été incorporés dans la formule.

Le problème réside dans la sédimentation de ces filtres qui peut survenir si leur concentration est trop importante, cette sédimentation peut être due à la faible viscosité du produit.

Pour le dioxyde de titane, des pré-dispersions aqueuses et huileuses ont été testées. L'oxyde de Zinc utilisé est finement divisé et enrobé de silicone, ce qui permet de le disperser facilement dans la phase huileuse. Il est important d'en incorporer car il est anti-UVA.

#### **Filtres organiques :**

Ils sont tous à l'état liquide, sauf le Tinosorb<sup>®</sup>S. Ceci permet de continuer à formuler à froid. Les Tinosorb<sup>®</sup>S et M, utilisés en synergie, permettent d'augmenter le FPS. De plus, ils sont anti-UVA. Le Tinosorb<sup>®</sup>S étant une poudre (soluble à 25°C), il n'est utilisé qu'à la concentration de 1%.

L'Uvinul A+B est un mélange de filtre UVB et UVA. Les autres filtres testés sont anti-UVB (Escalol 557, Escalol 507).

Le but des manipulations étant d'avoir un FPS élevé, les concentrations en filtres organiques sont donc importantes.

L'influence de chacun des filtres sur la formulation de base n'était pas connue au départ, ils ont donc été incorporés les uns après les autres, pour voir s'ils ne posaient pas de problème au niveau de la stabilité (Tableau 9).

Après avoir rajouté les filtres organiques, les filtres inorganiques ont été testés. Les dispersions aqueuses, comme huileuses, de Dioxyde de Titane nous ont permis d'incorporer des concentrations maximales de 3% en  $TiO_2$  dans chacune des formulations. La viscosité est trop élevée avec des concentrations supérieures à 3%, ce qui empêche par la suite la mise en aérosol. Les dispersions aqueuses de  $TiO_2$  ont été choisies pour les formules finales car elles pénètrent moins dans la peau que des dispersions huileuses et devraient donc d'être moins toxiques

La formulation **06E1702** étant stable à l'étuve à 40°C et à l'étuve à cycles, elle a été conservée pour la suite du travail. En effet, il y a lieu d'ajouter des ingrédients actifs qui vont permettre d'améliorer la formule et de revendiquer des effets apaisants, réparateurs ou autres.

#### V.1.1.1.4 Formulation avec protecteurs solaires et ingrédients actifs

Les ingrédients actifs (Cf. Partie IV.1.1) ont été ajoutés à la formule **06E1702**. Le tableau 10 reprend la formule définitive de l'émulsion E/H qui est stable à l'étuve à cycle et à l'étuve à 40°C. La viscosité des émulsions permet leur écoulement dans les boîtiers définitifs. Elle diminue par la suite avec l'ajout des gaz, ce qui permet d'obtenir une pulvérisation sous forme de fines gouttelettes. Le critère de sprayabilité lors des formulations des émulsions n'est donc plus primordial pour la mise en aérosol finale du produit. De plus, la pression dans le boîtier est suffisante pour expulser l'émulsion.

**Tableau 9 : Les différentes étapes pour la formulation de l'émulsion E/H avec protecteurs solaire**

| Formulations<br>N°Batch | Phase | Emul.E/H<br>06D1301 | Emul.E/H<br>06D1302 | Emul.E/H<br>06D1401 | Emul.E/H<br>06D1402 | Emul.E/H<br>06D1801 | Emul.E/H<br>06D1902 | Emul.E/H<br>06D2701 | Emul.E/H<br>06E0901 | Emul.E/H<br>06E0902 | Emul.E/H<br>06E1002 | Emul.E/H<br>06E1701 | Emul.E/H<br>06E1702 |
|-------------------------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Ingrédients</b>      |       |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
| Eau déminéralisée       | 1     | 58,15%              | 53,15%              | 50,29%              | 44,59%              | 47,43%              | 49,15%              | 44,65%              | 39,65%              | 34,65%              | 36,15%              | 35,15%              | 31,15%              |
| Rhodicare T             | 1     | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               | 0,10%               |
| Propylene glycol        | 2     | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  | 3%                  |
| Paratrexine             | 2     | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               |
| EDTA dissodique         | 2     | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               | 0,05%               |
| MgSO4                   | 2     | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               | 0,70%               |
| Tinosorb M              | 3     |                     | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 |
| Solaveil CT-10W         | 3     |                     |                     |                     |                     |                     | 2,50%               |                     | 5%                  | 10%                 | 7,50%               | 7,50%               | 7,50%               |
| Arlacel P135            | 4     | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  | 2%                  |
| Arlamol HD              | 5     | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 |
| Crodamol AB             | 5     | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  | 5%                  |
| Paratrexine             | 5     | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               | 0,50%               |
| Nexbase 2004 FG         | 5     | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 |
| Tinosorb S              | 5     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     | 1%                  | 1%                  |
| Uvinul A+B              | 6     | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 | 10%                 |
| Escalol 557             | 6     |                     |                     |                     |                     |                     |                     | 3,50%               | 3,50%               | 3,50%               | 3,50%               | 3,50%               | 3,50%               |
| Escalol 507             | 6     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     | 4%                  |
| Solaveil CT-100         | 6     |                     |                     | 2,86%               | 9%                  | 5,72%               |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
| Z Cote max              | 6     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     | 1%                  | 1%                  | 1%                  |

**Viscosité**

**(mPa.s)**

Spindle

RPM

|   |   |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |      |      |
|---|---|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| LV3                                     | 5 | 636  | 2447 | 1674 | 4859 | 3579 | 5678 | 2765 | 7126 | 10139 | 8420 | 7678 | 6995 |
| Sprayabilité (pompe)                    |   | Oui  | oui  | oui  | Non  | non  | Non  | oui  | non  | non   | Non  | non  | non  |
| Stabilité étuve à cycles                |   | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | oui   | Oui  | oui  | oui  |
| Stabilité étuve à 40°C                  |   | Oui  | oui  | non  | Non  | non  | oui  | oui  | oui  | non   | Oui  | oui  | oui  |
| FPS estimé par calcul (Simulateur CIBA) |   | 12,4 | 21   | 24,3 | 29,3 | 27,1 | 24,3 | 32,7 | 37,1 | 41,7  | 40,2 | 42   | 54,4 |

**Tableau 10:** Emulsion E/H finale

| <b>Formulations</b> | <b>Phases</b> | Emulsion<br>E/H |
|---------------------|---------------|-----------------|
| <b>N°Batch</b>      |               | <b>06E2902</b>  |

**Ingrédients**

|                    |   |        |
|--------------------|---|--------|
| Eau déminéralisée  | 1 | 29,60% |
| Rhodicare T        | 1 | 0,10%  |
|                    |   |        |
| Propylene glycol   | 2 | 3,00%  |
| Paratrexine        | 2 | 0,50%  |
| EDTA dissodique    | 2 | 0,05%  |
| MgSO4              | 2 | 0,70%  |
| α-Bisabolol        | 2 | 0,50%  |
| Vanirea            | 2 | 1,00%  |
|                    |   |        |
| Tinosorb M         | 3 | 10,00% |
| Solaveil CT-10W    | 3 | 7,50%  |
|                    |   |        |
| Arlamol HD         | 4 | 10,00% |
| Crodamol AB        | 4 | 5,00%  |
| Paratrexine        | 4 | 0,50%  |
| Nexbase 2004 FG    | 4 | 10,00% |
| Tinosorb S         | 4 | 1,00%  |
|                    |   |        |
| Tocopheryl acetate | 5 | 0,05%  |
| Uvinul A+B         | 5 | 10,00% |
| Escalol 557        | 5 | 3,50%  |
| Escalol 507        | 5 | 4,00%  |
| Z Cote max         | 5 | 1,00%  |
|                    |   |        |
| Arlacel P135       | 6 | 2,00%  |

**Viscosité (mPa.s)**

Spindle RPM

|     |   |
|-----|---|
| LV3 | 5 |
|-----|---|

6887

Sprayabilité (pompe)

non

Stabilité étuve à 40°C

2 mois : OK

Stabilité étuve à cycle

OK

FPS estimé par calcul  
(simulateur CIBA)

54,4

### V.1.1.2 Emulsion E/Si

La même approche que pour les formulations E/H a été utilisée.

Le **DC<sup>®</sup> 9011** a été sélectionné, en effet, il est le seul tensioactif permettant de faire des émulsions E/Si assez fluides et stables dans le temps. Ce sont des émulsions très intéressantes car elles ont une viscosité au repos très basse (de l'ordre de 200 mPa.s) et leur toucher est très agréable. Le mélangeur Silverson n'est pas recommandé pour les formulations réalisées avec ce produit car les cisaillements élevés et une agitation importante provoquent une augmentation de la viscosité du produit fini, ce qui n'est pas désiré dans notre cas. L'agitateur à hélice est alors employé mais le temps d'émulsification est beaucoup plus long (40 min) (Cf. Partie IV.2.1.2).

#### V.1.1.2.1 Choix des matières premières

Les matières premières utilisées ainsi que leurs caractéristiques sont décrites dans la partie matériel et méthode (Cf. Partie IV.1.2).

#### V.1.1.2.2 Formulation sans protecteur solaire

Afin d'avoir une bonne stabilité, il est préférable que la majorité des matières premières soient incorporées au niveau de la phase externe. C'est pourquoi, la quantité de silicone est importante (plus de 40% de la proportion totale du produit). On obtient une émulsion très fluide, qui doit être stabilisée par une grande quantité de tensioactif. De plus, un co-émulsionnant, le DC<sup>®</sup> 5329 était utilisé dans le but d'aider à former des vésicules de silicone capables de piéger les substances solubles dans l'eau et ainsi de faciliter l'émulsification. L'émulsion **06C2201** a ainsi été formulée (Tableau 11). Une séparation de phase était observée 2h seulement après l'émulsification. Le DC 5329 a été supprimé pour réaliser la formulation **06C2202**. En effet son association avec le DC<sup>®</sup> 9011 ne permet pas de stabiliser le système, contrairement à ce que l'on pensait au départ. Cette émulsion **06C2202** ne présentait pas de séparation de phase après 2h, contrairement à l'émulsion 06C2201, mais elle n'était pas stable à l'étuve à 40°C.

De la gomme xanthane a été rajoutée pour permettre de viscosifier la phase interne et par conséquent de stabiliser l'émulsion à plus long terme, pour obtenir la formulation **06C3101**. En effet, en épaississant la phase aqueuse, on diminue les transferts entre les 2 phases (aqueuse et huileuse), ce qui a permis dans notre cas d'augmenter la stabilité du système.

Cette formulation étant stable à l'étuve à cycles et à 40°C, elle a été retenue pour la suite du développement.

**Tableau 11:** Evolution de l'émulsion E/Si sans filtre solaire

| <b>Formulations</b>             | <b>Phase</b> | Emul. E/Si | Emul. E/Si   | Emul. E/Si   |
|---------------------------------|--------------|------------|--------------|--------------|
| <b>N°Batch</b>                  |              | 06C2201    | 06C2202      | 06C3101      |
| <b>Ingrédients</b>              |              |            |              |              |
| Eau déminéralisée               | 1            | 54,75%     | 55,25%       | 55,15%       |
| Rhodicare T <sup>®</sup>        | 1            | -          | -            | 0,10%        |
|                                 |              |            |              |              |
| EDTA dissodique                 | 2            | 0,05%      | 0,05%        | 0,05%        |
| NaCl                            | 2            | 0,70%      | 0,70%        | 0,70%        |
|                                 |              |            |              |              |
| Propylene Glycol                | 3            | 3,00%      | 3,00%        | 3,00%        |
| Paratrexine <sup>®</sup>        | 3            | 0,50%      | 0,50%        | 0,50%        |
|                                 |              |            |              |              |
| DC <sup>®</sup> 9011            | 4            | 20,00%     | 20,00%       | 20,00%       |
| DC <sup>®</sup> 245 fluid       | 4            | 15,00%     | 15,00%       | 15,00%       |
| DC <sup>®</sup> 5339            | 4            | 0,50%      | -            | -            |
| DC <sup>®</sup> 2502            | 4            | 5,00%      | 5,00%        | 5,00%        |
| Paratrexine <sup>®</sup>        | 4            | 0,50%      | 0,50%        | 0,50%        |
| <b>Viscosité (mPa.s)</b>        |              |            |              |              |
| Spindle                         | RPM          |            | Déphasage J1 | Déphasage J1 |
| LV2                             | 20           |            |              | 172          |
| LV2                             | 50           |            |              | 184          |
|                                 |              |            |              |              |
| <i>Stabilité étuve à 40°C</i>   |              | -          | -            | OK           |
| <i>Stabilité étuve à cycles</i> |              | -          | -            | OK           |
| <b>sprayabilité</b> (pompe)     |              | Oui        | Oui          | Oui          |

Nous avons constaté par ailleurs que ces émulsions étaient beaucoup plus fluides que les émulsions E/H. Elles étaient facilement sprayables à l'aide d'une simple pompe, ceci n'était pas le cas pour les émulsions E/H (quand elles peuvent être

pulvérisées, elles ne donnent qu'un jet et pas une brume) qui nécessitaient donc un gaz pour pouvoir être pulvérisées.

#### V.1.1.2.3 Formulation avec protecteurs solaires

Tous les filtres ont été rajoutés en phase aqueuse interne pour éviter de déstabiliser le système au maximum. En effet, le Tinosorb<sup>®</sup>M est dispersible dans l'eau et l'Eusolex UV Pearl<sup>®</sup> est une dispersion aqueuse d'EMC encapsulé. Des quantités croissantes de dioxyde de titane ont ensuite été incorporées pour voir si cela ne posait pas un problème au niveau de la stabilité des émulsions. La concentration maximale acceptable était de 3%. Enfin, 1% d'oxyde de zinc a été incorporé en fin d'émulsification, pour avoir une protection UVA. De la même façon que pour l'émulsion E/H, la viscosité augmente avec l'ajout de filtres inorganiques. Mais celle-ci reste quand même inférieure à celle de l'émulsion E/H. Un essai a été réalisé avec de l'Escalol 507<sup>®</sup>, afin d'augmenter le FPS et pour voir le comportement en phase siliconée. Cette formulation n'était pas stable et elle n'a donc pas été retenue par la suite. La formulation **06E1202** a été retenue pour la suite du développement (Tableau 12).

#### V.1.1.2.4 Formulation avec protecteurs solaires et ingrédients actifs

Les ingrédients actifs ont été ajoutés à la formule **06E1202** (Tableau 13). La stabilité de l'émulsion est ensuite testée à l'étuve à 40°C et à l'étuve à cycles, pour voir si ces actifs sont bien compatibles avec la formulation de départ.

#### **Comparaison avec l'émulsion E/H :**

La viscosité de l'émulsion E/Si (2891 mPa.s) était ici plus faible que celle de l'émulsion E/H (6887 mPa.s). Cette différence de viscosité peut être due au fait que l'agitation était plus importante lors de la fabrication de l'émulsion E/H, ceci contribuait à la diminution de la taille des gouttelettes de la phase interne, ce qui augmentait donc sa surface active. En effet, il est nécessaire de préparer les émulsions E/Si sous faible agitation et pendant un temps plus long afin de permettre

la bonne orientation des sites hydrophiles de l'émulsifiant E/Si vers la phase aqueuse (Rieger, 2000 A). Cependant, il n'était pas possible de diminuer la vitesse d'agitation de l'émulsion E/H sans diminuer sa stabilité. Le FPS estimé est plus faible pour l'émulsion E/Si (34) que pour l'émulsion E/H (54,4) car la concentration en filtres UV est plus faible. En effet, l'incorporation de ceux-ci est plus difficile et ils peuvent plus facilement déstabiliser le système car ils sont huileux et ne sont pas miscibles avec la phase siliconée. Il est possible d'utiliser des filtres UV solubles en phase aqueuse (autre que l'EMC utilisé pour cette émulsion E/Si), mais une grande quantité de filtres dans la phase interne risque d'augmenter la viscosité du produit et d'empêcher sa mise en aérosol ultérieure.

**Tableau 12** : Les différentes étapes de formulation de l'émulsion E/Si avec filtres solaires

| Formulations<br>N°Batch             | Phases | Emul. E/Si<br>06D2702 | Emul. E/Si<br>06E0903 | Emul. E/Si<br>06E1001 | Emul. E/Si<br>06E1202 | Emul. E/Si<br>06E1203 |
|-------------------------------------|--------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>Ingrédients</b>                  |        |                       |                       |                       |                       |                       |
| Eau déminéralisée                   | 1      | 25,15%                | 22,65%                | 17,65%                | 16,65%                | 10,65%                |
| Rhodicare T®                        | 1      | 0,10%                 | 0,10%                 | 0,10%                 | 0,10%                 | 0,10%                 |
| EDTA disodique                      | 2      | 0,05%                 | 0,05%                 | 0,05%                 | 0,05%                 | 0,05%                 |
| NaCl                                | 2      | 0,70%                 | 0,70%                 | 0,70%                 | 0,70%                 | 0,70%                 |
| Propylene Glycol                    | 3      | 3,00%                 | 3,00%                 | 3,00%                 | 3,00%                 | 3,00%                 |
| Paratrexine®                        | 3      | 0,50%                 | 0,50%                 | 0,50%                 | 0,50%                 | 0,50%                 |
| Tinosorb® M                         | 4      | 10,00%                | 10,00%                | 10,00%                | 10,00%                | 10,00%                |
| Eusolex®UV Pearl                    | 4      | 20,00%                | 20,00%                | 20,00%                | 20,00%                | 20,00%                |
| Solaveil®CT-10W                     | 4      |                       | 2,50%                 | 7,50%                 | 7,50%                 | 7,50%                 |
| DC® 9011                            | 5      | 20,00%                | 20,00%                | 20,00%                | 20,00%                | 20,00%                |
| DC® 245                             | 5      | 15,00%                | 15,00%                | 15,00%                | 15,00%                | 15,00%                |
| DC® 2502                            | 5      | 5,00%                 | 5,00%                 | 5,00%                 | 5,00%                 | 5,00%                 |
| Paratrexine®                        | 5      | 0,50%                 | 0,50%                 | 0,50%                 | 0,50%                 | 0,50%                 |
| Z Cote® Max                         | 6      |                       |                       |                       | 1,00%                 | 1,00%                 |
| Escalol® 507                        | 6      |                       |                       |                       |                       | 6,00%                 |
| <b>Viscosité (mPa.s)</b>            |        |                       |                       |                       |                       |                       |
| Spindle                             | RPM    |                       |                       |                       |                       |                       |
| LV2                                 | 5      | 1668                  | 3077                  | 4265                  | 4389                  | Déphasage J1          |
| <b>Sprayabilité</b>                 |        | Oui                   | oui                   | Non                   | non                   |                       |
| (en pompe)                          |        |                       |                       |                       |                       |                       |
| <b>Stabilité étuve à 40°C</b>       |        | 2 mois : OK           | 2 mois : OK           | 2 mois : OK           |                       |                       |
| <b>Stabilité étuve à cycles</b>     |        | OK                    | OK                    | OK                    | OK                    |                       |
| <b>FPS estimé par calcul (Ciba)</b> |        | 26                    | 29                    | 33                    | 34                    |                       |

**Tableau 13:** Emulsion E/Si finale retenue

|                     |              |            |
|---------------------|--------------|------------|
| <b>Formulations</b> | <b>Phase</b> | Emul. E/Si |
| <b>N°Batch</b>      |              | 06E3101    |

**Ingrédients**

|                      |   |        |
|----------------------|---|--------|
| Eau Déminéralisée    | 1 | 15,95% |
| Rhodicare® T         | 1 | 0,10%  |
|                      |   |        |
| EDTA dissodique      | 2 | 0,05%  |
| NaCl                 | 2 | 0,70%  |
| Ronacare® Ectoine    | 2 | 0,50%  |
| Ronacare® Allantoïne | 2 | 0,20%  |
|                      |   |        |
| Propylene Glycol     | 3 | 3,00%  |
| Paratrexine®         | 3 | 0,50%  |
|                      |   |        |
| Tinosorb® M          | 4 | 10,00% |
| Eusolex® UV Pearl    | 4 | 20,00% |
| Solaveil® CT-10W     | 4 | 7,50%  |
|                      |   |        |
| DC® 9011             | 5 | 20,00% |
| DC® 245 fluid        | 5 | 15,00% |
| DC® 2502             | 5 | 5,00%  |
| Paratrexine®         | 5 | 0,50%  |
|                      |   |        |
| Z Cote® Max          | 6 | 1,00%  |

**Viscosité (mPa.s)**

Spindle RPM

|     |   |  |      |
|-----|---|--|------|
| LV2 | 5 |  | 2891 |
|-----|---|--|------|

**Sprayabilité**

(en pompe)

Oui

Stabilité étuve à 40°C

Mois 2 :OK

Stabilité étuve à cycles

OK

FPS estimé par  
calcul (Ciba)

34

### **V.1.2 Mise en aérosol**

Cette étape est délicate. En effet, l'addition de gaz propulseur peut provoquer une déstabilisation de l'émulsion par déstructuration de celle-ci. Certaines particules (comme les filtres inorganiques surtout) peuvent sédimenter. En effet, la viscosité des produits va diminuer fortement par l'ajout de gaz sous forme liquide. L'aérosol peut alors être secoué avant l'emploi mais les particules ne peuvent pas sédimenter trop vite pour permettre l'application du produit.

La 1<sup>ère</sup> étape consiste à introduire les produits dans un boîtier en verre, ce qui nous permet de visualiser le comportement de chacune des formulations avec le gaz. Celles qui sont incompatibles ou non miscibles au gaz sont tout de suite rejetées.

La 2<sup>ème</sup> étape consiste à mettre les produits dans un boîtier métallique. Le choix s'est porté sur des boîtiers en aluminium car ceux en fer présentent le risque de rouiller plus vite et facilement car les formules contiennent de l'eau dans leur phase interne.

#### **V.1.2.1 Appareillage et méthode de fabrication**

Le remplissage des aérosols s'effectue sous vide puis sous pression. En effet, le gaz sera alors sous forme liquide. Il s'effectue à l'aide d'une machine de remplissage COSTER de type 530S/25CD (Milan, Italie). Le procédé est manuel, et il se réalise à l'aide de pompes pneumatiques dont l'alimentation générale nécessite une pression de 10 bars.

La 1<sup>ère</sup> opération consiste au soufflage d'air et à l'aspiration du boîtier permettant d'éliminer les poussières et débris à l'intérieur du boîtier. Ceci est réalisé grâce à une soufflerie créée par de l'air comprimé. Le boîtier (en verre pour les essais préliminaires et en aluminium pour les autres essais) est ensuite rempli avec la quantité prescrite d'émulsion.

Le boîtier est ensuite serti avec la valve choisie au préalable. Pour cela, le diamètre de sertissage doit être réglé sur l'appareil, il est ajusté en fonction de la valve et du type de boîtier à l'aide d'un pied à coulisse.

Le dégazage sous vide est ensuite réalisé en vue d'éviter les surpressions dues à l'air résiduel. Cette opération ne se pratique pas avec les gaz comprimés ni quand le contenu n'est pas sensible à l'oxydation. Le gaz propulseur est ensuite incorporé dans le boîtier sous une pression de 3,2 bars au travers de la valve. Cette opération s'effectue par passage du propulseur dans le sens contraire du fonctionnement de la valve et sous l'action d'un moteur pneumatique dont le fonctionnement ne dépend pas du circuit de l'alimentation générale en gaz. La mesure de la quantité introduite se fera par la différence du poids avec et sans gaz.

Les diffuseurs et les capuchons sont choisis en dernier lieu en fonction du type de jet que l'on veut et du type de produit que l'on a.

#### V.1.2.2 Choix du gaz et du conditionnement

##### ∞ Choix du gaz

Les gaz liquéfiés les plus utilisés sont le diméthylether (DME) et le LPG (mélange de butane, propane et isobutane). Ils ont été testés tous les deux afin de voir leur comportement vis-à-vis des émulsions.

##### ∞ Boîtier en verre

Dans un premier temps, le remplissage en aérosol a été réalisé dans des boîtiers en verre pour permettre de visualiser le comportement des émulsions avec le gaz. La miscibilité des émulsions au gaz, le temps de sédimentation ainsi que la capacité de redispersion des émulsions dans le gaz ont été examinés. Les résultats observés sont résumés dans le tableau 14.

##### ∞ Boîtier en aluminium

Le conditionnement dans ce type de boîtier dépend des observations effectuées lors de la mise en aérosol préliminaire dans les boîtiers en verre. En effet, lorsque les émulsions ont montré une bonne miscibilité avec le gaz et que leur redispersion dans celui-ci se faisait aisément, les émulsions étaient alors conditionnées dans des boîtiers en aluminium.

La miscibilité avec le gaz est une caractéristique importante pour permettre de faire sortir du boîtier la même quantité de produit à chaque pulvérisation. La mise en aérosol a été testée sur chaque type d'émulsion avant et après l'ajout des filtres solaires et des ingrédients actifs.

**Tableau 14** : Résumé des résultats des mises en aérosol préliminaires

| Formules N° | Type d'émulsion           | Stabilité émulsion |            | DME | LPG | Remarques/Comportements   |
|-------------|---------------------------|--------------------|------------|-----|-----|---|
|             |                           | Etuve cycles       | Etuve 40°C |     |     |   |
| 06C2102     | E/H<br>Sans filtres       | OK                 | OK         | 25% |     | Non miscible. Même après forte agitation  |
| 06C2102     | E/H<br>Sans filtres       | OK                 | OK         |     | 8%  | Bonne miscibilité. Sédimentation après 2 jours. Facilement remis en suspension par simple agitation. Mais pas assez de pression pour permettre de faire un beau jet |
| 06E1702     | E/H<br>Avec filtres       | OK                 | OK         |     | 20% | Bonne miscibilité. Sédimentation après 1 jour. Facilement remis en suspension par simple agitation  |
| 06E2902     | E/H<br>Filtres+P.Actifs   | OK                 | OK         |     | 36% | Non miscible car trop de gaz  |
| 06E2902     | E/H<br>Filtres+P.Actifs   | OK                 | OK         |     | 25% | Bonne miscibilité. Sédimentation après 1 jour. Facilement remis en suspension par simple agitation  |
| 06C3101     | E/Si<br>Sans filtres      | OK                 | OK         | 25% |     | Non miscible. Même après forte agitation  |
| 06C3101     | E/Si<br>Sans filtres      | OK                 | OK         |     | 8%  | Bonne miscibilité. Sédimentation après 2 jours. Facilement remis en suspension par simple agitation. Mais pas assez de pression pour permettre de faire un beau jet |
| 06E1201     | E/Si<br>Avec Filtres      | OK                 | OK         |     | 20% | Bonne miscibilité. Sédimentation du TiO2. Facilement remis en suspension par simple agitation   |
| 06E3101     | E/Si<br>Filtres+P.Actifs  | OK                 | OK         |     | 36% | Non miscible car trop de gaz  |
| 06E3101     | E/Si<br>Filtres+ P.Actifs | OK                 | OK         |     | 25% | Bonne miscibilité. Sédimentation du TiO2. Facilement remis en suspension par simple agitation   |

Les deux types de gaz les plus couramment utilisés ont été testés : le DME et le LPG. Le DME, de par sa grande polarité, n'était miscible ni avec l'émulsion E/H, ni avec l'émulsion E/Si. Il a donc été écarté et les autres tests ont été réalisés avec le LPG.

Différentes concentrations en gaz, exprimées en % par rapport à la quantité en émulsion, ont été testées (concentrations de 8% à 36%). Les deux types d'émulsion ont montré le même comportement vis-à-vis du LPG. Les concentrations trop faibles

(8%) ne permettent pas d'avoir une pression suffisante à l'intérieur du boîtier pour permettre au produit d'être pulvérisé à l'extérieur du boîtier sous la forme d'une brume. Les fortes concentrations en gaz augmentent de façon importante la tension de vapeur à l'intérieur du boîtier, ce qui empêche le gaz de se mélanger aux émulsions. Les concentrations idéales en gaz se situent entre 20 et 25% pour permettre une bonne miscibilité avec le gaz, et une redispersion facile de l'émulsion dans celui-ci par simple agitation. La concentration finale est choisie en fonction de l'étude réalisée sur la taille des gouttelettes à la sortie du boîtier (Cf. Partie V.1.3).

#### ∞ *Choix des valves et des diffuseurs*

Le choix des valves, des diffuseurs et de la concentration en gaz est définitif après avoir effectué les tests de tailles des gouttelettes en fonction des différents paramètres étudiés (Cf. Partie V.1.3).

La valve est choisie en fonction du type de produit de départ. En effet, certains matériaux ne sont pas compatibles avec l'eau ou les silicones, certaines valves sont plus adaptées pour les poudres ou les formes liquides. De plus, il ne faut pas oublier de considérer la forme du produit final que l'on veut obtenir (brume, mousse) ainsi que la taille des gouttelettes. Après étude des différentes possibilités, la valve choisie dans un premier temps a été la suivante : KPM 125-54 (Coster, Italie). D'autres types de valves sont choisis par la suite pour effectuer des essais de leur influence sur la taille des gouttelettes.

Les diffuseurs ont été sélectionnés en fonction de leur composition (comme les valves), de leur compatibilité avec les formulations et de leur capacité à diffuser l'émulsion. En effet, certains diffuseurs provoquent la formation de mousse à la sortie du spray, ce qui ne convient pas pour notre application. Les diffuseurs qui ont été sélectionnés dans un premier temps étaient : V04735BC/NR et V04566BC/NR (Coster, Italie). La différence se situe dans leur forme et leur matériau, ainsi que le diamètre de l'ouverture de l'orifice de sortie du produit.

Les valves et les diffuseurs définitifs seront choisis à la fin de l'étude de taille des gouttelettes.

### **V.1.3 Etude de l'influence de différents paramètres sur la taille et la distribution de la taille des gouttelettes**

#### V.1.3.1 Introduction

Le but de cette partie du travail a été d'évaluer l'influence possible de différents paramètres physico-chimiques (la concentration en filtres solaires, la viscosité, la concentration en gaz, le type de valve et de diffuseur) sur la taille et la distribution de taille des gouttelettes des émulsions solaires formulées auparavant.

La mesure de la taille des gouttelettes est un paramètre non négligeable pour le développement des formulations et pour le choix des dispositifs à utiliser. Cette détermination est aussi utile pour le contrôle de la qualité des produits. De plus, elle permet de vérifier que les gouttelettes ne puissent pas se déposer au niveau du tractus respiratoire. En effet, certaines matières lipidiques et huileuses de diverses origines ont démontré une toxicité aiguë au niveau des alvéoles pulmonaires. Cette toxicité se manifeste principalement par des pneumonies lipoides caractérisées par des œdèmes, de la fibrose et des réactions inflammatoires diverses dans la région alvéolaire (Skyberg et col., 1990 ; Spickard et Hirshmann, 1994). Il faut donc être vigilant à la taille des gouttelettes qui doit être comprise entre 10  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$  pour avoir un risque minimum. En effet, les particules qui ont des tailles comprises entre 5  $\mu\text{m}$  et 30  $\mu\text{m}$  sont largement déposées dans la région nasopharyngée; la majorité des particules ayant des tailles comprises entre 1  $\mu\text{m}$  et 5  $\mu\text{m}$  vont passer la barrière nasopharyngée pour aller se déposer dans la région trachéo-bronchiale (Zanen et col., 1994 ; Zanen et col., 1996 ; Elverson et col., 2003). Enfin, les particules ayant une taille de l'ordre de 0,5  $\mu\text{m}$  vont pénétrer les alvéoles pulmonaires et s'y déposer par diffusion (Heyder et col., 1986 ; Bosquillon et col., 2004).

Afin d'obtenir une sécurité totale, il convient donc de considérer que les gouttelettes doivent avoir une taille d'au moins 30  $\mu\text{m}$  de diamètre et pas plus de 1% des gouttelettes ne peuvent avoir un diamètre inférieur ou égal à 10  $\mu\text{m}$ . Cette sécurité est valable pour les produits à base de silicone mais nous avons considéré qu'il était préférable de l'appliquer pour tous les produits cosmétiques sous forme aérosol, afin d'éviter tout dommage au niveau du système respiratoire (SEHSC, 2001).

### V.1.3.2 Matériel et méthodes

L'évaluation de la taille des gouttelettes a été réalisée à l'aide du Spraytec® (Cf. Partie IV.2.2.1).

Les différents paramètres ont été étudiés sur les émulsions préparées précédemment et dont la formule a été ou non modifiée selon les paramètres étudiés. L'influence de la concentration en gaz ainsi que celle des valves et des diffuseurs ont été testées sur les deux émulsions E/H (06E23101) et E/Si (06E2902). L'influence de la concentration en filtre inorganique a été évaluée sur l'émulsion E/H modifiée (Cf. Partie V.1.3.3.2). L'influence de la viscosité a été étudiée sur l'émulsion E/Si modifiée par l'utilisation de différentes silicones (Cf. Partie V.1.3.3.3).

### V.1.3.3 Les différents paramètres étudiés

Dans chaque cas, la taille et la distribution de taille des gouttelettes ont été analysées.

#### *V.1.3.3.1 Concentration en gaz*

Les concentrations en LPG dans le boîtier ont été progressivement augmentées et étudiées sur les 2 types d'émulsions E/H et E/Si: 22%, 27%, 32%, 37% et 42%. Cette dernière concentration a été choisie afin de vérifier l'évolution de la taille des gouttelettes lorsque le gaz n'est pas totalement miscible avec l'émulsion.

#### *V.1.3.3.2 Les concentrations en filtres inorganiques (TiO<sub>2</sub> et ZnO)*

L'étude de ce paramètre a été réalisée uniquement sur l'émulsion E/H pour des raisons de faisabilité. Les concentrations en filtres inorganiques utilisées étaient les suivantes : 0%, 1%, 2%, 3%, 4%. Les deux filtres inorganiques étaient le TiO<sub>2</sub> et le ZnO. Le TiO<sub>2</sub> utilisé était une dispersion aqueuse à 50% de dioxyde de titane micronisé (Solaveil CT 10W - Uniqema, RU) (Cf. Partie IV.1.1). La concentration en TiO<sub>2</sub> a été augmentée progressivement de 0% à 3%. Cette dernière concentration

étant la concentration maximale en  $\text{TiO}_2$  qui permet d'avoir une émulsion finale stable. Lorsque la concentration en  $\text{TiO}_2$  de 3% était atteinte, 1% de ZnO (Z-Cote<sup>®</sup>Max - BASF, Allemagne) a été incorporé afin d'obtenir une concentration finale en filtre inorganique de 4%.

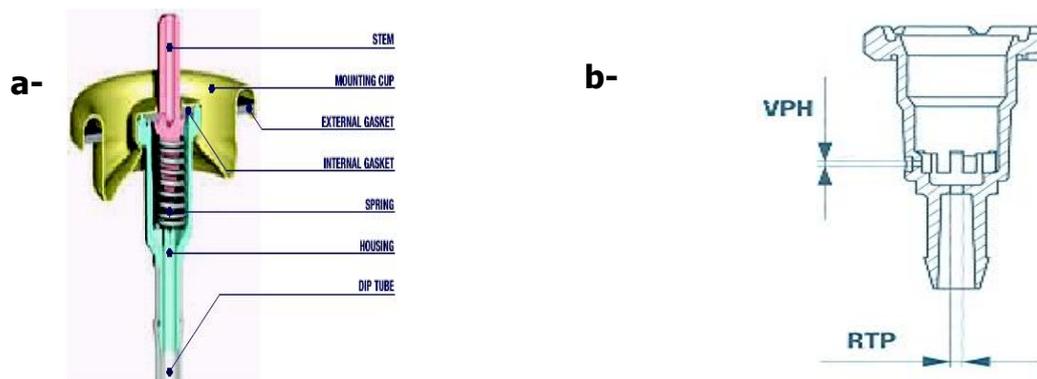
#### V.1.3.3.3 Viscosité

Des solutions de diméthicone fluides (DC 200<sup>®</sup>-Dow Corning, Seneffe, Belgique) de différentes viscosités ont été utilisées pour préparer l'émulsion E/Si afin d'obtenir des émulsions ayant des viscosités finales comprises entre 3000 mPa.s et 6500 mPa.s (Tige LV3 ; vitesse de rotation: 20 rpm). Les silicones utilisées pour l'étude de ce paramètre avaient les viscosités suivantes : 5 cts, 50 cts, 100 cts, 350 cts et 500 cts.

#### V.1.3.3.4 Valves et diffuseurs

Différents types de valves et de diffuseurs (Coster, Milan, Italie) qui sont utilisés en mode spray continu ont été testés sur les émulsions E/H. Toutes les valves utilisées étaient des valves à presser vers le bas avec un spray continu : la pression sur le gicleur provoque l'ouverture du système de diffusion. Ces valves sont équipées d'un corps de valve pour remplissage rapide dans lesquels les diamètres des orifices permettant le passage plus rapide du produit (RTP=Rapid Transport Product) ont des dimensions variables (Figure 52). Les valves utilisées avaient un orifice de phase vapeur (VPH=Vapor Phase Hole), communément utilisé pour que de petites quantités de gaz en phase vapeur s'ajoutent au fluide liquide. Ceci provoque une cassure plus fine des gouttelettes.

Le tableau 15 résume les caractéristiques de chaque valve utilisée. La valve KPM 150P.657 ne possédait pas de RTP.

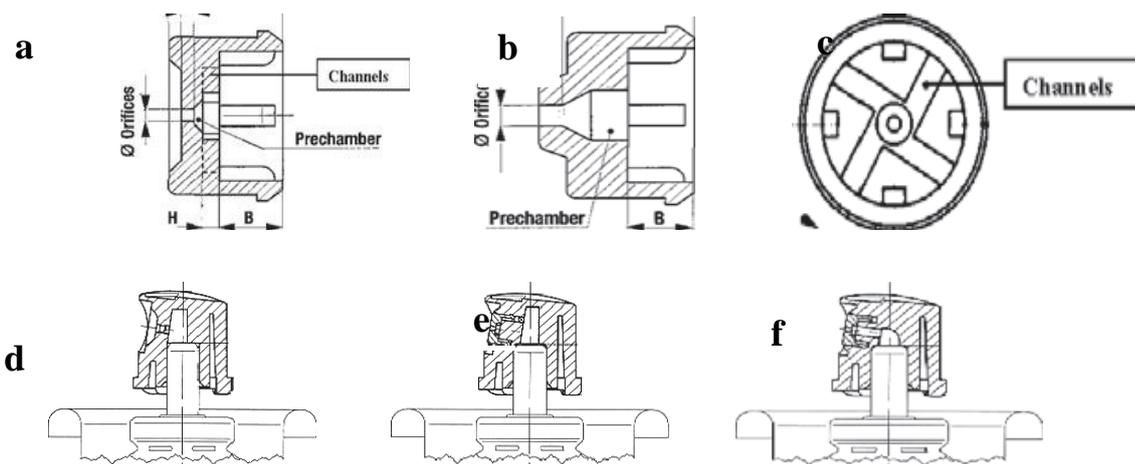


**Figure 52:** Schéma d'une valve KPM **(a)** et d'un corps de valve possédant un RTP et un VPH **(b)** (Coster, 2005)

**Tableau 15:** Caractéristiques des valves utilisées

| Dénomination des valves | Type                  | Diamètre de l'orifice permettant le passage du produit (RTP) (mm) |
|-------------------------|-----------------------|---|
| 1                       | KPM 150P.657          | Non présent   |
| 2                       | KPM 150P RA 657/05/08 | 0,8   |
| 3                       | KPM 150P RA 657/05/12 | 1,2   |
| 4                       | KPM 150P RA 657/05/20 | 2,0   |

Le diffuseur est le mécanisme final du fonctionnement de l'aérosol qui se fixe sur le gicleur et qui est disponible en différentes tailles et formes. Les diffuseurs sont utilisés pour dispenser le produit. Ils sont différents au niveau du diamètre de leurs orifices et du type d'insert utilisé: microbrume ou directionnel (Figure 53 et Tableau 16). Ils ont des canaux dont la disposition permet la dispensation du produit sous différentes formes (brume plus ou moins fine, angle de dispensation plus ou moins grand).



**Figure 53:** Structure d'un insert microbrume **(a)**, structure d'un insert directionnel **(b)**, vue arrière d'un insert microbrume **(c)**, et insertion du diffuseur sur la valve sans insert **(d)**, avec un insert microbrume **(e)** et avec un insert directionnel **(f)**

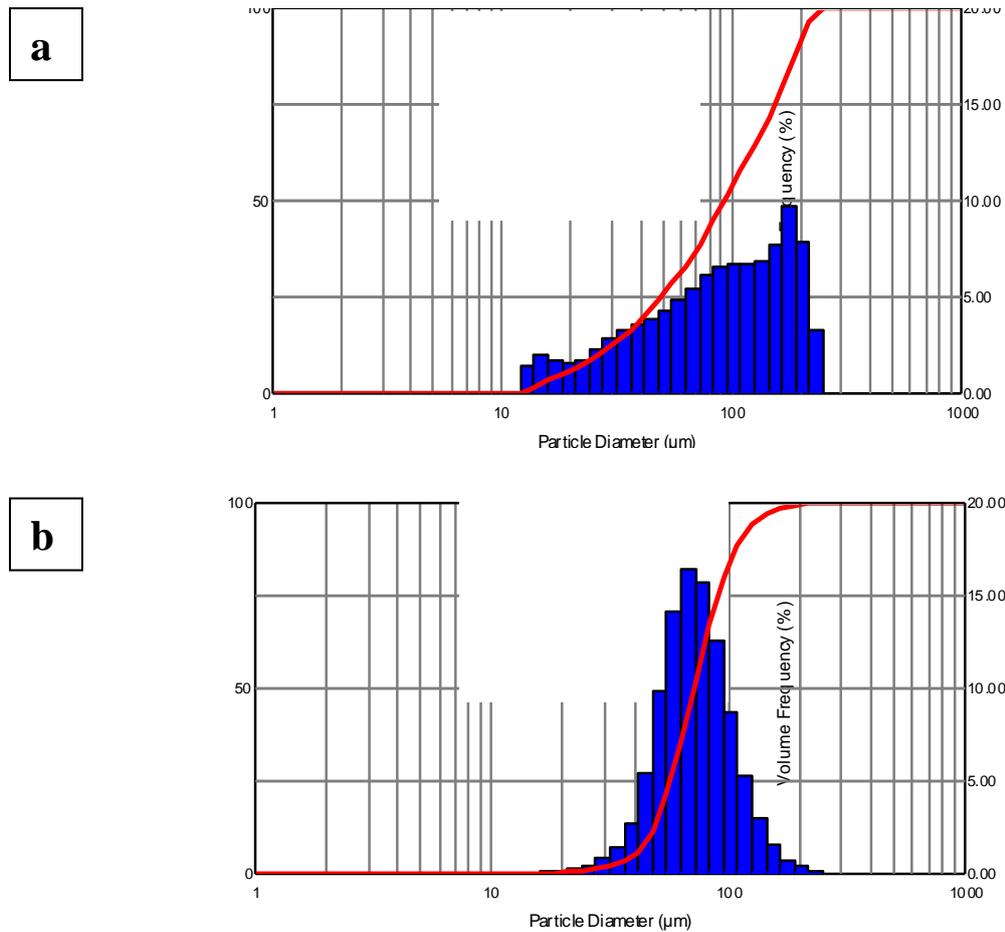
**Tableau 16:** Caractéristiques des diffuseurs

| Dénomination des diffuseurs | Type                 | Type d'insert       | Diamètre des canaux des inserts microbrume (mm) | Diamètre des orifices de sortie du produit (mm) |
|-----------------------------|----------------------|---------------------|---|---|
| 1                           | V04.721 GL-CWUG89/LL | Insert directionnel | -   | 0,5   |
| 2                           | V04.761 BC/BC        | Insert microbrume   | 0,7   | 0,55  |
| 3                           | V04.721 BC/LL        | Insert microbrume   | 0,5   | 0,6   |
| 4                           | V04.771 BC/BC        | Insert directionnel | -   | 0,65  |

En fonction des différents types de valves et de diffuseur, l'insertion de celui-ci sur la valve est différente (Figure 53) et le modèle de spray sera aussi différent. En sélectionnant correctement l'insert, il est possible de produire une grande diversité de modèles de spray qui seront plus ou moins bien appropriés à la production du produit souhaité.

Les valves et les diffuseurs employés ont été modifiés uniquement lors de l'étude de leur influence sur la génération des gouttelettes. Pour les autres expérimentations, la valve KPM 125-54 et le diffuseur V04.4735BC/NR (sans insert) ont été utilisés.

### V.1.3.4 Résultats et discussion



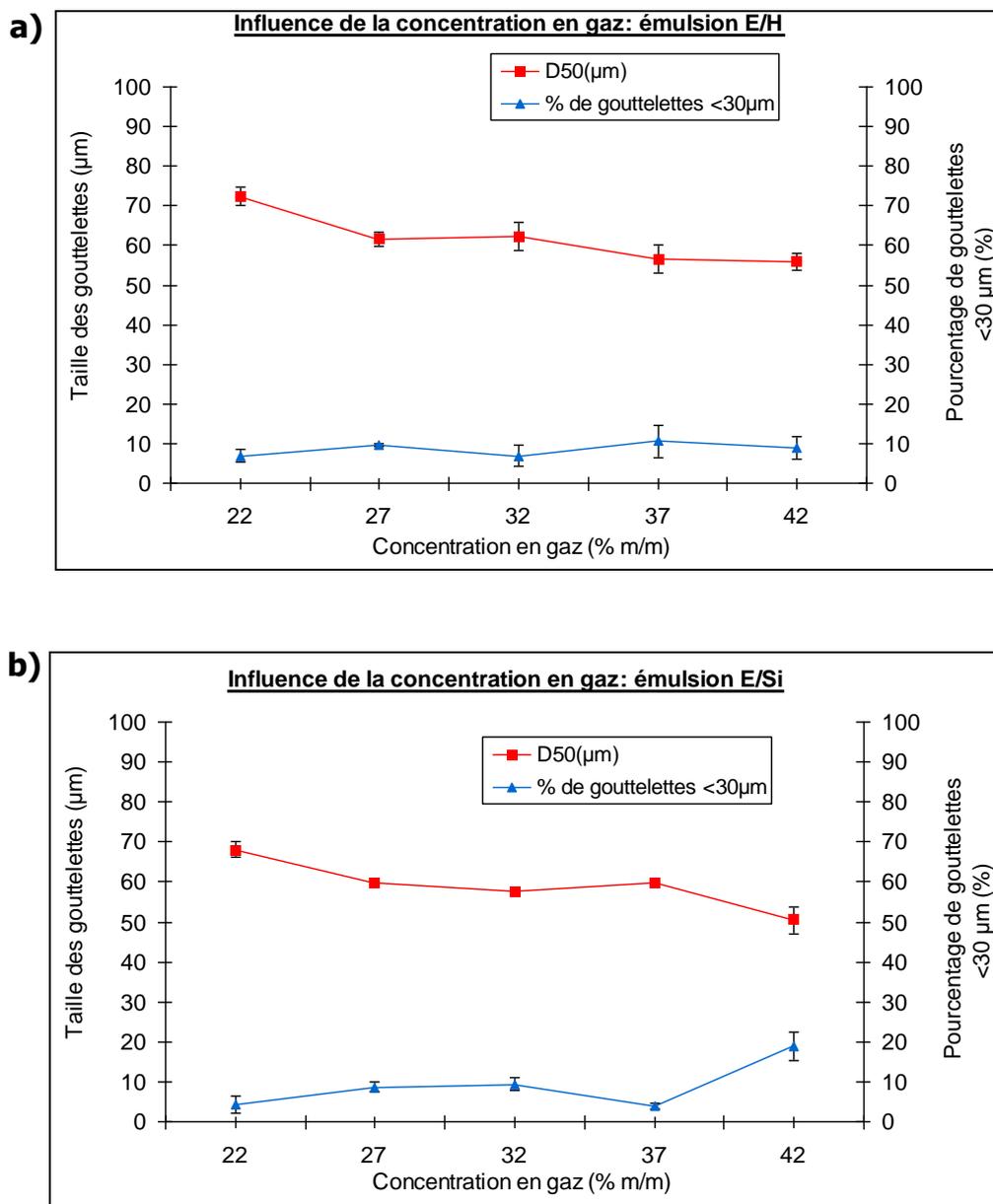
**Figure 54 :** Courbes de distribution de taille obtenues avec 22% de gaz pour l'émulsion E/Si à **a**-1cm et **b**-11cm. (Valve KPM 150P 1803, diffuseur V05.1301)

La distance de mesure entre le laser et le diffuseur était de 11 cm pour toutes les expériences. Bien que pour ce type d'expérience il soit conseillé de réaliser les mesures à une distance de 30 cm du laser, celle de 11 cm a été choisie. En effet, nous avons estimé qu'elle représentait la distance la plus appropriée lors d'une utilisation normale par les consommateurs.

Les résultats obtenus à une distance de 1 cm n'étaient pas valides et nous avons uniquement analysé les résultats obtenus avec la distance de 11 cm. Les distributions de taille étaient plus étroites à cette distance (Figure 54). En effet, les gouttelettes sont moins individualisées lorsque l'intervalle entre le spray et le laser est plus court. Ceci est causé par le temps insuffisamment long pour atteindre l'atomisation

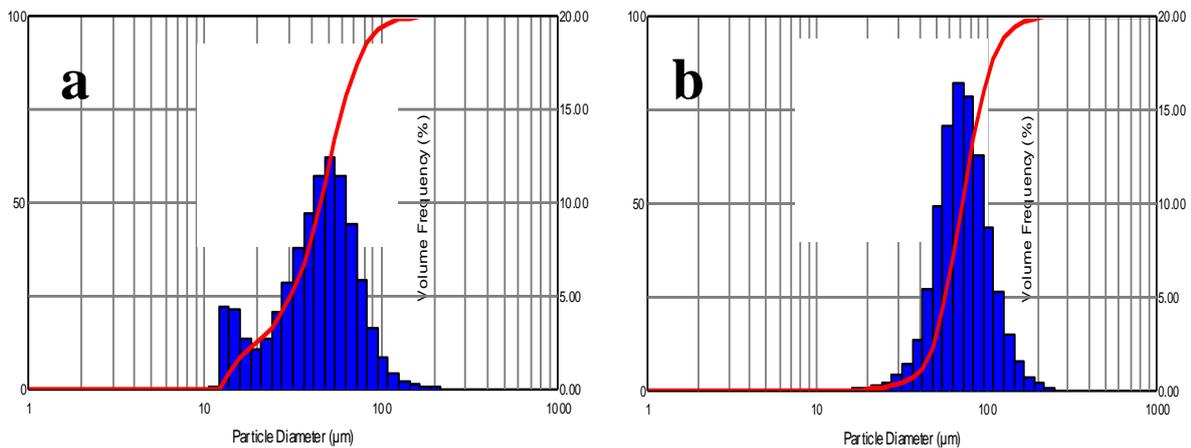
complète. Cette différence de résultats entre les deux distances était aussi due à une concentration élevée de particules à la sortie du spray. De plus, l'évaporation du gaz et d'une infime partie d'eau, due à l'atomisation et au passage à grande vitesse dans l'air des gouttelettes lorsque l'on s'éloigne de la sortie de l'aérosol, contribue également à créer cette différence de taille des gouttelettes.

#### V.1.3.4.1 Influence de la concentration en gaz



**Figure 55 :** Influence de la concentration en gaz sur la taille des gouttelettes dans l'émulsion **a-** E/H et **b-** E/Si (n=5). (Valve KPM 150P 1803, diffuseur V05.1301)

Pour l'émulsion E/H, la taille des gouttelettes variait de  $72,4 \pm 2,2 \mu\text{m}$  à  $55,8 \pm 1,0 \mu\text{m}$  (Figure 55a) alors que la taille des gouttelettes variait de  $68,1 \pm 2,0 \mu\text{m}$  à  $50,4 \pm 3,4 \mu\text{m}$  pour l'émulsion E/Si (Figure 55b). Lorsque la concentration en gaz augmentait de 22% à 42%, la taille des gouttelettes diminuait et la pression dans l'aérosol augmentait. Ainsi, aux concentrations plus élevées, l'atomisation des gouttelettes était plus importante pendant la pulvérisation et des gouttelettes plus fines pouvaient apparaître. Cependant, le pourcentage de gouttelettes avec un diamètre inférieur à  $10 \mu\text{m}$  était en-dessous de 0,1% même avec 42% de gaz. Lorsque le  $D(0,5)$  augmentait, le pourcentage de gouttelettes dont le diamètre était inférieur à  $30 \mu\text{m}$  diminuait et inversement. En effet, plus la taille des gouttelettes augmente, plus la proportion de fines gouttelettes diminue.



**Figure 56:** Courbes de distribution de taille pour l'émulsion E/Si avec **a-** 42% de gaz et **b-** 22% de gaz. (Valve KPM 150P 1803, diffuseur V05.1301)

Les distributions de taille des gouttelettes sont représentées sur la figure 56 pour l'émulsion E/Si. Le même profil de courbe a été observé pour l'émulsion E/H. Nous pouvons remarquer une distribution de taille unimodale et étroite pour les concentrations en gaz allant de 22% à 37%, en effet, la distribution de taille des gouttelettes avec ces deux concentrations en gaz étaient comparables. Lorsque celles-ci étaient plus élevées et atteignaient la concentration de 42%, la distribution de taille des gouttelettes était plus large avec la présence d'une population de

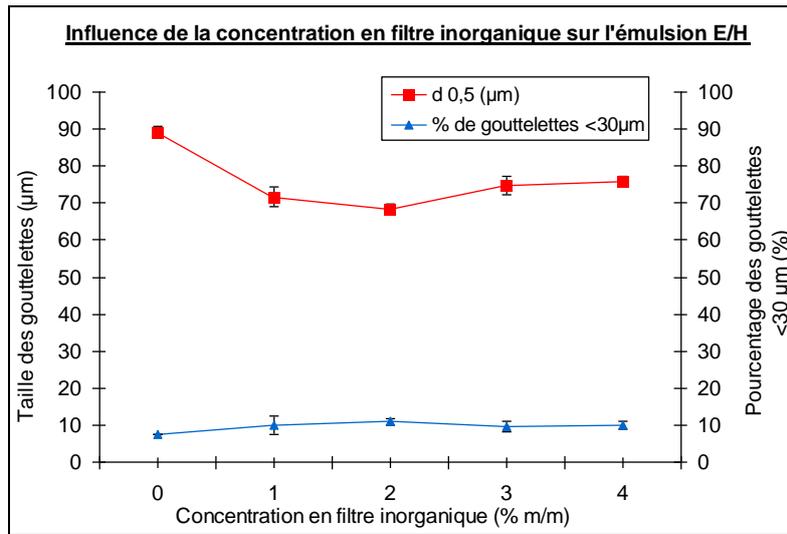
gouttelettes dont la taille était comprise entre 10  $\mu\text{m}$  et 20  $\mu\text{m}$ . Une fraction de gouttelettes de plus petite taille était générée lorsque la concentration en gaz atteignait 42%. Ceci était probablement dû à la haute pression associée aux grandes concentrations en gaz qui provoquaient une sortie rapide du produit hors de l'aérosol générant ainsi une deuxième population de gouttelettes ayant une taille plus fine. De plus, la miscibilité plus faible du produit au gaz lorsque celui-ci est présent en grande quantité empêche également une sortie de produit uniforme.

La concentration en gaz a été fixée à 22% pour la suite des expériences. En effet, celle-ci permettait d'avoir un spray homogène et uniforme tout en ne permettant pas l'apparition d'une deuxième population de gouttelettes plus fines (Figure 56), ce qui n'est pas souhaité afin de garder une sécurité maximale du produit fini. De plus, cette concentration minimale est préférée afin d'avoir une plus grande quantité de produit solaire dans le boîtier.

#### V.1.3.4.2 Influence de la concentration en filtre inorganique

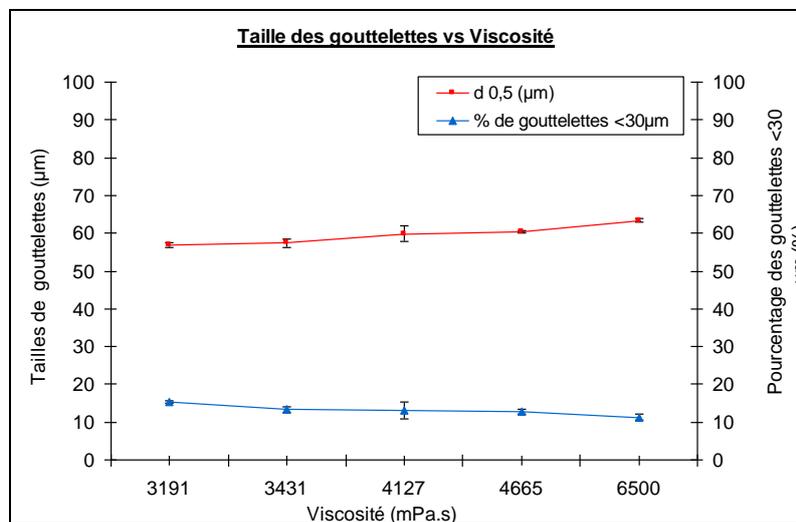
Les concentrations totales en filtres inorganiques variaient de 0% à 4% (0%= pas de filtre ; 1%=1% de  $\text{TiO}_2$  ; 2%=2% de  $\text{TiO}_2$  ; 3%=3% de  $\text{TiO}_2$  ; 4%=3% de  $\text{TiO}_2$  + 1% de  $\text{ZnO}$ ). L'émulsion étudiée ici était l'émulsion E/H. Le D (0,5) diminuait de  $89,2 \pm 1,7 \mu\text{m}$  à  $68,2 \pm 1,4 \mu\text{m}$  lorsque la concentration en filtre solaire atteignait 2%. Une augmentation de la taille des gouttelettes à partir de 3% de filtre inorganique ainsi que leur stabilisation à partir de cette concentration a été également observé (Figure 57). La présence de particules insolubles à des concentrations supérieures à 2% pouvait provoquer leur agglomération et ainsi augmenter la taille des particules pulvérisées.

Le pourcentage de gouttelettes avec un diamètre inférieur à 10  $\mu\text{m}$  était en-dessous de 0,1% en présence de filtres inorganiques. La distribution de taille était plus étroite lorsque les filtres inorganiques étaient présents dans les formulations. Cette différence était probablement due à la présence de particules solides qui augmentent la cohésion des gouttelettes. Cependant, la concentration en filtres inorganiques n'influait pas le profil des courbes de distribution de tailles.



**Figure 57 :** Influence de la concentration en filtre inorganique sur la taille des gouttelettes dans l'émulsion E/H (n=5). (Valve KPM 150P 1803, diffuseur V05.1301)

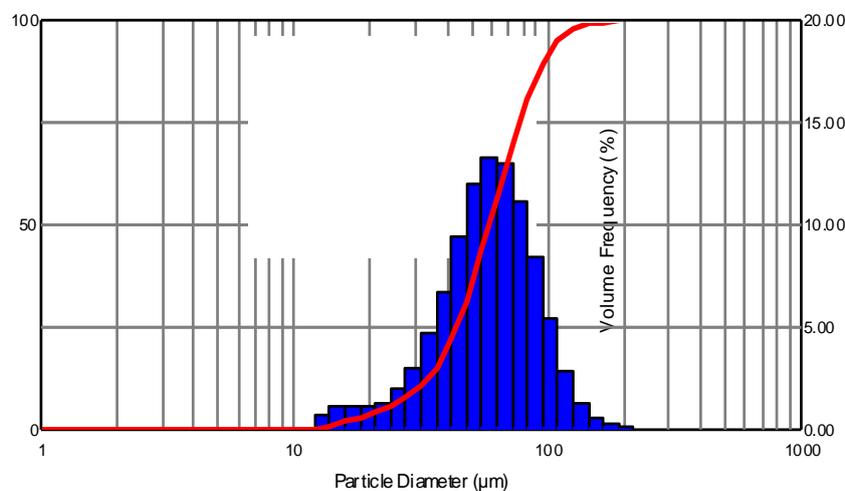
V.1.3.4.3 Influence de la viscosité



**Figure 58:** Influence de la viscosité sur la taille des gouttelettes dans l'émulsion E/Si (n=5) (Valve KPM 150P 1803, diffuseur V05.1301)

Cette étude a été réalisée sur l'émulsion E/Si avec des viscosités allant de 3000 mPas à 6500 mPas. En effet, grâce aux multiples choix possibles de silicones, il était aisé de modifier la viscosité de cette émulsion.

La taille des gouttelettes augmentait de 55  $\mu\text{m}$  à 65  $\mu\text{m}$  avec l'augmentation de la viscosité (Figure 58). En effet, la taille des gouttelettes générées augmente avec la tension superficielle de la dispersion pulvérisée. Elle augmente également avec la viscosité, car la pression nécessaire pour former des gouttelettes de plus petite taille est plus grande. La taille des gouttelettes augmente donc également avec la viscosité (Leong, 2004).



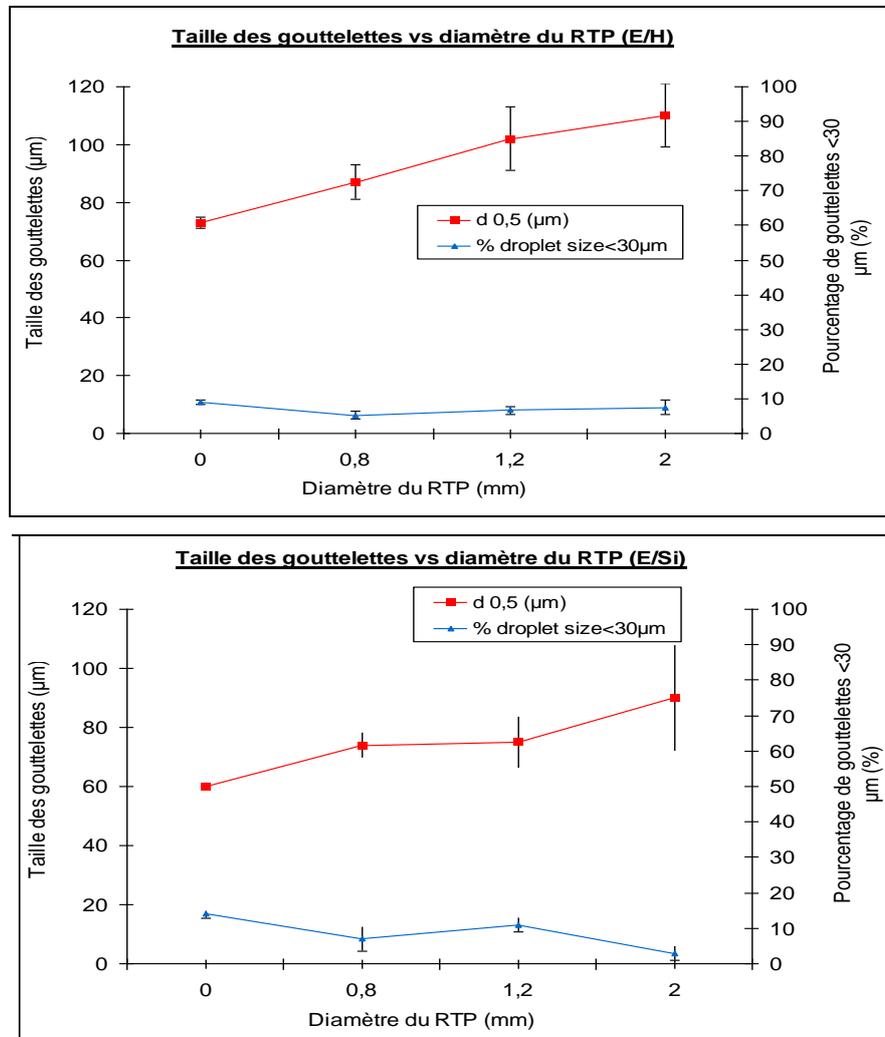
**Figure 59:** Courbe de distribution de taille de l'émulsion E/Si (4200 mPa.s). (Valve KPM 150P 1803, diffuseur V05.1301)

Le pourcentage de gouttelettes avec un diamètre inférieur à 10  $\mu\text{m}$  était en-dessous de 0,1% même aux plus faibles viscosités. Les distributions de taille étaient unimodales pour tous les produits. De plus, la viscosité n'influait pas le profil des courbes de distribution des tailles et donc ne provoquait pas l'apparition de fines gouttelettes. La figure 59 montre un exemple de profil.

#### V.1.3.4.4 Influence des valves et des diffuseurs

Ces paramètres ont été étudiés sur les deux types d'émulsions: E/H (06E3101) et E/Si (06E2902). L'étude de l'influence des valves a été réalisée avec celles décrites

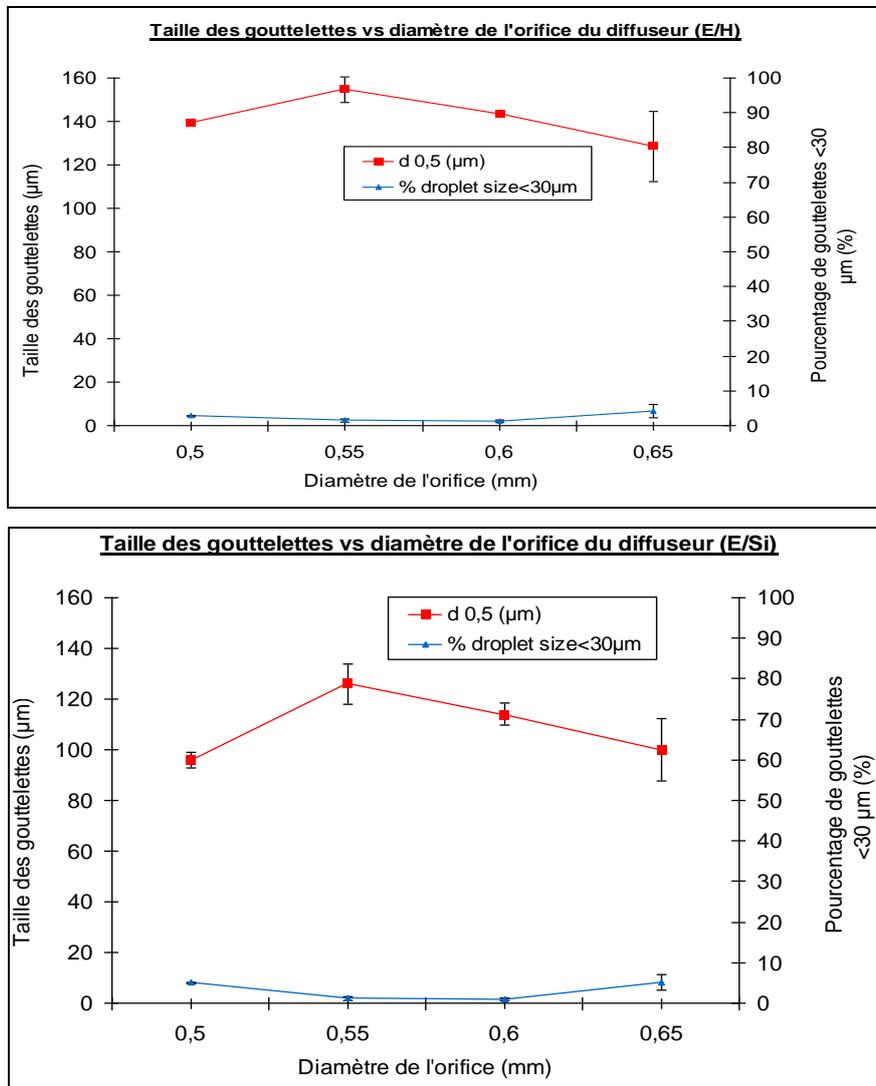
dans le tableau 15, le diffuseur restant identique pour toutes les mesures (V04.771 BC/BC avec insert directionnel). L'étude de l'influence du diffuseur a été menée avec ceux décrits dans le tableau 16, la valve restant la même tout au long de l'expérimentation (KPM 150P RA 657/05/20).



**Figure 60** : Influence du diamètre de RTP des valves sur la taille des gouttelettes (Valves en spray continu avec VPH (tableau 15); Diffuseur: V04.771 BC/BC avec insert directionnel) (Emulsion E/H et Emulsion E/Si) (n=5)

Le D(0,5) augmentait de  $73,6 \pm 2,7 \mu\text{m}$  à  $110,2 \pm 11,6 \mu\text{m}$  pour l'émulsion E/H et de  $60,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$  à  $90,6 \pm 17,9 \mu\text{m}$  pour l'émulsion E/Si, lorsque le diamètre de l'orifice permettant le passage rapide du produit (RTP) augmentait (Figure 60). Par contre, il diminuait de  $154,7 \pm 6,0 \mu\text{m}$  à  $128,6 \pm 1,2 \mu\text{m}$  pour l'émulsion E/H et de  $126,2 \pm 8,2 \mu\text{m}$

à  $96,1 \pm 4,5 \mu\text{m}$  pour l'émulsion E/Si lorsque le diamètre de l'orifice des diffuseurs augmentait (Figure 61).



**Figure 61:** Influence du diamètre de l'orifice des diffuseurs et de la configuration interne des diffuseurs sur la taille des gouttelettes (Diffuseurs avec orifice de 0,5 à 0,65 mm de diamètre (Tableau 16) ; Valve en spray continu KPM 150P RA 657/05/20) (Emulsion E/H et Emulsion E/Si) (n=5)

Le taux de délivrance de produit augmentait avec le diamètre du RTP lorsque le diamètre du VPH était le même au cours de l'expérience. Ainsi, la quantité de gaz en phase vapeur s'ajoutant au fluide et provoquant une cassure plus fine des gouttelettes n'augmentait pas en même temps que le taux de délivrance du produit.

Ceci avait pour conséquence une augmentation de la taille des gouttelettes. La valve 4 (KPM 150P RA 657/05/20) a ainsi été sélectionnée car elle montrait les tailles de gouttelettes les plus grandes.

Le diamètre de l'orifice des diffuseurs n'était pas le seul paramètre qui déterminait les performances de production du spray. En effet, la configuration interne du diffuseur jouait un rôle dans la forme du spray final. C'est pour cela que la taille des gouttelettes n'était pas modifiée proportionnellement au diamètre de l'orifice du diffuseur, ce qui explique les courbes non linéaires des  $D(0,5)$  de chaque émulsion de la figure 61. Ainsi, un insert microbrume procurait au produit un important tourbillonnement lorsque le diffuseur était actionné. Ceci pouvait provoquer un rapprochement des gouttelettes et une augmentation de la taille de celles-ci. En effet, dans l'exemple de l'émulsion E/H, lorsque l'insert microbrume était présent, le  $D(0,5)$  passait de  $143,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$  à  $154,7 \pm 5,9 \mu\text{m}$ . De plus, le diamètre des canaux de l'insert microbrume était plus grand pour le diffuseur 2 (0,7 mm) que pour le diffuseur 3 (0,5mm), ceci provoque une cassure moins importante des gouttelettes et donc une taille plus grande de celles-ci (par exemple, pour l'émulsion E/Si, nous observons une augmentation de la taille des gouttelettes de  $114,4 \pm 3,2 \mu\text{m}$  pour le diffuseur 3 à  $126,2 \pm 8,2 \mu\text{m}$  pour le diffuseur 2). Le diffuseur 3 (V04.721 BC/LL) a ainsi été sélectionné car la taille des gouttelettes est plus grande que celles obtenues avec les inserts directionnels mais elles sont plus fines que celles obtenues avec le diffuseur 2, ce qui donne un spray plus fin.

D'une manière générale, une légère différence entre les deux types d'émulsion a été observée. Celle-ci était due à leur différence de viscosité : la viscosité de l'émulsion E/H (6887 mPa.s, LV3, 5 rpm) était plus élevée que celle de l'émulsion E/Si (2891 mPa.s, LV2, 5rpm) qui restait plus fluide que l'émulsion E/H après l'ajout du gaz. Les gouttelettes de l'émulsion E/H ( $D(0,5)=75 \mu\text{m}$  avec 22% de gaz) avaient donc une taille plus grande que celles de l'émulsion E/Si ( $D(0,5)=68 \mu\text{m}$  avec 22% de gaz). Ainsi, les gouttelettes étant plus grandes, il y avait moins de fusion de celle-ci résultant en une courbe de distribution de taille plus étroite.

Les valves et les diffuseurs n'ont pas eu d'influence sur les courbes de distribution de taille. Mais ils avaient une influence sur la taille des gouttelettes. Ceci était dû à leurs différences morphologiques.

#### V.1.3.5 Conclusion

Des émulsions de produits solaires avec de grandes quantités en filtres UV et une quantité négligeable de gouttelettes inférieures à 30  $\mu\text{m}$  (et même inférieure à 10  $\mu\text{m}$ ) ont été développées en optimisant les paramètres de formulation et en utilisant les valves et les diffuseurs appropriés.

Pour toutes les expériences, le pourcentage de gouttelettes ayant un diamètre inférieur à 10  $\mu\text{m}$  était en-dessous de 0,1%. Ceci est une caractéristique importante pour limiter la pénétration pulmonaire des émulsions et donc des filtres solaires qu'elles contiennent. Ceci était essentiellement dû au choix approprié des valves et des diffuseurs. La valve 4 (KPM 150P RA 657/05/20) a ainsi été sélectionnée car elle montrait les tailles de gouttelettes les plus grandes. Le diffuseur sélectionné était le diffuseur 3 (V04.721 BC/LL).

La taille des gouttelettes et la distribution de taille des gouttelettes émises a été influencée par tous les paramètres étudiés à savoir la concentration en gaz, la viscosité, la présence ou non de filtres inorganiques (et donc de poudre) et le design des valves et des diffuseurs.

En considérant le produit final et la taille des gouttelettes, les meilleurs produits ont été obtenus avec la plus faible concentration en gaz (22%), la plus grande concentration en filtre inorganique (4%) et la plus grande viscosité (6500 mPa.s).

Il est donc important de considérer tous les paramètres techniques et de formulation lors de la mise en aérosol de produits afin d'optimiser la taille et la distribution de taille des gouttelettes.

## **V.2 Evaluation *in vitro* de la pénétration cutanée des formulations solaires**

### **V.2.1 Introduction**

La présence de grandes quantités en filtres solaires dans les formulations peut poser un problème en termes d'accumulation dans la peau ou de pénétration cutanée. De plus, il est évident que les produits solaires doivent rester à la surface de la peau, au niveau de l'épiderme, afin de maintenir leur effet protecteur contre les UV (Jiang et col., 1999). Il est donc important d'investiguer leur potentiel de pénétration cutanée pour garantir leur efficacité et leur sécurité vis-à-vis de la santé humaine (Diembeck et col., 1999).

Le but de cette étude a été d'évaluer une éventuelle pénétration à travers la peau humaine des filtres organiques et inorganiques, contenus dans les produits solaires formulés auparavant (Cf. Partie V.1.1), par une méthode *in vitro*. Les méthodes *in vitro* fournissent des informations dans les cas où le stratum corneum est la principale barrière à une absorption dermique ou une pénétration cutanée (Varvaresou, 2006). Le 7<sup>ème</sup> amendement de la directive relative aux produits cosmétiques de l'Union Européenne interdit les tests sur animaux des produits cosmétiques et leurs ingrédients. Ceci rend les tests *in vitro* sur l'absorption cutanée inévitables (EC, 2003). Cette étude a été réalisée en utilisant les cellules de diffusion statiques de Franz (Cf. Partie IV.2.3.1). De la peau humaine excisée a été utilisée comme membrane, afin de se rapprocher au maximum des conditions physiologiques.

Deux méthodes différentes ont été utilisées pour l'analyse des filtres organiques d'une part et des filtres inorganiques d'autre part. L'analyse des filtres organiques (présents au nombre de 5 pour l'émulsion E/H et au nombre de 2 pour l'émulsion E/Si) a été réalisée à l'aide de la CLHP. Il était intéressant de développer une méthode d'analyse unique pour les filtres organiques dans le but de faciliter les expérimentations. Un autre objectif était d'explorer une méthode CLHP permettant la

quantification du Tinosorb<sup>TM</sup>S (Bis-Ethylhexyloxyphenol Methoxyphenyl Triazine), utilisé en association avec le Tinosorb<sup>TM</sup>M (Methylene Bis-benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol). La quantification des filtres inorganiques (Dioxyde de Titane et oxyde de Zinc) a été réalisée en utilisant une méthode ICP-OES (Cf. Partie IV.2.3.3).

## **V.2.2 Matériel et méthodes**

### **V.2.2.1 Matériel**

Les deux émulsions testées étaient l'émulsion E/H et E/Si (Tableaux 10 et 13). Les différents filtres UV et réactifs sont repris dans la partie Matériel et méthodes (Cf. Partie IV.1). Le tableau 17 rappelle les concentrations et les caractéristiques de chaque filtre utilisé dans les émulsions (Klein et col., 1998 ; BASF, 2007 ; Ciba, 2006). Les pourcentages expriment les concentrations en filtre et non les concentrations des produits commerciaux.

### **V.2.2.2 Méthodes**

#### **V.2.2.2.1 Etude in vitro**

##### **Cellule de Franz : conditions**

Le principe de fonctionnement de la cellule de Franz ainsi que les conditions d'utilisation ont été décrites précédemment (Cf. Partie IV.2.3 1).

##### **Préparation de la peau humaine**

Cette étude a été réalisée à l'aide de peau humaine excisée provenant de chirurgie plastique réalisée sur des femmes de type caucasien âgées entre 25 et 60 ans. Elle a été obtenue après approbation du comité d'éthique de l'Hôpital Erasme (Bruxelles, Belgique) et le consentement éclairé de chaque donneur et du personnel médical en charge. La diffusion passive est le mode principal de la pénétration cutanée. La viabilité de la peau n'est donc pas nécessaire pour ces tests de pénétration (Persson

et col., 2002). Après vérification de l'intégrité des échantillons de peau, la graisse sous-cutanée a été enlevée en utilisant des ciseaux et des scalpels. Les échantillons ont ensuite été identifiés et stockés à -25°C pendant maximum 6 mois.

### **Mode opératoire**

Après 2 heures de stabilisation du fluide récepteur à une température de  $37\pm 1^\circ\text{C}$  (afin d'obtenir une température de la peau de  $32^\circ\pm 1^\circ\text{C}$ ), une quantité précise de produit solaire ( $2\text{ mg/cm}^2$ ) a été appliquée sur la peau. Chaque cellule de Franz était recouverte de papier Parafilm pour éviter le dessèchement de la peau, et tout le système était recouvert de papier opaque pour protéger les produits de la lumière du soleil. Les prélèvements ont été effectués à des temps déterminés: 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h et 24h. A ces temps précis, la totalité du fluide récepteur (13,5 ml) composé de PBS (pH 7,4) + 4% de ASB (Albumine de Sérum de Bovin) était enlevée et remplacée immédiatement par de la solution fraîche.

A la fin de l'expérience, les échantillons de peau étaient récupérés à partir de chaque cellule et rincés avec de la solution de PBS et une solution de THF:ACN (80:20, v:v) jusqu'à ce qu'il ne reste plus de produit sur la peau. Celle-ci a été ensuite mélangée avec la solution de THF:ACN (80:20, v:v) et placée dans un bain à ultrasons pendant 30 min.

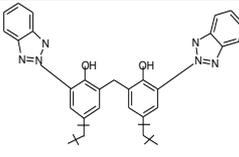
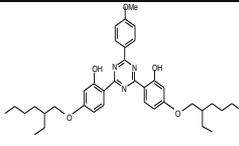
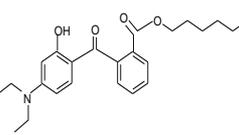
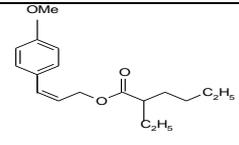
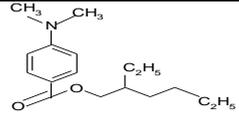
Chaque solution a ensuite été divisée en deux parties : la première était gardée pour les analyses CLHP (pour les filtres organiques) et la deuxième partie était conservée à -25°C pour l'analyse ultérieure des filtres inorganiques par la méthode ICP-OES.

#### V.2.2.2.2 Analyse des filtres UV

Trois types d'échantillons sont analysés :

- 1- Le fluide récepteur (5 ml à partir des 12,5 ml récoltés)
- 2- La solution qui permettait de prélever ce qui restait en surface de la peau à la fin des expérimentations (après évaporation de tout le solvant)
- 3- La peau après l'avoir broyée

**Tableau 17:** Composition et caractéristiques physico-chimiques des filtres UV contenus dans chaque formulation

| Nom INCI<br>(Noms commerciaux)<br><i>(Abreviations)</i>  | E/Si<br>Emulsion | E/H<br>Emulsion | Formules des filtres<br>organiques  | Log<br>P <sub>O/W</sub> | Solubilité<br>dans<br>l'eau<br>(mg/l) | Poids<br>moléculaire<br>(g/mol) | Longueur<br>d'onde<br>d'absorption<br>maximale*<br>(nm) |
|--|------------------|-----------------|---|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---|
| Methylene Bis<br>Benzotriazolyl<br>Tetramethylbutyl-<br>phenol<br>(Tinosorb™ M)<br><i>(MBBT)</i>                                   | 5,0%             | 5,0%            |    | 12,7                    | 0,007                                 | 659                             | 302 et 357<br>(Filtre UVA et<br>UVB)                    |
| Bis-<br>Ethylhexyloxyphenol<br>Methoxyphenyl<br>Triazine<br>(Tinosorb™ S)<br><i>(BEMT)</i>   | -                | 1,0%            |    | 5,4                     | <0,014                                | 628                             | 310 et 340<br>(Filtre UVA et<br>UVB)                    |
| Diethylamino<br>Hydroxybenzoyl<br>Hexyl Benzoate<br>(Uvinul® A)<br><i>(DHBB)</i>   | -                | 3,5%            |   | 6                       | 0,004                                 | 397                             | 354<br>(Filtre UVA)                                     |
| Ethylhexyl<br>Methoxycinnamate<br>(Escalol® 557 for<br>W/O emulsion and<br>Eusolex® UV-pearl<br>for W/Si emulsion)<br><i>(EMC)</i> | 7,50%            | 9,50%           |  | 5,8                     | Insoluble                             | 290                             | 311<br>(Filtre UVB)                                     |
| 2-Ethylhexyl<br>Dimethyl PABA<br>(Escalol® 507)<br><i>(ED-PABA)</i>  | -                | 4,0%            |  | 5,77                    | 0,2                                   | 277                             | 311<br>(Filtre UVB)                                     |
| Titanium Dioxide<br>(Solaveil® CT 10W)   | 3,0%             | 3,0%            | TiO <sub>2</sub>  | -                       | -                                     | 80                              | 290-360<br>(Filtre UVA I<br>et UVB)                     |
| Zinc Oxide<br>(Z-Cote® max)  | 1,0%             | 1,0%            | ZnO   | -                       | -                                     | 81                              | 280-370<br>(Filtre UVA I,<br>II et UVB)                 |
| <b>Total</b>   | <b>16,5%</b>     | <b>27,0%</b>    | -   | -                       | -                                     | -                               | -   |
| <b>FPS estimé<br/>(avec le simulateur<br/>Ciba)</b>  | <b>34</b>        | <b>54</b>       | -   | -                       | -                                     | -                               | -   |

\*Mesurée dans l'alcool éthylique

#### *V.2.2.2.2.1 Les filtres organiques*

La méthode d'analyse a été inspirée de deux méthodes validées décrites dans la littérature pour l'analyse quantitative et simultanée de plusieurs filtres dans des formulations de produits solaires (Smyriotakis et col., 2004 ; Simeoni et col., 2005). La méthode d'extraction provenait d'une autre publication qui présentait une procédure pour des analyses CLHP de filtres UV dans de l'ASB (Jiang et col., 1996).

#### **Instrumentation et conditions CLHP**

Elles sont décrites précédemment (Cf. Partie IV.2.3.2).

#### **Préparation des solutions**

##### *Solutions standards*

Les solutions stocks standards (100 µg/ml) des cinq filtres UV organiques étaient préparées quotidiennement dans une solution de THF:ACN (80:20, v:v), mélangées dans un bain à ultrasons pendant 30 min et diluées à 100 ml avec la même solution. Dans le but de construire les courbes de calibration correspondantes et d'évaluer la précision de la méthode, les solutions standards contenant les cinq filtres UV étaient préparés à des concentrations allant de 0,5 à 25 µg/ml et diluées avec une solution de MeOH:ACN:THF:H<sub>2</sub>O:Acide acétique (55:15:10:19,5:0,5).

##### *Préparation des solutions et étude de recouvrement dans la solution de tampon phosphate contenant 4% d'albumine de sérum de bovin (ASB)*

La détermination de chaque filtre UV a été réalisée en utilisant les courbes de calibration correspondantes. Après chaque prélèvement, toutes les solutions ont subi le même traitement. Après la précipitation des protéines avec deux volumes d'ACN et 30 min d'agitation au bain à ultrasons (4ml d'ACN pour 2ml de solution réceptrice), les échantillons étaient centrifugés à 1500xg pendant 10 min. Le surnageant était

ensuite filtré à travers des filtres ayant des pores de diamètre de 0,45 µm avant d'être injecté dans la CLHP.

#### *V.2.2.2.2 Les filtres inorganiques*

Ils étaient représentés dans les formulations par le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) et l'oxyde de zinc (ZnO). Les deux éléments, Ti<sup>4+</sup> et Zn<sup>2+</sup>, pouvaient être quantifiés par ICP-OES.

#### *Instrumentation de l'ICP-OES*

Elle est décrite dans la section matériel et méthode (Cf. Partie IV.2.3.3).

#### *Solutions standards*

La détermination des quantités en titane ou en zinc a été réalisée en utilisant les courbes de calibration (0-20 ppm pour les faibles concentrations, ou 0-60 ppm pour les concentrations plus élevées). Les solutions standards utilisées étaient les suivantes: CertiPUR<sup>®</sup> Titanium Standard solution (1000 mg/l Ti, dilution dans l'eau milliQ) et 1 09953 Titrisol<sup>®</sup> Zinc Standard (1000 mg/l Zn, dilution dans l'eau milliQ) (Merck, Darmstadt, Allemagne). Les dilutions étaient réalisées dans l'eau milli-Q.

#### *Mode opératoire*

La méthode de digestion et de dissolution des deux oxydes a été adaptée d'une méthode qui permettait de détecter et de doser le titane à partir d'un milieu protéique (poudre de lait) (Van Betteray-Kortekaas et Vos, 1986).

Chaque échantillon était chauffé à 450°C pendant 10 à 12h dans un four à moufle puis était fondu avec 5g de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> à la flamme. Le produit de fusion était alors dissous dans 10 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré à chaud et dilué dans 100 ml d'eau milliQ. La solution ainsi obtenue était analysée par ICP-OES.

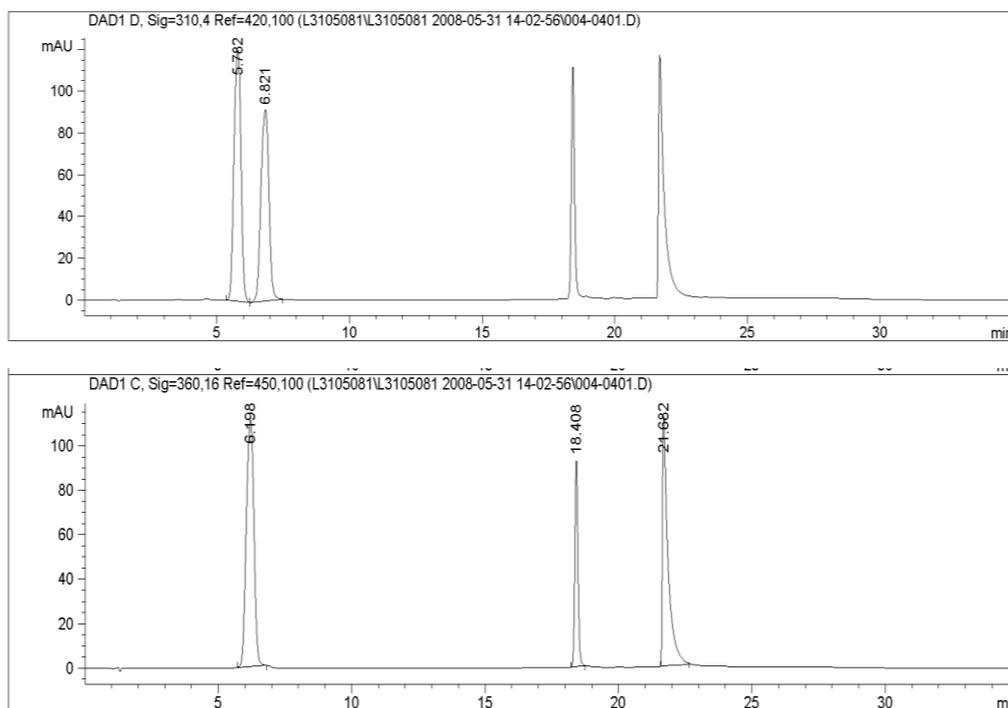
## **V.2.3 Résultats et discussion**

### **V.2.3.1 Filtres organiques**

#### **V.2.3.1.1 Validation de la méthode CLHP**

### **Chromatogrammes**

Tous les filtres organiques analysés étaient hydrophobes, et plus particulièrement le MBBT et le BEMT. Par conséquent, un solvant organique apolaire est fréquemment requis pour réaliser leur élution rapide sur une colonne C<sub>18</sub>. Par contre, une séparation correcte de ces filtres UV sera réalisée avec l'utilisation d'une colonne moins hydrophobe (C<sub>18</sub> greffée avec des groupements cyanopropyl (CN)) en association avec un gradient de solvant dont la polarité est diminuée au cours du temps. Sous ces conditions, chaque filtre peut être séparé et détecté avec un seul essai.



**Figure 62:** Chromatogrammes des cinq filtres organiques: ED-PABA (5,7 min.), DHHB (6,1 min.), EMC (6,8 min.), MBBT (18,4 min.), et BEMT (21,6 min.).

Une résolution complète a été atteinte pour les cinq filtres dans les conditions expérimentales décrites auparavant (Figure 62). Les temps de rétention observés pour ED-PABA, DHHB, EMC, MBBT et BEMT étaient respectivement de 5,7 min ; 6,1 min ; 6,8 min ; 18,4 min et 21,6 min. La quantification de ED-PABA et de l'EMC étaient effectuées à 310 nm, tandis qu'elle était réalisée à 360 nm pour les trois autres filtres.

### Linéarité

Pour déterminer la linéarité, cinq solutions de concentrations croissantes ont été injectées en triplicata intra- et inter-jour. Les courbes de calibration ont été construites en traçant les droites des aires des pics du chromatogramme en fonction des concentrations.

Une bonne linéarité a été obtenue entre les concentrations de 0,3 µg/ml et 25 µg/ml pour tous les composés, avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,9994 (Tableau 18). De plus, le test de comparaison de l'ordonnée à l'origine avec 0 n'a pas montré de différences significatives (Test t de Student ;  $p < 0,05$ ).

**Tableau 18:** Linéarité. Données pour les droites de calibration. Les trois équations représentent trois jours individuels; <sup>a</sup> x= concentration en filtre (µg/ml); y= aire du pic

| <i>Filtres</i> | <i>Equation <sup>a</sup></i> | <i>Coefficient de corrélation (r<sup>2</sup>)</i> | <i>Domaine de linéarité (µg/ml)</i> |
|----------------|------------------------------|---|-------------------------------------|
| EMC            | $y=169,46x + 15,51$          | 1,0000  | 0,3-25,0                            |
|                | $y=172,07x + 44,55$          | 1,0000  |                                     |
|                | $y=170,68x + 33,61$          | 0,9997  |                                     |
| ED-PABA        | $y=179,53x - 7,36$           | 1,0000  | 0,3-25,0                            |
|                | $y=177,57x - 2,35$           | 1,0000  |                                     |
|                | $y=179,07x + 4,98$           | 0,9999  |                                     |
| DHHB           | $y=173,36x - 0,18$           | 1,0000  | 0,3-25,0                            |
|                | $y=173,48x + 0,44$           | 1,0000  |                                     |
|                | $y=174,78x - 2,29$           | 0,9999  |                                     |
| MBBT           | $y=72,72x - 12,54$           | 0,9996  | 0,3-25,0                            |
|                | $y=75,12x - 14,50$           | 0,9994  |                                     |
|                | $y=71,90x - 13,81$           | 0,9995  |                                     |
| ED-PABA        | $y=135,56x + 3,44$           | 1,0000  | 0,3-25,0                            |
|                | $y=128,11x + 13,92$          | 0,9999  |                                     |
|                | $y=131,80x + 0,54$           | 1,0000  |                                     |

## **Précision**

Pour vérifier la précision de la méthode CLHP, des mesures du taux de recouvrement des cinq filtres organiques dans les solutions standards ont été réalisées à partir de trois courbes de calibration différentes réalisées sur la même journée d'une part (mesure de la répétabilité) et lors de trois jours différents d'autre part (mesure de la reproductibilité). Nous n'avons pas observé de différences significatives lors des analyses intra-jour et inter-jour des taux de recouvrement (Test F de Fisher ;  $p > 0,01$ ) pour les cinq filtres. Les coefficients de variation (CV) des taux de recouvrement de l'essai pour les cinq filtres étaient en-dessous de 10%.

## **Limites de détection et de quantification**

Les limites de détection ont été définies comme les quantités injectées donnant un rapport signal-bruit de 3. Elles étaient de 0,02 µg/ml pour DHHB, 0,03 µg/ml pour ED-PABA et BEMT, de 0,05 µg/ml pour MBBT et de 0,06 µg/ml pour l'EMC.

Les limites de quantification ont été définies comme les quantités injectées donnant un rapport signal-bruit de 10. Elles étaient de 0,07 µg/ml pour DHHB, 0,1 µg/ml pour ED-PABA et BEMT, de 0,2 µg/ml pour MBBT et EMC.

## **Taux de recouvrement des filtres solaires**

L'exactitude de la méthode développée ici a été évaluée en examinant le taux de recouvrement des filtres organiques à partir des deux types d'émulsions formulées et de la solution réceptrice qui contient 4% d'ASB. Les cinq filtres organiques ont été ajoutés à la phase réceptrice et la méthode d'extraction était la même que celle décrite précédemment.

Les tableaux 19 et 20 résument respectivement les résultats des taux de recouvrement des filtres organiques à partir des émulsions et des solutions réceptrices.

Les taux de recouvrements étaient compris entre 92% et 105% pour les cinq filtres solaires à partir des deux types d'émulsion (Tableau 19). Les coefficients de variation calculés à partir des six réplicas étaient tous inférieurs à 7%. Ils étaient compris entre 2,3% et 6,2% pour l'émulsion E/H et entre 3,3% et 4,2% pour l'émulsion E/Si.

**Tableau 19:** Taux de recouvrement des filtres UV organiques à partir des émulsions

| Filtres | Emulsion E/H                |                          |         | Emulsion E/Si               |                          |         |
|---------|-----------------------------|--------------------------|---------|-----------------------------|--------------------------|---------|
|         | Concentration de départ (%) | Taux de recouvrement (%) | C.V (%) | Concentration de départ (%) | Taux de recouvrement (%) | C.V (%) |
| EMC     | 10,0                        | 103,7                    | 2,3     | 7,5                         | 99,9                     | 4,2     |
| ED-PABA | 4,0                         | 102,1                    | 2,8     | -                           | -                        | -       |
| DHHB    | 3,5                         | 92,2                     | 3,1     | -                           | -                        | -       |
| MBBT    | 5,0                         | 104,8                    | 6,2     | 5,0                         | 93,1                     | 3,3     |
| BEMT    | 1,0                         | 99,2                     | 5,4     | -                           | -                        | -       |

Les mêmes observations ont pu être effectuées pour les extractions réalisées à partir de la solution réceptrice à laquelle ont été rajoutées différentes quantités de filtres organiques préalablement dissous dans une solution de THF:ACN (80:20) (Cf. solution standard). Les coefficients de variations étaient compris entre 1,9% et 5,6% pour les concentrations élevées et entre 3,4% et 7,1% pour les faibles concentrations.

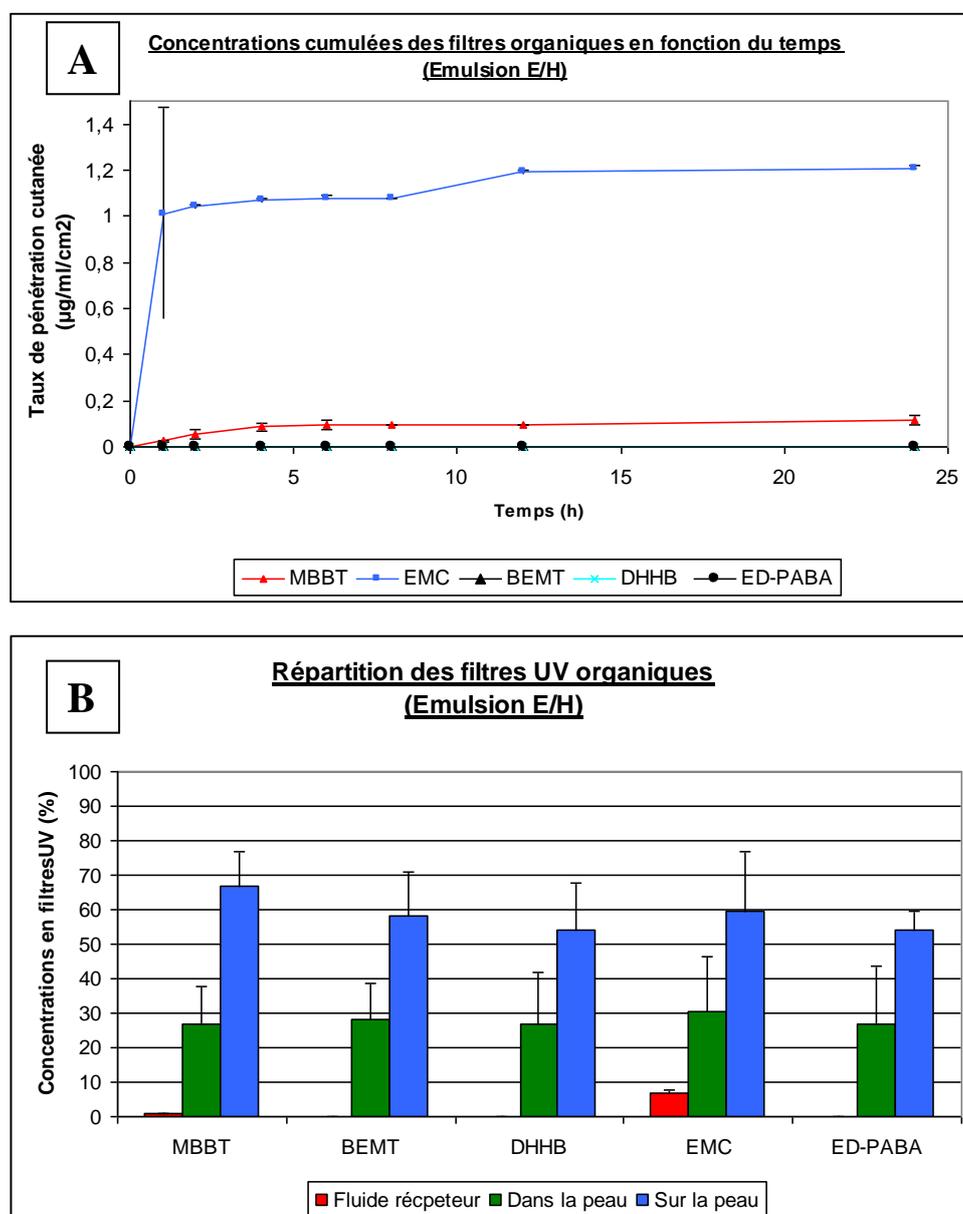
**Tableau 20:** Taux de recouvrement des filtres UV organiques à partir de la solution réceptrice

| Filtres | 4% ASB dans un tampon phosphate |                          |        |
|---------|---------------------------------|--------------------------|--------|
|         | Concentration de départ (µg/ml) | Taux de recouvrement (%) | CV (%) |
| EMC     | 25,0                            | 104,7                    | 3,4    |
|         | 6,25                            | 104,5                    | 3,5    |
| ED-PABA | 25,0                            | 99,4                     | 2,5    |
|         | 6,25                            | 90,4                     | 7,1    |
| DHHB    | 25,0                            | 101,1                    | 1,9    |
|         | 6,25                            | 93,3                     | 5,3    |
| MBBT    | 25,0                            | 91,8                     | 2,4    |
|         | 6,25                            | 91,3                     | 4,9    |
| BEMT    | 25,0                            | 90,0                     | 5,6    |
|         | 6,25                            | 90,6                     | 3,4    |

Comme il a été précédemment remarqué dans la littérature (Schakel et col., 2004), à cause de la complexité des matrices des produits cosmétiques ainsi que des milieux physiologiques, une imprécision assez modérée dans les résultats peut être acceptée.

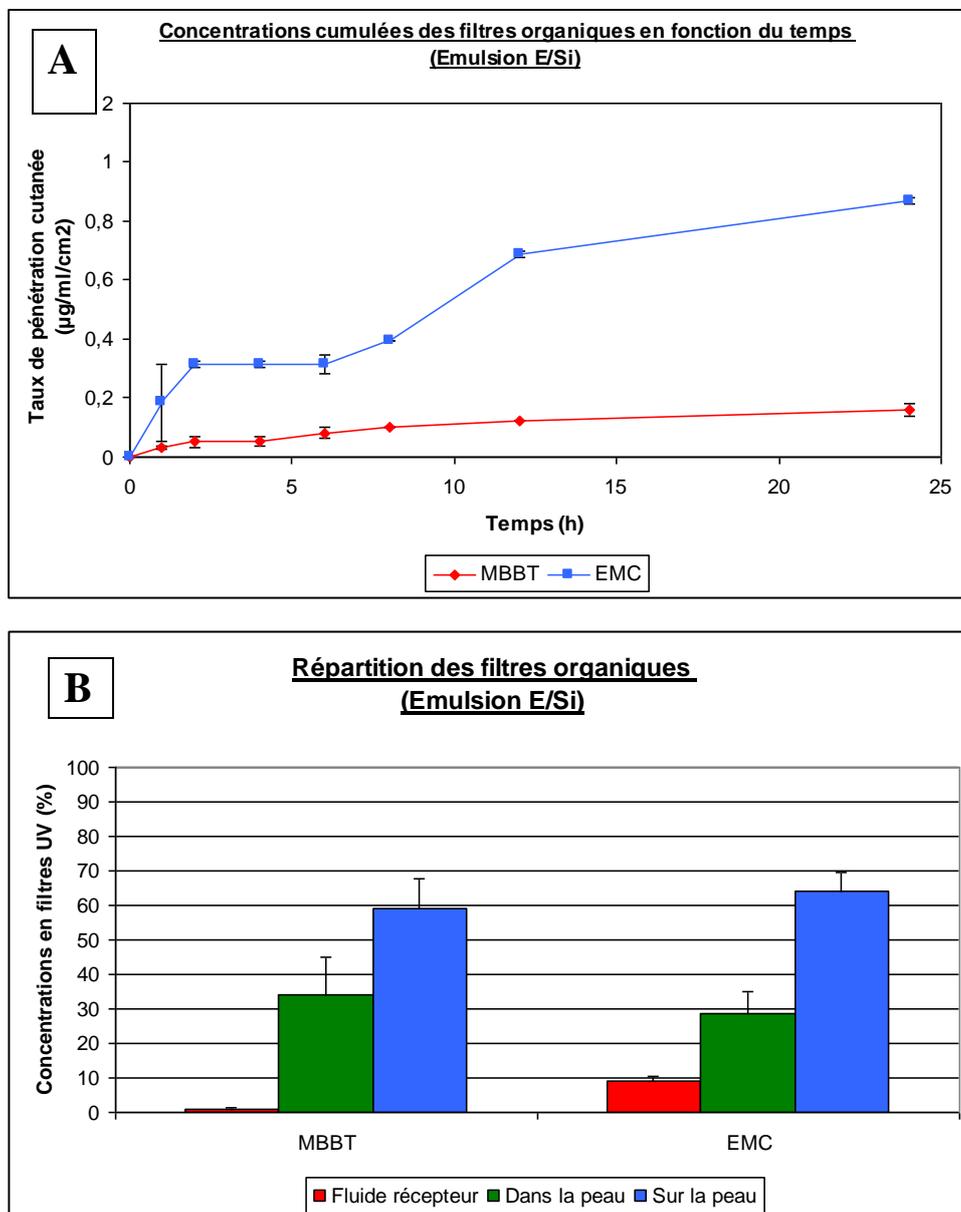
### V.2.3.1.2 Evaluation de la pénétration cutanée

Les figures 63 et 64 montrent le taux de pénétration cutanée dans le fluide récepteur et la distribution des filtres UV dans chaque type d'échantillon analysé (Cf. V.2.2.1.2) : en surface de la peau (au niveau de la préparation), dans la peau et au niveau du fluide récepteur pour les émulsions E/H et E/Si respectivement.



**Figure 63:** Résultats de la pénétration cutanée pour les filtres organiques à partir de l'émulsion E/H (n=6) **A.** Concentrations cumulées des filtres UV organiques en

fonction du temps. Après 24h:  $1,21 \pm 0,01 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour EMC et  $0,12 \pm 0,03 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour le MBBT. **B.** Distribution des filtres organiques dans les différents types d'échantillons analysés



**Figure 64:** Résultats de la pénétration cutanée pour les filtres organiques à partir de l'émulsion E/Si (n=6) **A.** Concentrations cumulées des filtres UV organiques en fonction du temps. Après 24h:  $0,87 \pm 0,07 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour EMC et  $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour le MBBT. **B.** Distribution des filtres organiques dans les différents types d'échantillons analysés

Comme nous avons pu le constater, uniquement le MBBT et EMC montraient un potentiel de pénétration cutanée. La quantité de filtre détectée après 24h dans le fluide récepteur était, pour l'EMC, de  $1,21 \pm 0,1 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour l'émulsion E/H et de  $0,87 \pm 0,07 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour l'émulsion E/Si. Le niveau maximum de pénétration cutanée pour le MBBT était de  $0,12 \pm 0,03 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour l'émulsion E/H et de  $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour l'émulsion E/Si. Tous les autres filtres solaires étudiés n'ont pas été détectés dans le fluide récepteur.

L'absorption à travers la peau est un phénomène passif et les molécules doivent traverser différentes couches avant d'atteindre le fluide récepteur. La diffusion dépend de différents facteurs : (1) l'état de la peau, (2) la concentration des molécules dans les différentes émulsions (3), leurs caractéristiques physico-chimiques (par exemple, leur coefficient de partage et leur poids moléculaire) et (4) le véhicule (l'affinité des molécules pour le véhicule et le type d'émulsion) (Martini, 2003).

(1) Cette étude a été réalisée sur de la peau saine. Certains paramètres n'ont donc pas été pris en compte, comme l'impact possible des coups de soleil (et donc de l'inflammation de la peau) et de certaines pathologies dermatologiques.

(2) Si l'on considère la concentration des molécules, plus elle est élevée, plus grande sera la capacité de diffusion des molécules (Shakel et col., 2004). Les différences entre les distributions des filtres UV peuvent être expliquées, en partie, par leur différence de concentration. En effet, ED-PABA, DHHB et BEMT ont été utilisées à des concentrations plus faibles que MBBT (5%) et EMC (10%) dans les différentes formulations.

(3) Les caractéristiques physico-chimiques de chaque filtre UV sont aussi importantes. Il est donc nécessaire de prendre en considération la nature chimique et la taille des molécules.

La peau présente des sites hydrophiles et lipophiles de part sa physiologie ainsi que de la présence de protéines et de doubles couches lipidiques. Dans le but d'obtenir une bonne pénétration cutanée, le  $\log P_{O/W}$  (Coefficient de partage n-octanol/eau) des molécules doit être compris entre 2 et 5 (pour la peau, le coefficient de partage optimum avec lequel le flux maximal est atteint doit être de 1). Avec ces valeurs, la

balance hydrophile/lipophile est idéale pour permettre une diffusion passive des molécules à travers la peau.

Si les molécules ont un coefficient de partage trop faible, elles présentent une solubilité trop importante dans l'eau et ne passent donc pas le stratum corneum. Si, par contre le  $\log P_{O/W}$  est trop élevé, elles sont trop lipidiques et ont la capacité de se dissoudre dans le stratum corneum et ne passeront pas les tissus riches en eau de la peau (Barry, 1983).

Si l'on compare les deux molécules qui présentent une capacité à passer à travers la peau, MBBT et EMC, nous pouvons observer que l'EMC a un  $\log P_{O/W}$  (=5,8) plus faible que le MBBT ( $\log P_{O/W}$  =12,7). L'EMC présente donc une meilleure capacité à traverser la peau car il n'est pas trop lipophile, contrairement à MBBT. De plus, la différence entre leur poids moléculaire est aussi importante (290 g/mol pour l'EMC et 659 g/mol pour le MBBT), comme nous pouvons le constater à partir des formules des deux filtres (Tableau 18). Il est connu que les molécules avec un poids moléculaire (PM) au-dessus de 500 g/mol (et au-dessus de 300 g/mol pour les transports actifs) montrent des difficultés à traverser la peau (Barry, 1983).

Avec la même approche, nous pouvons analyser les différences avec les autres filtres. Malgré les caractéristiques physico-chimiques similaires entre le BEMT et le MBBT (surtout concernant le PM et la structure) et un  $\log P_{O/W}$  plus favorable (5,4) pour la diffusion passive, nous avons pu observer que le BEMT ne présentait aucune pénétration cutanée. Ceci peut être expliqué par sa faible concentration (seulement 1% dans l'émulsion E/H), qui n'est pas assez élevée pour permettre une pénétration cutanée. Les mêmes observations ont pu être effectuées lors de la comparaison entre l'EMC et l'ED-PABA. Si l'on regarde le DHHB, il présente les mêmes propriétés que l'EMC, mais son PM (397 g/mol vs 290 g/mol pour l'EMC) est plus élevé. De plus, comme cela a été décrit plus haut, sa concentration (3,5%) n'est pas assez élevée pour permettre une diffusion passive.

(4) L'activité thermodynamique (c'est-à-dire l'interaction des filtres avec les émulsions) est aussi un paramètre important. Si les composés ont une affinité trop élevée pour les véhicules, ils ne traverseront pas la peau car ils seront trop retenus par les émulsions. Le MBBT est une dispersion aqueuse et n'est soluble ni dans l'eau ni dans les huiles, il n'est donc pas trop retenu par les émulsions. L'EMC a été utilisé

en tant que tel pour l'émulsion E/H et sous forme encapsulée dans une suspension aqueuse pour l'incorporation dans la phase aqueuse de l'émulsion E/Si (car il n'est pas soluble dans la silicone). L'affinité pour le véhicule était donc moins importante pour l'émulsion E/Si que pour l'émulsion E/H. Cependant, les deux types d'émulsions permettent le relargage de l'EMC, et donc son passage à travers la peau.

Une différence entre les deux types d'émulsion a été aussi observée. Seuls MBBT et l'EMC ont été incorporés dans les deux types d'émulsion, nous pouvons donc comparer le potentiel de pénétration cutanée de ces deux filtres. L'émulsion E/Si est moins occlusive que l'émulsion E/H car elle contient beaucoup de silicones volatiles. De plus, sa viscosité est plus faible en comparaison avec l'émulsion E/H. Ainsi, l'hydratation de la peau est plus importante avec l'émulsion E/H, ce qui permet une plus grande pénétration cutanée (Martini, 2003) pour EMC,  $1,21 \pm 0,01 \mu\text{g/ml/cm}^2$  contre  $0,87 \pm 0,07 \mu\text{g/ml/cm}^2$  pour l'émulsion E/Si. Pour MBBT, il n'y a pas de différence significative entre les deux types d'émulsions ( $0,12 \pm 0,03 \mu\text{g/ml/cm}^2$  et  $0,14 \pm 0,02 \mu\text{g/ml/cm}^2$  respectivement pour les émulsions E/H et E/Si), probablement à cause des phases aqueuses qui étaient identiques pour les deux types d'émulsion et dans lesquelles le MBBT a été incorporé. Ces résultats ont confirmé que le véhicule peut favoriser ou non, la pénétration cutanée de chaque filtre solaire (Potard et col., 1999 ; Treffel et Gabard, 1996).

### V.2.3.2 Filtres inorganiques

#### V.2.3.2.1 Validation de la méthode analytique

##### **Linéarité**

Pour déterminer la linéarité, quatre solutions standards de concentrations croissantes ont été injectées en triplicata intra et inter-jour. Les courbes de calibration ont été construites en traçant les droites des aires des pics correspondants aux longueurs d'ondes émises pour chacun des deux éléments en fonction des concentrations.

Les coefficients de corrélation étaient compris entre 0,998 et 0,997 pour les deux éléments et le domaine de linéarité était compris entre 0 et 20 ppm.

## Précision

Pour vérifier la précision de la méthode ICP-OES, des mesures inter- et intra-jours des cinq filtres organiques dans les solutions standards ont été réalisées à partir de trois courbes de calibration différentes réalisées sur la même journée d'une part et lors de trois jours différents d'autre part. Nous n'avons pas observé de différences significatives lors des analyses intra-jour et inter-jour des taux de recouvrement des cinq filtres (Test F de Fisher ;  $p > 0,01$ ). Ceci a confirmé qu'il n'y avait donc pas d'effet intra-jour. Les coefficients de variation (CV) des taux de recouvrement de l'essai pour les cinq filtres étaient en-dessous de 10%.

## Limites de détection et de quantification

Les limites de détection ont été calculées en mesurant trois fois la hauteur de la ligne de base du bruit de fond. Elles étaient de 0,01 ppm pour les deux éléments.

Les limites de quantification ont été calculées en mesurant 10 fois la hauteur de la ligne de base du bruit de fond. Elles étaient de 0,10 ppm pour les deux éléments.

## Taux de recouvrement des filtres inorganiques

Les tableaux 21 et 22 résument les résultats d'extraction obtenus pour les filtres inorganiques à partir des deux types d'émulsions d'une part et du fluide récepteur d'autre part. Afin de déterminer les taux de recouvrement, 0,50 g de chaque émulsion, ou 0,07 g de  $\text{TiO}_2$  et 0,01 g de  $\text{ZnO}$  dans 1 ml de fluide récepteur, ont été traités comme cela a été décrit plus haut (Cf. Partie V.2.2.2.2). Les taux de recouvrement ont été compris entre 92,4% et 100%.

Les mêmes remarques que celles qui ont été faites pour les filtres organiques peuvent être faites ici aussi.

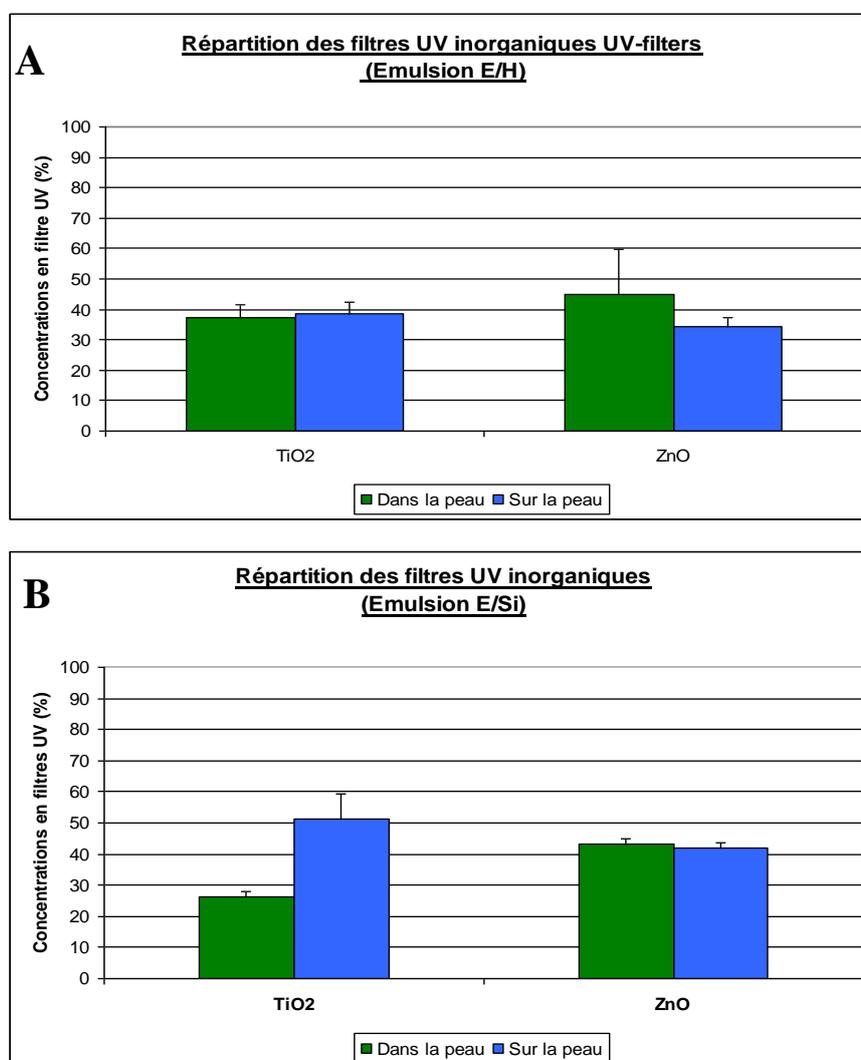
**Tableau 21:** Taux d'extraction des filtres inorganiques à partir des émulsions

| Filtres        | Emulsion E/H                |                          |         | Emulsion E/Si               |                          |         |
|----------------|-----------------------------|--------------------------|---------|-----------------------------|--------------------------|---------|
|                | Concentration de départ (%) | Taux de recouvrement (%) | C.V (%) | Concentration de départ (%) | Taux de recouvrement (%) | C.V (%) |
| $\text{TiO}_2$ | 3,0                         | 92,5                     | 3,9     | 3,0                         | 92,4                     | 0,9     |
| $\text{ZnO}$   | 1,0                         | 98,3                     | 3,9     | 3,0                         | 100,0                    | 3,7     |

**Tableau 22:** Taux d'extraction des filtres UV inorganiques à partir du fluide récepteur (4% ASB dans la solution de tampon phosphate). La quantité rajoutée de TiO<sub>2</sub> et de ZnO est exprimé en mg de Ti<sup>4+</sup> ou Zn<sup>2+</sup>.

| Filtres          | Fluide récepteur (PBS+4% ASB (m/m)) |                          |         |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------|---------|
|                  | Quantité rajoutée (mg)              | Taux de recouvrement (%) | C.V (%) |
| TiO <sub>2</sub> | 1,20                                | 96,8                     | 5,5     |
| ZnO              | 1,00                                | 99,7                     | 5,5     |

*V.2.3.2.2 Evaluation de la pénétration cutanée*



**Figure 65:** Résultats de la distribution des filtres inorganiques à partir de l'émulsion E/H (A) et de l'émulsion E/Si (B)

La figure 65 montre la distribution des filtres inorganiques en surface de la peau et dans la peau, et dans le fluide récepteur pour les émulsions E/H et E/Si. Les taux de recouvrements étaient compris entre 76% et 86%.

Les limites de détection et de quantification étaient de 0,01 ppm et 0,1 ppm respectivement. Comme nous avons pu l'observer au bout de 24h, les teneurs en Titane et en Zinc étaient en-dessous de la limite de détection dans le fluide récepteur. Nous avons donc considéré que les filtres inorganiques ne passaient pas dans le fluide récepteur. Approximativement 50% de la dose en oxydes appliquée était enlevée de la peau après lavage de celle-ci. Comme il a été décrit précédemment dans d'autres publications, les filtres inorganiques ne montrent pas de potentiel d'absorption cutanée (Mavon et col., 2006). De plus, différentes études ont montré qu'ils n'atteignaient pas les couches profondes de la peau et que la plupart restaient en surface (Mavon et col. 2006 ; Lademan et col. 1999). Si l'on considère le  $\text{TiO}_2$ , seulement une partie infime peut être retrouvée dans les pores des follicules (Lademann et col., 1999).

Nous avons aussi constaté une perte importante en filtres inorganiques au cours de l'expérience. Celle-ci était plus importante que pour les filtres organiques. En effet, ces pertes étaient comprises entre 0 et 20% pour les filtres organiques et entre 15% et 25% pour les filtres inorganiques. Ce phénomène pourrait être dû à différents facteurs : la difficulté d'appliquer un film homogène d'émulsion sur la peau, les multiples étapes nécessaires lors de l'extraction des filtres à partir du fluide récepteur et de la peau. La différence observée entre les filtres organiques et inorganiques peut être expliquée par les différences de techniques extractives qui nécessitent plus d'étapes et de réactions chimiques (pas seulement de la solubilisation) pour les filtres inorganiques (Benech-Kieffer et col., 2003).

Les oxydes utilisés sont généralement nanoparticulaires car ils sont, dans ces conditions, incolores et plus efficaces au niveau de la réflexion et de la diffraction de la lumière et plus particulièrement des rayons UV. Malgré leur très petite taille (100 nm pour le  $\text{TiO}_2$  et de l'ordre de 200 nm pour le ZnO), elle était encore trop élevée pour permettre un transport passif des oxydes à travers la peau. La pénétration

cutanée de certains nanomatériaux ayant une taille inférieure à 10 nm a été mise en évidence sur des tissus vivants de rongeurs. Dans ce cas, leur taille est assez petite pour leur permettre de passer entre les interstices naturels présents entre certaines cellules (Mortensen et col., 2008). Lorsqu'il est fait référence aux filtres UV minéraux, et lorsque la peau est intacte, il n'y a aucune mise en évidence de passage cutané à travers des tissus vivants pour des particules présentant des tailles de 20 nm ou plus. Si nous comparons ces données avec celles obtenues pour des molécules thérapeutiques qui pénètrent facilement la barrière cutanée, nous pouvons observer que celles-ci ont en général une taille inférieure à 2 nm. Ceci représente une différence importante avec les deux oxydes présents dans les formulations (SCCP, 2007). De plus, ces oxydes sont totalement hydrophiles, contrairement aux molécules qui ont une grande capacité à traverser la barrière cutanée.

Si nous regardons les propriétés physico-chimiques de ces deux oxydes, nous pouvons faire plusieurs observations. Premièrement, les oxydes sont totalement insolubles dans l'eau, dans la plupart des solvants organiques, ainsi que dans les structures composants la barrière cutanée. Leur affinité pour le fluide récepteur est donc quasiment nulle et le passage à travers la barrière cutanée n'est pas aisé. De plus, ce sont des composés non chargés, donc aucune attraction ou répulsion avec les charges négatives des lipides présents dans la peau ne peut être observée. Ces forces pourraient avoir pour conséquence l'apparition temporaire de canaux à travers la peau qui permettraient le passage cutané (Gamer et col., 2006), mais ces charges n'étant pas présentes, ce phénomène ne peut pas se produire et ainsi faciliter un passage cutané.

Cependant, comme la taille des particules est de l'ordre du nanomètre, elles présentent une grande surface spécifique (par exemple de 14.7 m<sup>2</sup>/g pour le ZnO). Donc la surface de contact avec la peau est élevée après l'application du produit solaire ce qui peut augmenter le potentiel de pénétration des particules. Il faut donc être très vigilant avec les nanoparticules qui présentent une importante surface spécifique, même si les autres paramètres physico-chimiques permettent d'avoir une balance « pénétration/non pénétration » correcte. Il est donc primordial de choisir des filtres inorganiques présentant une taille correcte (pas inférieur à 20 nm) afin d'assurer une absence de pénétration cutanée.

#### **V.2.4 Conclusion**

Une méthode CLHP pour la détermination des filtres organiques a été développée parallèlement à une méthode spectrométrique pour l'analyse du TiO<sub>2</sub> et du ZnO.

Aucune publication n'a été trouvée pour le dosage simultané de ces cinq filtres organiques. La complexité des différentes matrices (fluide récepteur et émulsions) et de cette combinaison des filtres requiert le développement de méthodes de dosage, d'extraction et d'expérimentation de pénétration *in vitro* spécifiques.

L'efficacité et la sécurité sont deux paramètres très liés et importants pour les produits solaires. L'utilisation de méthodes analytiques validées est donc nécessaire pour évaluer ces paramètres.

En terme de pénétration cutanée, les résultats obtenus pour l'EMC et le MBBT sont cohérents avec les résultats publiés dans la littérature. Pour les deux types de filtres, organiques et inorganiques, le taux de pénétration était très faible. Aucune pénétration cutanée n'a même été observée pour les filtres inorganiques. Une étude *in vivo* est nécessaire pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Celle-ci sera réalisée à l'aide d'une méthode utilisant des strippings (ou disques adhésifs) (Cf. Partie V.3) et va permettre de localiser les filtres dans les différentes assises du stratum corneum.

En définitive, cette étude a montré que des produits solaires sprayables, contenant des concentrations élevées en filtres UV, présentent un faible niveau de pénétration cutanée. Ces informations sont une aide précieuse pour la prédiction de la sécurité de tels produits lorsqu'ils sont utilisés dans les conditions normales sur une peau saine.

## **V.3 Evaluation *in vivo* de la pénétration cutanée des formulations solaires**

### **V.3.1 Introduction**

De la même façon que pour l'étude *in vitro*, l'objectif de cette évaluation était d'estimer l'absorption dermique et la pénétration cutanée des filtres UV organiques et inorganiques contenus dans les produits de protection solaire. Elle nous permettait ainsi de poursuivre l'investigation réalisée lors de l'étude *in vitro* et de confirmer (ou d'infirmer) les résultats obtenus avec celle-ci. En effet, un produit solaire sera d'autant plus efficace qu'il restera à la surface de la peau et qu'il présentera un taux de pénétration cutanée le plus faible possible (Jiang et col., 1999). De plus, les produits testés contiennent de fortes concentrations en filtres UV. Il est donc important de vérifier la non pénétration de ces filtres à travers la peau pour éviter des effets toxiques éventuels.

Pour ce faire, des tests *in vivo* sur volontaires humains ont été sélectionnés pour se rapprocher au maximum des conditions réelles d'utilisation et des conditions physiologiques.

Cette étude a été réalisée en utilisant la méthode du « Stripping » (Cf. Partie IV.2.3.4) qui consiste à prélever le stratum corneum à l'aide de patches (ou disques adhésifs) aux endroits du corps où les produits ont été préalablement appliqués. Le patch est ensuite retiré d'un coup sec. Cette opération est répétée plusieurs fois afin de retirer un maximum de couches cellulaires du stratum corneum (un patch permet d'enlever une couche de cellules). Le stratum corneum possède en moyenne 20 couches superposées de cellules. Cette méthode non invasive est couramment employée pour étudier les capacités de pénétration cutanée de diverses molécules (Kompaore et col., 1991 ; Escobar-Chavez et col., 2008 ; Liljelind et col., 2007 ; Mattorano et col., 2002 ; Pershing et col., 2003 ; Marginean et col., 1997 ; Teichman et col., 2005 ; Touitou et col., 1998 ; Treffel et col., 1996, Varvaresou et col., 2006, Akomeah et al., 2003 ; Iannuccelli et al., 2008 ).

Les filtres UV sont ensuite extraits du matériel de prélèvement et dosés par les mêmes techniques et les mêmes méthodes que celles utilisées pour l'étude de pénétration cutanée *in vitro*.

Cette étude a obtenu l'approbation (n° P2009/072 le 02/04/2009) du comité d'éthique de l'Hôpital Erasme (Bruxelles, Belgique) et chaque volontaire a signé un formulaire de consentement éclairé avant de se soumettre à l'expérience (Cf. Partie VIII.3).

### **V.3.2 Matériel et méthodes**

#### **V.3.2.1 Matériel**

Les différents filtres UV contenus dans les émulsions testées (E/H: 06E2902 ; E/Si : 06E3101) ainsi que les réactifs sont décrits dans la partie -Matériel et méthodes- (Cf. Partie IV.1).

Le tableau 17 (Cf. Partie V.2.2.2.2) rappelle les concentrations et les caractéristiques de chaque filtre utilisé dans les émulsions (Klein et col., 1998 ; BASF, 2007 ; Ciba, 2006). Les pourcentages expriment les concentrations en filtres et non les concentrations de produits commerciaux.

#### **V.3.2.2 Méthodes**

##### **V.3.2.1.1 Etude *in vivo***

### **Mode opératoire**

Le produit à tester est appliqué sur une surface déterminée de peau de volontaires humains sains (au niveau de la face interne de l'avant bras) après nettoyage de celle-ci à l'eau et au savon suivi d'un séchage. L'application s'effectue à l'aide d'une spatule qui est pesée avant et après application du produit afin d'avoir une mesure exacte de la quantité déposée (10,0 mg sur une surface de 5,3 cm<sup>2</sup>). Le produit est appliqué pour une durée maximum de 8h et les zones d'application ne sont pas

couvertes. Les volontaires ne peuvent ni rincer ni nettoyer les zones traitées pendant toute la durée de l'expérimentation.

A des temps déterminés, des prélèvements du stratum corneum sont réalisés par la technique du stripping qui consiste à appliquer des patches aux endroits du corps, préalablement nettoyés à l'alcool, où les produits solaires ont été appliqués. Le patch est ensuite retiré d'un coup sec. Cette opération est répétée 30 fois afin d'enlever toute la couche cornée. Les filtres UV sont ensuite extraits du matériel de prélèvement et dosés soit par CLHP pour les filtres organiques, soit par une technique ICP-OES pour les filtres inorganiques.

## **Volontaires**

Les sujets admis pour cette expérimentation sont des volontaires humains sains, consentants, âgés de 20 à 40 ans, de type caucasien. Les différentes formulations sont testées chez neuf volontaires.

## **Procédure**

### 1-Préparation de la peau :

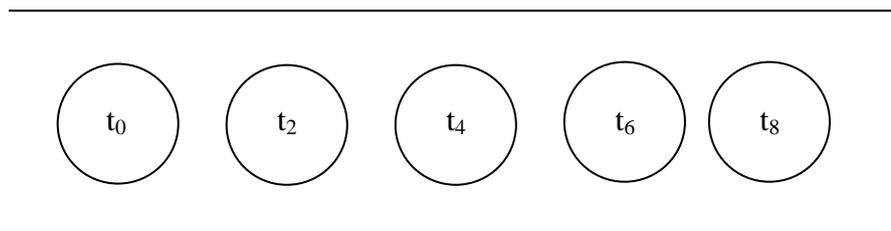
Celle-ci est préalablement nettoyée à l'aide d'un savon puis soigneusement rincée et séchée. La peau ne doit pas être irritée et ne doit pas présenter de blessure éventuelle.

### 2- Application des produits sur la peau :

Les émulsions sont appliquées sur l'avant bras des volontaires en quantité de 2 mg/cm<sup>2</sup> sur une surface bien définie de peau (5,30 cm<sup>2</sup>) délimitée grâce à un dispositif circulaire de 2,6 cm de diamètre, correspondant au diamètre des disques adhésifs (Standard D-Squame<sup>®</sup> disc, Cuderm, Dallas-USA). Les produits sont appliqués à l'aide d'une spatule qui est pesée avant et après l'application de l'émulsion afin de déterminer la quantité exacte de produit appliqué.

Cinq applications sans occlusion sont effectuées sur chaque avant-bras (un type d'émulsion par avant-bras) au temps  $t_0$  (Figure 66). Des prélèvements sont ensuite effectués au niveau de chaque site d'application à différents temps prédéterminés.

- 1-Prélèvement  $t_0$
- 2-Prélèvements  $t_2$  (2h)
- 3-Prélèvements  $t_4$  (4h)
- 4-Prélèvements  $t_6$  (6h)
- 5-Prélèvements  $t_8$  (8h)



**Figure 66:** Schéma montrant les différentes zones d'application des produits sur les avant-bras

### 3- Prélèvement des échantillons de produits à analyser :

L'expérimentation débute immédiatement après l'application du produit avec le prélèvement du stratum corneum à partir de la zone d'application  $t_0$  de l'avant-bras. La durée du test est de 8h (temps d'exposition au soleil maximal estimé sur une journée).

Préalablement à chaque prélèvement, la peau est nettoyée à l'aide d'un carré de papier de 4 cm<sup>2</sup> de surface imbibé de 1 ml d'éthanol, puis elle est séchée à l'air libre. Le papier est conservé à part pour y effectuer les analyses quantitatives des filtres solaires considérés comme restant à la surface de la peau et n'ayant pas pénétré au niveau du stratum corneum (Couteau et col., 2001; Jacobi et col., 2005). Afin de déterminer la rémanence des filtres après les différents temps d'application, la quantité de filtres retrouvée sur le papier est prise en compte et est considérée comme la quantité en filtre qui est restée à la surface de la peau au bout de 8h.

Les prélèvements des différentes couches cellulaires du stratum corneum sont ensuite effectués à l'aide de disques adhésifs (Standard D-Squame<sup>®</sup> disc, diamètre de 2,6 cm Cuderm, Dallas-USA). L'utilisation de papier adhésif « classique » (type papier collant) n'est pas adaptée pour ce genre d'étude et pour réaliser des analyses quantitatives. En effet, l'adhésion entre les différentes parties du papier collant et le

stratum corneum est très variable. Les strippings les plus adaptés sont : les résines de cyanoacrylates (type glue) et les disques adhésifs (D-Squame, Corneofix, Corneodisc). En effet, ces derniers possèdent une certaine rigidité et offrent ainsi une adhésion homogène avec le stratum corneum.

Cette méthode nécessite en moyenne l'utilisation de 20 disques adhésifs pour chaque prélèvement afin de récupérer la majorité du stratum corneum humain. En effet, la couche cornée est formée de 10 à 25 couches de cellules superposées imbriquées dans une bicouche lipidique. Ces chiffres peuvent varier d'une personne à l'autre avec une moyenne de 20 couches cellulaires pour le stratum corneum (Pflücker et col., 1999 ; Jacobi et col., 2005 ; Escobar-Chavez et col., 2008). Dans la littérature, le nombre de prélèvements réalisés à l'aide des disques adhésifs varie entre 7 et 30. La moyenne des prélèvements se situe à 20 également.

Lors de cette étude *in vivo*, nous avons utilisé 30 disques adhésifs pour effectuer un prélèvement de stratum corneum à chaque temps prédéterminé. Nous pouvons considérer que le premier disque permet de récupérer la quantité de filtre qui se situe dans la première couche du stratum corneum de l'épiderme.

Les disques adhésifs ainsi récoltés sont répartis en six groupes distincts :

Groupe 0 – Papier (récolte ce qui est resté en surface de la peau)

Groupe 1 – Disque adhésif 1 (1<sup>ère</sup> couche cellulaire du stratum corneum)

Groupe 2 – Disques adhésifs 2 à 5 (Couches cellulaires 2 à 5 du stratum corneum)

Groupe 3 – Disques adhésifs 6 à 10 (Couches cellulaires 6 à 10 du stratum corneum)

Groupe 4 – Disques adhésifs 11 à 15 (Couches cellulaires 11 à 15 du stratum corneum)

Groupe 5 – Disques adhésifs 16 à 30 (Couches cellulaires 16 à 30 du stratum corneum)

Le même schéma de prélèvement est effectué à  $t_0$ ,  $t_2$ ,  $t_4$ ,  $t_6$  et  $t_8$ .

#### V.3.2.1.2 Analyse des filtres UV

### **1. Les filtres organiques**

La même méthode d'analyse CLHP que pour l'étude *in vitro* a été utilisée (Cf. Partie V.2.2.2.2.1). La méthode d'extraction a été adaptée aux supports des prélèvements.

## **Instrumentation et conditions CLHP, préparation des solutions standards**

Elles sont décrites précédemment (Cf. Partie V.2.2)

### **Méthode d'extraction des filtres à partir des différents prélèvements**

La quantification des filtres UV a été réalisée en utilisant une droite de régression linéaire correspondant à chaque filtre. Chaque groupe correspondant aux différents prélèvements a subi le même traitement. Des solutions de blanc ont été préparées afin de vérifier que la colle présente et les stratum corneum présents sur les patches après les prélèvements n'interféraient pas avec les méthodes d'analyses.

Les prélèvements sont conservés dans un pot fermé en verre brun jusqu'au moment de l'analyse (maximum un jour après les échantillonnages sur volontaire). Ils sont alors traités avec 30 ml de la solution de THF:ACN (80:20, v:v) et passés aux ultrasons pendant 20 min. Cette solution est ensuite amenée à 50,0 ml (Solution 1) avec le même mélange de solvant pour permettre de récupérer tous les filtres UV présents dans les pots. Une dilution d'un facteur 4 dans la solution de MeOH:ACN:THF:H<sub>2</sub>O:Acide acétique (55:15:10:19,5:0,5) est alors effectuée pour éviter d'avoir des résultats hors des limites des droites de régression. Les solutions ainsi obtenues sont ensuite filtrées à travers des filtres de porosité de 0,45 µm puis injectées dans la CLHP.

### **Validation de l'extraction des filtres à partir des différents prélèvements**

Une validation a été effectuée afin de tester l'efficacité de l'extraction ainsi que l'efficacité des prélèvements à l'aide des patches.

Une quantité précise d'émulsion (10,0 mg) est ainsi appliquée sur une plaque en verre de la même façon que les produits sont appliqués sur la peau. Le verre a été choisi car c'est une surface inerte, plane et dans laquelle les filtres UV ne peuvent pas pénétrer. La surface d'application est la même que celle des patches. Après séchage de chaque produit sur les plaques en verre, les strippings sont effectués selon le protocole mis en œuvre pour l'étude sur les volontaires et l'extraction est exécutée selon la méthode décrite ci-dessus. Les pourcentages de récupération sont alors calculés sur base de ce qui a été appliqué au départ.

La même validation a été effectuée pour le prélèvement exécuté à l'aide du carré de papier.

## **2. Les filtres inorganiques**

Ils étaient représentés dans les formulations par le dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) et l'oxyde de zinc ( $\text{ZnO}$ ). Les deux éléments,  $\text{Ti}^{4+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , pouvaient être quantifiés par ICP-OES (Cf. Partie IV.2.3.3).

### Mode opératoire

Les méthodes de digestion et de dissolution des deux oxydes sont les mêmes que celles utilisées pour l'étude *in vitro* (Cf. Partie V.2.2.2.2). L'analyse a donc été effectuée après avoir évaporé 15 ml de solution 1 (Cf. Partie V.3.2.1.2).

Il a été constaté que la colle interférait avec les résultats et donnait des faux positifs, les concentrations étant proportionnelles au nombre de strippings effectués et donc à la quantité de colle présente dans la solution. Des solutions de blancs réalisées avec respectivement 1, 4, 5 et 15 tapes ont ainsi été préparées afin de soustraire ces résultats à ceux trouvés lors de l'étude *in vivo*.

## **V.3.3 Résultats et discussion**

### V.3.3.1 Filtres organiques

#### V.3.3.1.1 Validation de l'extraction des filtres à partir des différents prélèvements

Les tableaux 23 et 24 montrent le taux de recouvrement des filtres UV organiques à partir des disques adhésifs pour les émulsions E/H et E/Si respectivement, après application de celles-ci sur les plaques en verre.

**Tableau 23:** Taux de recouvrement des filtres UV organiques à partir des différents prélèvements réalisés sur les plaques en verre à  $t_0$ : émulsion E/H

| Filtres UV | Taux de recouvrement (%) |                     |                      |                       |                       |              |
|------------|--------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
|            | Stripping<br>1           | Strippings<br>2 à 5 | Strippings<br>6 à 10 | Strippings<br>11 à 15 | Strippings<br>16 à 30 | Total<br>(%) |
| EMC        | 96,1±6,0 %               | 6,7±1,1 %           | -                    | -                     | -                     | 102,8±4,0 %  |
| ED-PABA    | 93,1±1,5 %               | 9,5±2,0 %           | -                    | -                     | -                     | 102,8±1,7 %  |
| DHHB       | 90,3±1,6 %               | 8,5±1,5 %           | -                    | -                     | -                     | 98,8±1,5 %   |
| MBBT       | 69,1±0,3 %               | 32,9±4,5 %          | -                    | -                     | -                     | 102,1±2,4 %  |
| BEMT       | 90,6±2,5 %               | 8,3± 3,2 %          | -                    | -                     | -                     | 99,8±2,0 %   |

**Tableau 24:** Taux de recouvrement des filtres UV organiques à partir des différents prélèvements réalisés sur les plaques en verre à  $t_0$ : émulsion E/Si

| Filtres UV | Taux de recouvrement (%) |                     |                      |                       |                       |              |
|------------|--------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
|            | Stripping<br>1           | Strippings<br>2 à 5 | Strippings<br>6 à 10 | Strippings<br>11 à 15 | Strippings<br>16 à 30 | Total<br>(%) |
| EMC        | 95,6±2,4 %               | 3,1±1,7 %           | -                    | -                     | -                     | 98,6±2,5 %   |
| MBBT       | 71,4±3,3 %               | 25,8±4,1 %          | -                    | -                     | -                     | 97,3±3,7 %   |

Les taux de recouvrement totaux étaient compris entre 97% et 102% pour les cinq filtres solaires à partir des deux types d'émulsions. De plus, les filtres n'étaient plus détectés à partir du stripping n°6 et plus de 90% étaient retrouvés dans le premier stripping. Cependant, on peut constater que pour le MBBT, une quantité moins importante était retrouvée dans le premier patch (69,1±0,3% pour l'émulsion E/H et 71,4±3,3 % pour l'émulsion E/Si). Ceci peut être expliqué par le fait que le MBBT est

une suspension aqueuse de 50% de particules de MBBT. Les strippings ont plus de difficulté à récolter les filtres lorsqu'ils sont sous forme solide. Ceci est probablement dû au fait que les particules peuvent se retrouver sous forme de plusieurs couches lors de leur application, ce qui oblige à utiliser plus de patches pour enlever la totalité des particules. Ce phénomène est également observé pour les filtres inorganiques.

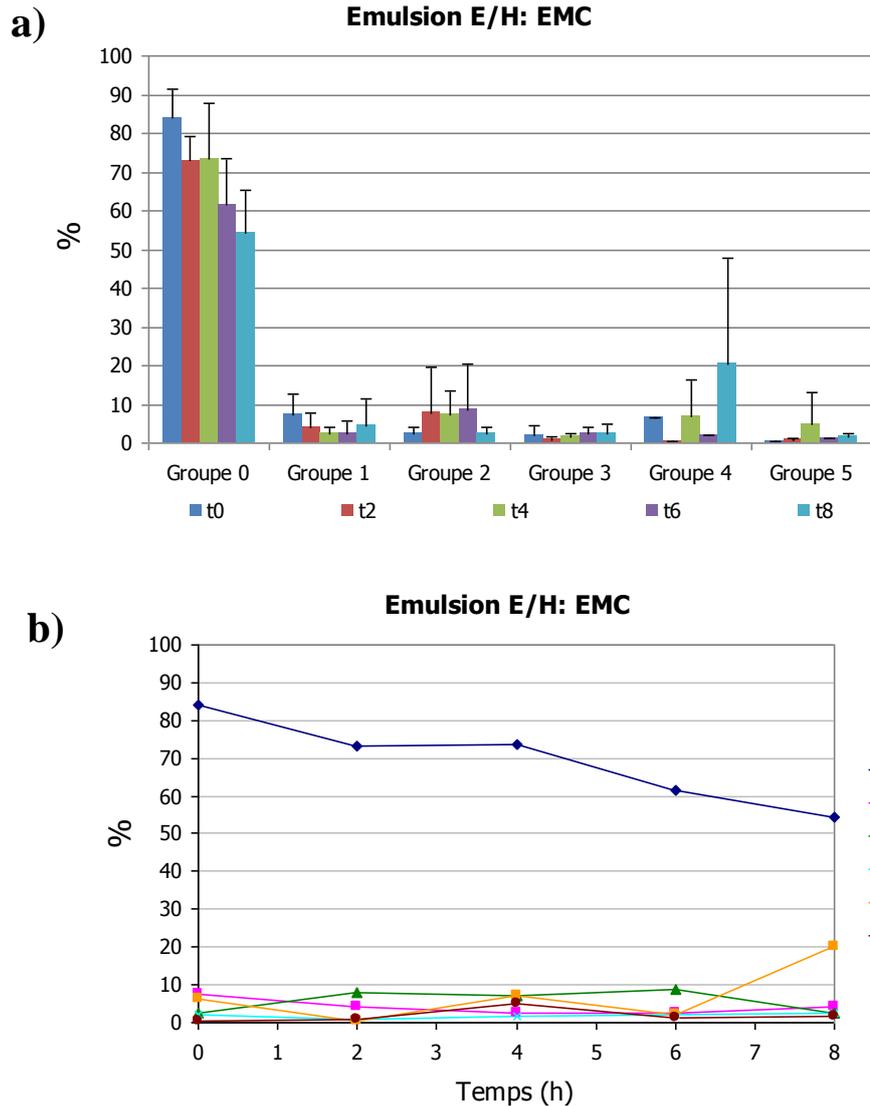
V.3.3.1.2 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée des filtres organiques: émulsion E/H

Les figures suivantes (67 à 71) montrent la répartition des filtres solaires dans les différents groupes de disques adhésifs (et donc dans les différentes couches cellulaires du stratum corneum) en fonction du temps, ainsi que le taux de pénétration des filtres en fonction du temps. Les tableaux (25 à 29) associés à chaque figure montrent les quantités totales en filtre récupérées aux différents temps de prélèvement après avoir récolté la totalité du stratum corneum à l'aide des 30 disques adhésifs.

**EMC:**

**Tableau 25:** Taux de recouvrement total de l'EMC dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 disques adhésifs (émulsion E/H)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |            |            |           |           |           |
|---|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
|   | $t_0$      | $t_2$      | $t_4$     | $t_6$     | $T_8$     |
| <b>EMC</b>                                | 102,9±6,7% | 87,4±12,1% | 96,7±9,4% | 78,1±9,7% | 85,5±8,4% |



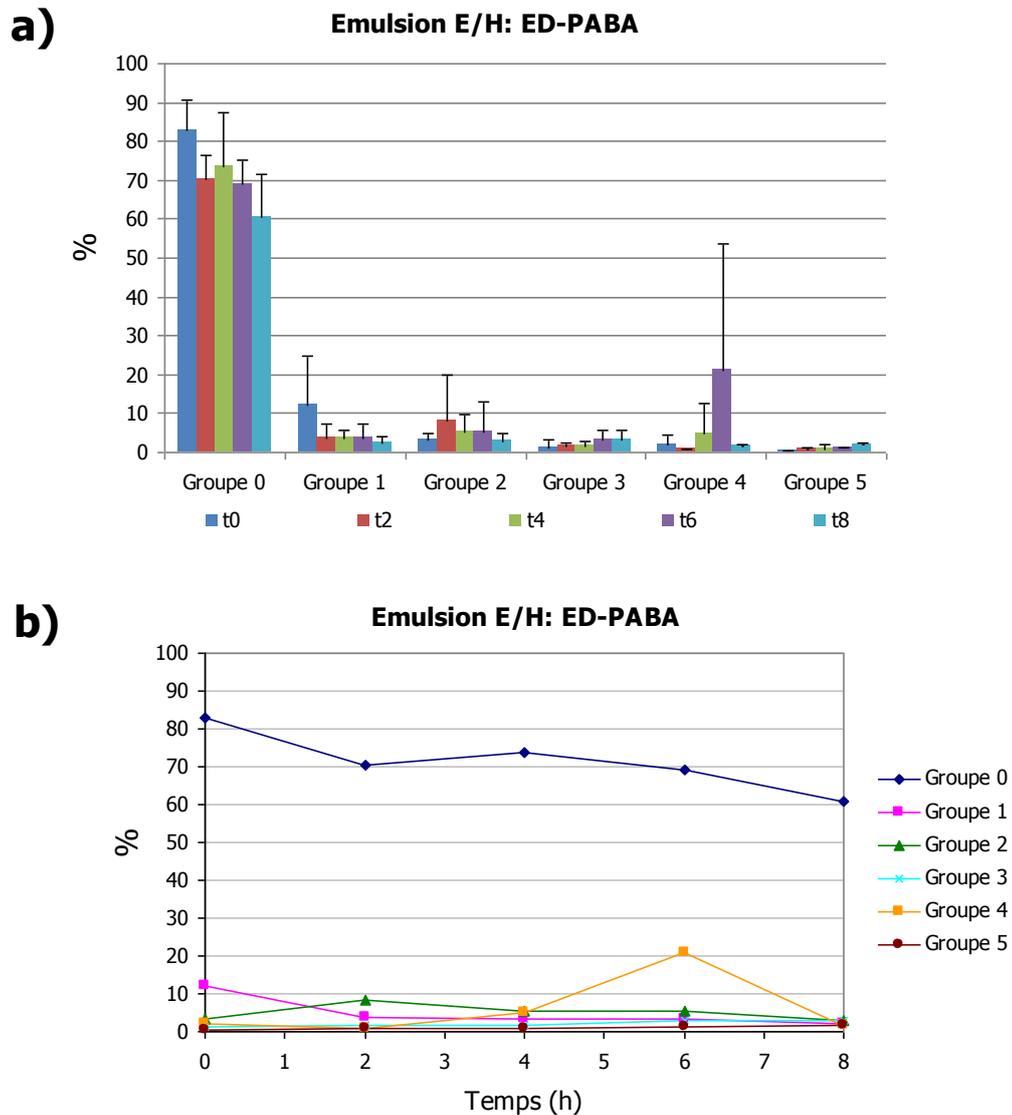
**Figure 67: (a)** Répartition, en pourcentage, de l'EMC à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/H et **(b)** taux de pénétration de l'EMC en fonction du temps à travers le stratum corneum

Nous pouvons observer une diminution de la quantité d'EMC dosée à la surface de la peau (Groupe 0=Papier) en fonction du temps. En effet, la quantité d'EMC retrouvée à ce niveau diminue de  $84,1 \pm 7,6\%$  au temps  $t_0$  à  $54,3 \pm 11,2\%$  au temps  $t_8$ .

De plus, une diminution de la quantité totale en filtre récupérée par disque adhésif (30 au total) est constatée tout au long de l'expérience (taux de recouvrement de

102,9±6,7% en début d'expérience et de 85,5±8,3% en fin d'expérience). Une quantité négligeable ( $0,3 \pm 0,0\%$  à  $t_0$  et  $1,8 \pm 0,6\%$  à  $t_8$ ) de filtre est retrouvée dans les derniers prélèvements, et donc dans les couches profondes du stratum corneum.

## ED-PABA:



**Figure 68: (a)** Répartition, en pourcentage, de l'ED-PABA à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/H et **(b)** taux de pénétration de l'ED-PABA en fonction du temps à travers le stratum corneum

**Tableau 26:** Taux de recouvrement total de l'ED-PABA dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 disques adhésifs (émulsion E/H)

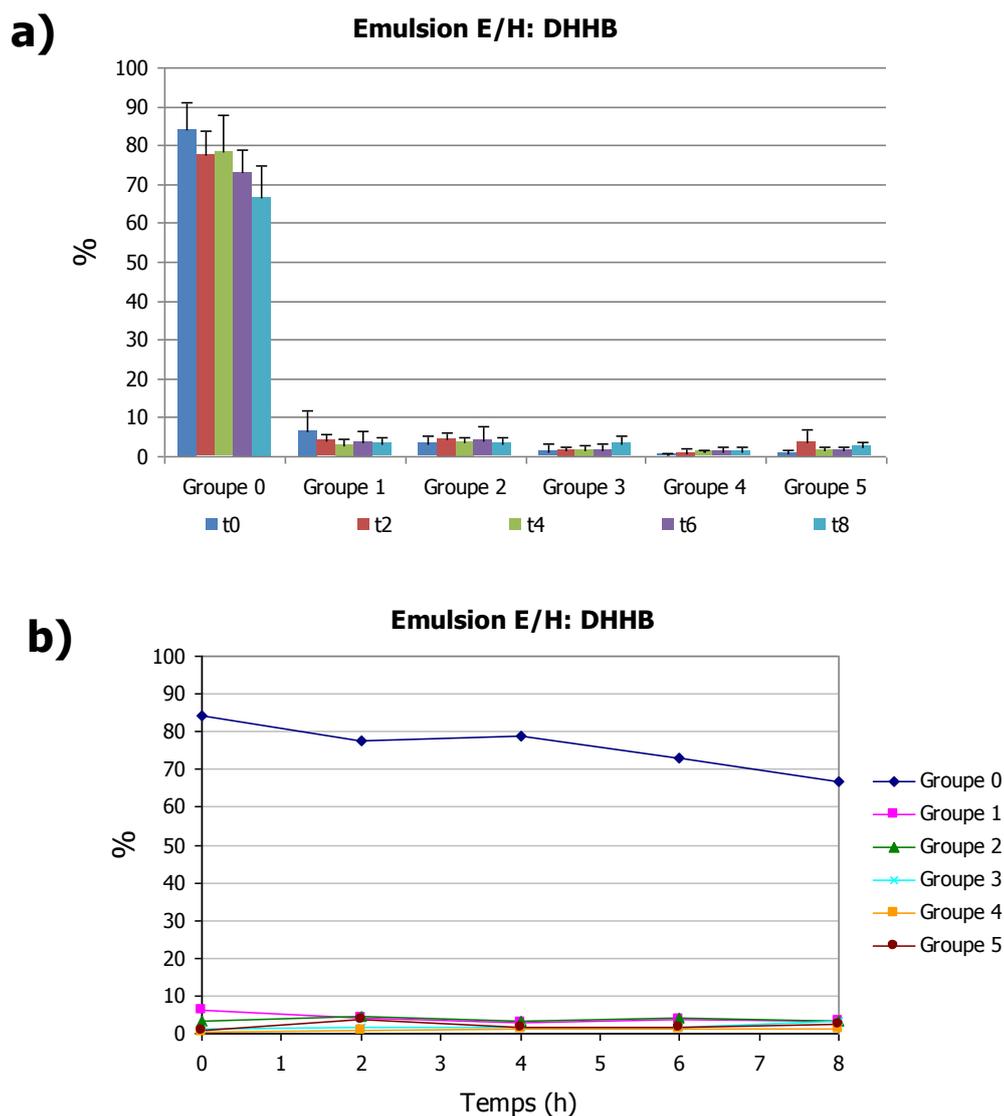
| Pourcentage en filtre après 30 strippings |            |            |           |             |           |
|---|------------|------------|-----------|-------------|-----------|
|   | $t_0$      | $t_2$      | $T_4$     | $t_6$       | $t_8$     |
| <b>ED-PABA</b>                            | 102,1±7,0% | 85,7±11,8% | 90,0±9,8% | 103,1±13,4% | 72,3±9,5% |

Une quantité plus importante est retrouvée à la surface de la peau au  $t_8$  si nous comparons ces résultats à ceux de l'EMC (plus de 55% pour l'EMC et plus de 60% pour ED-PABA). De la même façon que pour l'EMC, nous observons une diminution de la quantité d'ED-PABA en fonction du temps à la surface de la peau. En effet, la quantité d'ED-PABA retrouvée à ce niveau diminue de  $82,8 \pm 8,0\%$  au temps  $t_0$  à  $60,7 \pm 10,7\%$  au  $t_8$ . De plus, une diminution de la quantité totale récupérée d'ED-PABA est constatée à la fin de l'expérience (de  $102,1 \pm 7,0\%$  en début d'expérience à  $72,3 \pm 9,5\%$  en fin d'expérience). Une quantité négligeable ( $0,3 \pm 0,0\%$  à  $t_0$  et  $1,8 \pm 0,6\%$  à  $t_8$ ) de filtre est retrouvée dans les derniers prélèvements, et donc dans les couches profondes du stratum corneum.

### **DHHB:**

**Tableau 27:** Taux de recouvrement total de DHHB dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 disques adhésifs (émulsion E/H)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |           |            |            |           |            |
|---|-----------|------------|------------|-----------|------------|
|   | $t_0$     | $t_2$      | $t_4$      | $t_6$     | $t_8$      |
| <b>DHHB</b>                               | 96,3±5,2% | 92,5±12,1% | 89,5±12,3% | 85,9±9,6% | 80,6±12,0% |



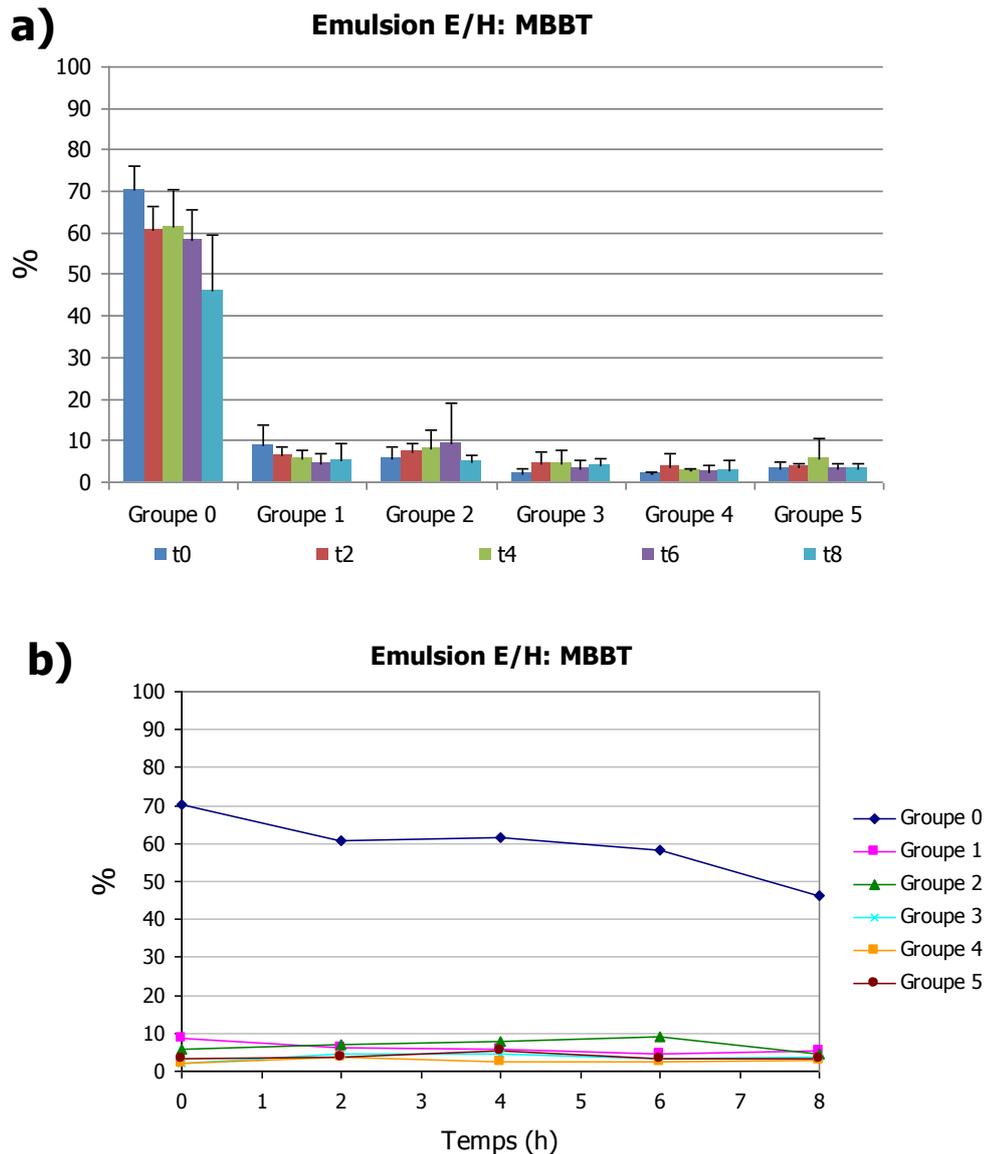
**Figure 69: (a)** Répartition, en pourcentage, du DHHB à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/H et **(b)** taux de pénétration de DHHB en fonction du temps à travers le stratum corneum

Les mêmes observations que pour l'ED-PABA sont effectuées.

Une quantité plus importante est retrouvée à la surface de la peau si nous comparons ces résultats à ceux de l'EMC (plus de 55% pour l'EMC et plus de 65% pour DHHB). De même que pour l'EMC et ED-PABA, nous pouvons observer une diminution de la quantité de DHHB en fonction du temps à la surface de la peau. En effet, la quantité de DHHB retrouvée diminue de  $84,3 \pm 6,8\%$  au temps  $t_0$  à  $66,8 \pm 8,0\%$  au  $t_8$ . De plus, une diminution de la quantité totale récupérée en filtre est

constatée à la fin de l'expérience (de  $96,3 \pm 5,2\%$  en début d'expérience à  $80,6 \pm 12,0\%$  en fin d'expérience). Une quantité négligeable ( $0,7 \pm 0,7\%$  à  $t_0$  et  $2,5 \pm 1,2\%$  à  $t_8$ ) de filtre est retrouvée dans les derniers prélèvements, et donc dans les couches profondes du stratum corneum.

## **MBBT:**



**Figure 70: (a)** Répartition, en pourcentage, du MBBT à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/H et **(b)** taux de pénétration de MBBT en fonction du temps à travers le stratum corneum

**Tableau 28:** Taux de recouvrement total de MBBT dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 disques adhésifs (émulsion E/H)

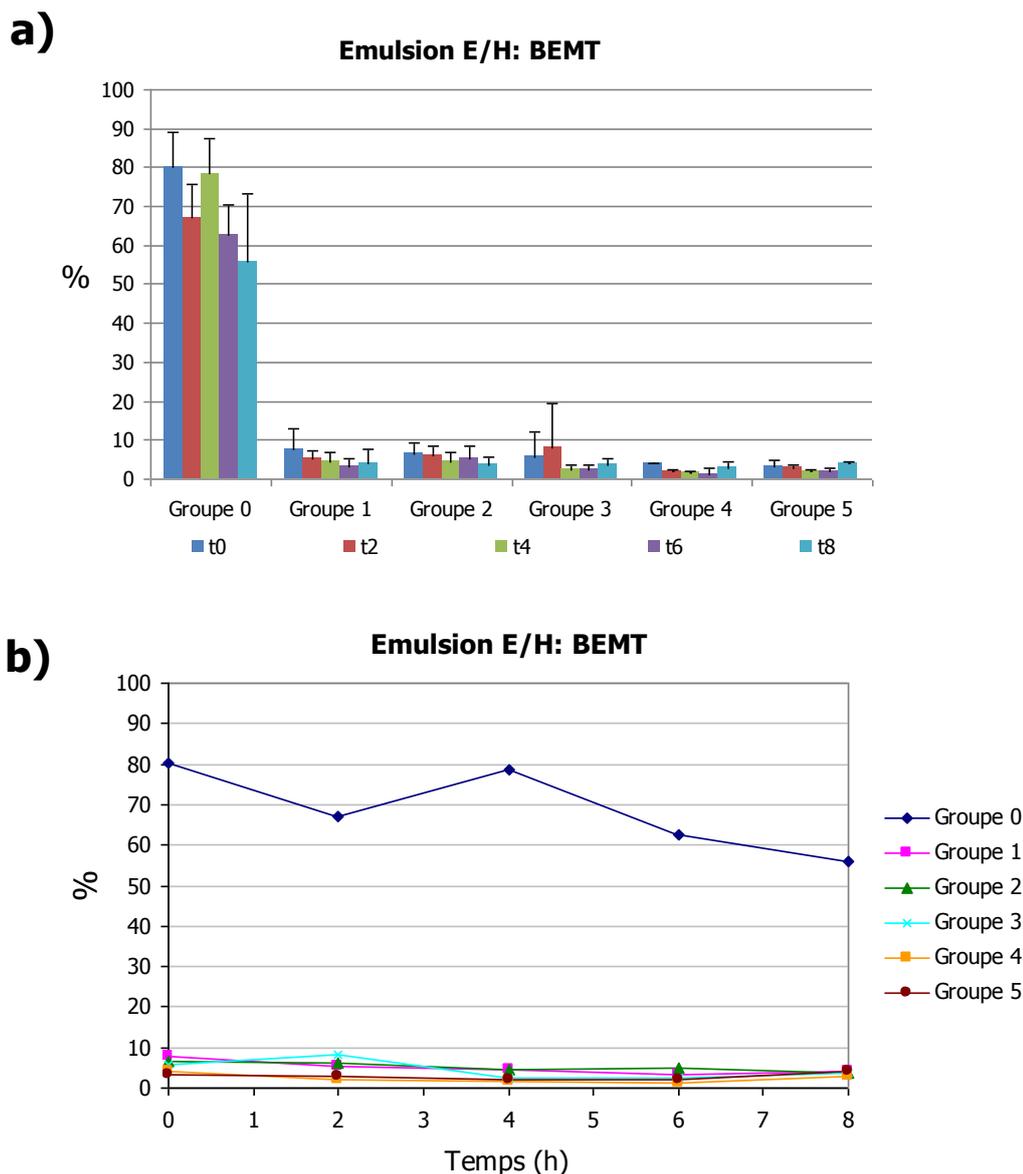
| Pourcentage en filtre après 30 strippings |           |           |           |           |           |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|   | $t_0$     | $t_2$     | $t_4$     | $t_6$     | $t_8$     |
| <b>MBBT</b>                               | 92,2±4,6% | 81,7±9,8% | 83,3±9,7% | 69,1±7,3% | 66,1±8,5% |

La quantité de MBBT diminue en fonction du temps à la surface de la peau (de 70,4 ± 5,7% au temps  $t_0$  à 46,2 ± 13,5% au temps  $t_8$ ). De façon générale, les mêmes observations que pour ED-PABA et DHHB sont faites. Une diminution de la quantité totale récupérée en MBBT est constatée à la fin de l'expérience (de 92,2±4,6% en début d'expérience à 66,1±5,6% en fin d'expérience). Comme pour les autres filtres, une quantité négligeable (3,3±1,6% à  $t_0$  et 3,2±1,3% à  $t_8$ ) de filtre est retrouvée dans les derniers prélèvements, et donc dans les couches profondes du stratum corneum.

**BEMT:**

**Tableau 29:** Taux de recouvrement total de BEMT dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 disques adhésifs (émulsion E/H)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |            |           |           |            |           |
|---|------------|-----------|-----------|------------|-----------|
|   | $t_0$      | $t_2$     | $t_4$     | $t_6$      | $t_8$     |
| <b>BEMT</b>                               | 107,7±8,9% | 91,5±5,2% | 93,4±5,2% | 76,6±11,7% | 74,3±4,4% |



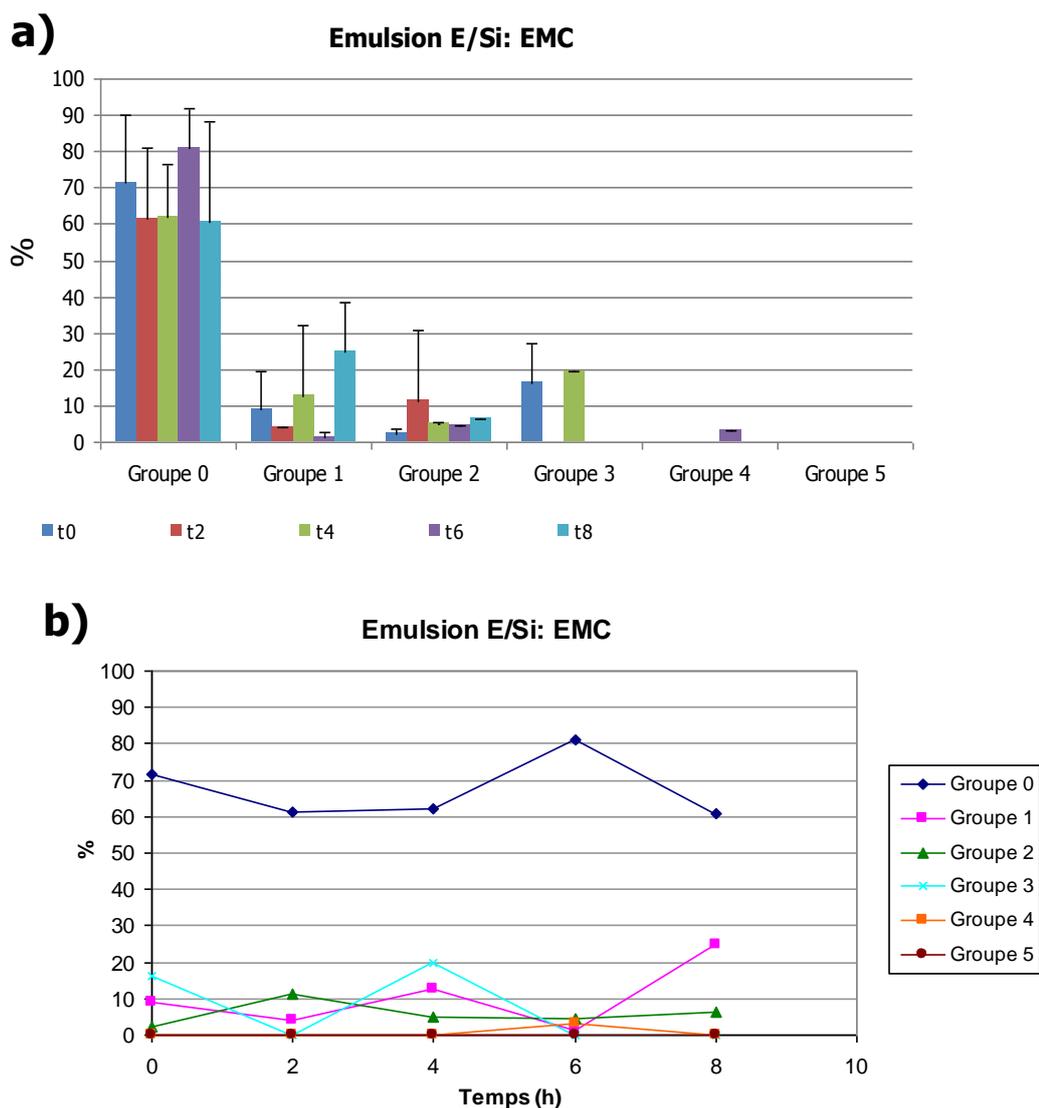
**Figure 71: (a)** Répartition, en pourcentage, du BEMT à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/H et **(b)** taux de pénétration du BEMT en fonction du temps à travers le stratum corneum

De façon générale, les mêmes observations que pour les autres filtres sont effectuées. Nous observons une diminution de la quantité en filtres UV à la surface de la peau de  $80,2 \pm 8,7\%$  au temps  $t_0$  à  $56,0 \pm 17,1\%$  au temps  $t_8$ . La quantité totale de BEMT recouvrée tout le long de l'expérience est  $107,7 \pm 8,9\%$  au temps  $t_0$  et de  $74,3 \pm 4,4\%$  au  $t_8$ . Comme pour les autres filtres, une quantité négligeable

( $3,2 \pm 1,5\%$  à  $t_0$  et  $4,0 \pm 0,7\%$  à  $t_8$ ) de filtre est retrouvée dans les derniers prélèvements, et donc dans les couches profondes du stratum corneum.

V.3.3.1.3 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée des filtres organiques: émulsion E/Si

**EMC:**



**Figure 72: (a)** Répartition, en pourcentage, de l'EMC à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/Si et **(b)** taux de pénétration de l'EMC en fonction du temps à travers le stratum corneum

**Tableau 30:** Taux de recouvrement total de l'EMC dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 strippings (émulsion E/Si)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |                |                |                |                |                |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | T <sub>0</sub> | t <sub>2</sub> | t <sub>4</sub> | t <sub>6</sub> | T <sub>8</sub> |
| <b>EMC</b>                                | 99,1±10,3%     | 77,1±13,0%     | 99,6±8,5%      | 90,2±15,4%     | 91,9±13,8%     |

On observe ici un pourcentage plus élevé en filtre dans les couches supérieures du stratum corneum, par rapport à l'émulsion E/H. La quantité d'EMC retrouvée à la surface de la peau est relativement constante au cours du temps (71,5 ± 18,4% au temps t<sub>0</sub> et 60,6 ± 27,7% au temps t<sub>8</sub>). L'EMC n'a pas été retrouvé dans les couches profondes de stratum corneum.

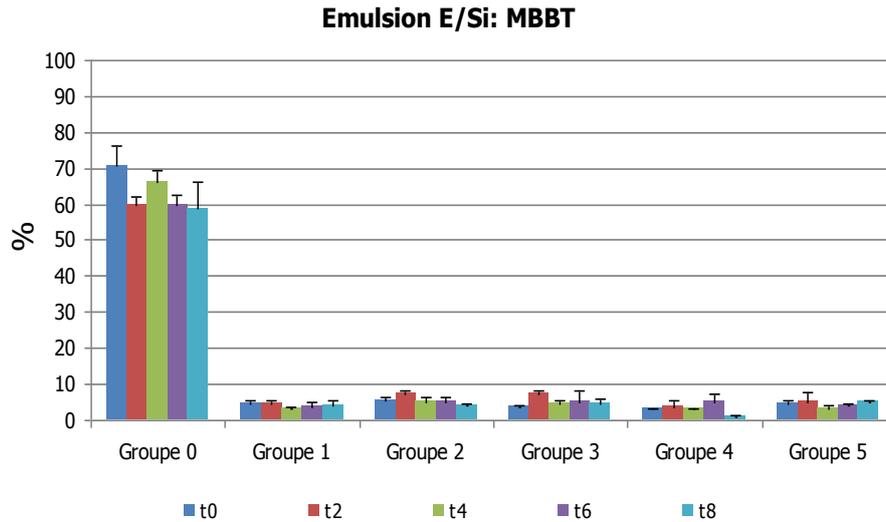
### **MBBT:**

La quantité de MBBT à la surface de la peau a diminué de 70,9 ± 5,4% au temps t<sub>0</sub> à 59,0 ± 0,9% au temps t<sub>8</sub>. La quantité totale de BEMT recouverte tout le long de l'expérience est 92,5 ± 9,2% au temps t<sub>0</sub> et de 79,7±12,3% au t<sub>8</sub>. Comme pour les autres filtres, une quantité négligeable (3,0±0,3% à t<sub>0</sub> et 4,9±0,7% à t<sub>8</sub>) de filtre est retrouvée dans les derniers prélèvements, et donc dans les couches profondes du stratum corneum.

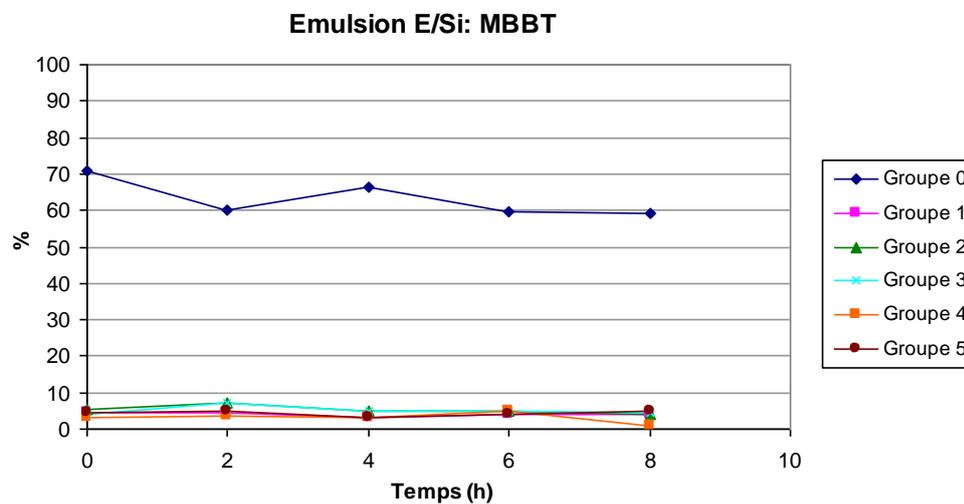
**Tableau 31:** Taux de recouvrement total de MBBT dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 disques adhésifs (émulsion E/Si)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |                |                |                |                |                |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | t <sub>0</sub> | t <sub>2</sub> | t <sub>4</sub> | t <sub>6</sub> | t <sub>8</sub> |
| <b>MBBT</b>                               | 92,5±9,2%      | 84,7±7,8%      | 84,0±8,1%      | 75,4±8,8%      | 79,7±12,1%     |

a)



b)



**Figure 73:** (a) Répartition, en pourcentage, de MBBT à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/Si et (b) taux de pénétration de l'EMC en fonction du temps à travers le stratum corneum

#### V.3.3.1.4 Discussion des résultats de la pénétration cutanée des filtres organiques

Le groupe 0 représente ce qui reste en surface de la peau (donc ce qui a été récolté dans le papier). Le groupe 1 représente la 1<sup>ère</sup> assise de la couche cornée. Les autres groupes représentent les assises plus profondes de la couche cornée. Nous pouvons observer qu'une quantité significative de filtre reste à la surface de la peau.

En effet, si nous considérons ce qui est récupéré sur le papier, minimum 60% de tous les filtres  $\gamma$  sont présents 4h après l'application pour les deux types d'émulsion (et même 8h après l'application pour EMC, DHHB et ED-PABA à partir de l'émulsion E/H). Le pourcentage de filtre qui reste en surface de la peau diminue plus fortement à partir du temps  $t_6$ . La diminution de la quantité de filtre en surface de la peau au cours du temps est due aux conditions expérimentales. En effet, il est difficile d'empêcher totalement les frottements sur les avant-bras des volontaires pendant toute la durée du test et donc les pertes de filtres solaires.

La quantité de filtre retrouvée diminue au cours des 5 prélèvements. Des quantités similaires sont retrouvées au niveau du groupe 1 (1<sup>ère</sup> couche cellulaire du stratum corneum) et du groupe 2 (les quatre couches cellulaires suivantes). La même observation est faite pour les groupes 3, 4 et 5, avec le groupe 5 qui représente les 15 dernières couches du stratum corneum.

Malgré une faible quantité retrouvée dans les couches les plus profondes du stratum corneum, une pénétration des filtres organiques à travers les différentes assises de la couche cornée est observée. Cette étude a été réalisée sur des volontaires sains qui ne présentent pas de dommages cutanés. La pénétration à travers le stratum corneum est donc minimale. Cependant, l'épaisseur et l'intégrité de celui-ci peuvent être différentes d'une personne à l'autre. En effet, il peut être endommagé lors de brûlures et d'expositions répétées au soleil. De plus, les enfants et les personnes âgées ont un stratum corneum moins dense et plus fin que les personnes qui ont été sélectionnées pour cette étude. Dans ces conditions-là, la pénétration cutanée pourrait éventuellement augmenter. Une utilisation intensive ainsi qu'une application sur des zones plus importantes peuvent également augmenter le potentiel de pénétration cutanée.

D'une manière générale, une grande quantité de filtres organiques reste à la surface de la peau. En effet, ils présentent tous des caractéristiques physicochimiques qui ne sont pas favorables à une pénétration cutanée (Cf. Partie V.2.3.1.2).

Comme cela a été dit précédemment, le  $\log P_{o/w}$  (log du Coefficient de partage octanol/eau) des molécules doit être compris entre 2 et 5 (pour la peau, le coefficient de partage optimum avec lequel le flux maximal est atteint doit être de 1). Avec ces

valeurs, la balance lipophile/hydrophile est idéale pour permettre une diffusion passive des molécules à travers la peau.

Si les molécules ont un coefficient de partage trop faible, elles présentent une solubilité trop importante dans l'eau et ne passent donc pas le stratum corneum. Si, par contre le  $\log P_{O/W}$  est trop élevé, elles sont trop lipophiles et ont la capacité de se dissoudre dans le stratum corneum et ne passeront pas les tissus riches en eau de la peau (Barry, 1983). Aucun des cinq filtres ne présente les caractéristiques physico-chimiques idéales pour permettre une pénétration cutanée ( $\log P_{O/W}$  compris entre 2 et 5), en effet, aucun d'entre eux ne possède un, il est de 5,8 pour l'EMC, 5,77 pour ED-PABA, 6 pour le DHHB, 12,7 pour le MBBT et 5,4 pour le BEMT. Ils présentent donc tous des propriétés trop lipophiles pour permettre le passage cutané. Donc même si des molécules présentent un faible poids moléculaire comme l'EMC (PM=290 g/mol) et l'ED-PABA (PM=277 g/mol), cela ne compense pas la lipophilicité élevée de ces filtres. C'est pour cela qu'une quantité négligeable de filtre est retrouvée dans les couches profondes du stratum corneum

De nombreuses études ont déjà été réalisées par différentes équipes pour étudier la pénétration cutanée des filtres UV organiques. Elles ont été effectuées essentiellement sur les benzophénones, l'oxybenzone, les dérivés camphrés, l'EMC et certaines sur le MBBT (Gonzalez et col., 2005 ; Wang et col., 2006 ; Couteau et col., 2001 ; Janjua et col., 2004 ; Janjua et col., 2008 ; Marginean et col., 1997 ; Treffel et Gabard, 1996 ; Mavon et al, 2006). Peu ou pas d'études *in vivo* ont été réalisées sur les trois autres filtres organiques étudiés ici (ED-PABA, DHHB et BEMT). Il était donc intéressant de voir le comportement de ces trois filtres au niveau d'un éventuel passage cutané.

Comme cela a déjà été constaté dans d'autres publications, le MBBT ne pénètre pas la barrière cutanée (Mavon et col., 2006). En effet, sa faible solubilité dans l'eau (0,007mg/l), son haut poids moléculaire (659 g/mol) et sa très grande lipophilicité ( $\log P_{O/W} = 12,7$ ) ne favorisent pas sa pénétration cutanée. D'autre part, les nombreuses études concernant l'EMC corroborent elles aussi les résultats obtenus. Malgré sa faible pénétration cutanée observée lors de l'étude *in vitro*, il ne passe pas à travers la peau (Treffel et col., 1996). Cependant, des études ont montré que l'EMC, ainsi que d'autres filtres solaires, était détecté dans les urines ainsi que le

plasma après avoir appliqué le produit solaire de façon répétée sur l'entièreté du corps (Janjuan, 2004 ; Janjuan, 2008).

Une différence est observée entre les émulsions E/H et E/Si. En effet, l'EMC est retrouvé à des concentrations plus élevées dans les assises supérieures de la couches cornées lorsque l'on considère les résultats obtenus à partir de l'émulsion E/Si. Ceci est dû au fait que l'émulsion E/H, de par sa composition, est plus occlusive que l'émulsion E/Si, ce qui provoque une augmentation de la capacité de pénétration des filtres. L'émulsion E/Si a été formulée à partir de silicones volatiles qui s'évaporent plus rapidement après l'application du produit sur la peau. Ceci entraîne une hydratation moins importante de la peau par rapport à l'application de l'émulsion E/H. La pénétration des filtres UV à travers la peau en général et à travers le stratum corneum en particulier est moins aisée à partir d'une peau moins hydratée (Martini, 2003). Les filtres UV organiques passeront alors moins facilement la barrière cutanée à partir de l'émulsion E/Si que de l'émulsion E/H. Le véhicule a donc une influence sur la pénétration des filtres solaires comme cela a déjà été dit pour l'étude *in vitro* et comme cela a déjà été vérifié (Chatelain et col., 2003, Bennat et col, 2000).

Nous constatons que le MBBT va plus profondément dans le stratum corneum que les autres filtres (3,2% à  $t_8$  pour l'émulsion E/H et 3,9% à  $t_8$  pour l'émulsion E/Si). Ceci est en accord avec les résultats obtenus dans l'étude *in vitro* qui montraient une légère pénétration cutanée de ce filtre, ce qui signifiait donc une capacité à aller dans les couches profondes du stratum corneum.

Cependant, ces observations n'ont pas été faites pour l'EMC, contrairement à l'étude *in vitro*. Il faut savoir que les études *in vitro* ont tendance à surestimer les résultats qui pourraient être obtenus lors des études *in vivo* (Benech-Kiefer et col., 2003). En effet, la flexibilité de la peau excisée est plus faible que celle de la peau vivante, ce qui favorise la pénétration cutanée. De plus, la couche hypodermique n'est pas présente pour l'étude *in vitro*, ce qui peut expliquer le fait que le filtre se retrouve dans le filtre récepteur, car c'est une couche cutanée en moins à traverser (Bennat et col., 2000).

### V.3.3.2 Filtres inorganiques

#### *V.3.3.2.1 Validation de l'extraction des filtres à partir des différents prélèvements*

**Tableau 32:** Taux de recouvrement des filtres UV inorganiques à partir des différents prélèvements réalisés sur les plaques en verre à  $t_0$ : émulsion E/H

| Filtres UV       | Taux de recouvrement (%) |                     |                      |                       |                       |              |
|------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
|                  | Stripping<br>1           | Strippings<br>2 à 5 | Strippings<br>6 à 10 | Strippings<br>11 à 15 | Strippings<br>16 à 30 | Total<br>(%) |
| TiO <sub>2</sub> | 74,7±2,4 %               | 15,9±1,7 %          | -                    | -                     | -                     | 90,6±2,0 %   |
| ZnO              | 65,8±2,3 %               | 31,6±4,1 %          | -                    | -                     | -                     | 97,4±5,6 %   |

**Tableau 33:** Taux de recouvrement des filtres UV inorganiques à partir des différents prélèvements réalisées sur les plaques en verre à  $t_0$ : émulsion E/Si

| Filtres UV       | Taux de recouvrement (%) |                     |                      |                       |                       |              |
|------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
|                  | Stripping<br>1           | Strippings<br>2 à 5 | Strippings<br>6 à 10 | Strippings<br>11 à 15 | Strippings<br>16 à 30 | Total<br>(%) |
| TiO <sub>2</sub> | 65,7±2,4 %               | 19,0±6,7 %          | -                    | -                     | -                     | 84,7±8,3 %   |
| ZnO              | 72,7±2,3 %               | 22,4±4,6 %          | -                    | -                     | -                     | 95,1±3,4 %   |

Les taux de recouvrement totaux étaient compris entre  $84,7 \pm 8,3 \%$  et  $97,4\% \pm 5,6 \%$  pour le TiO<sub>2</sub> et le ZnO à partir des deux types d'émulsion.

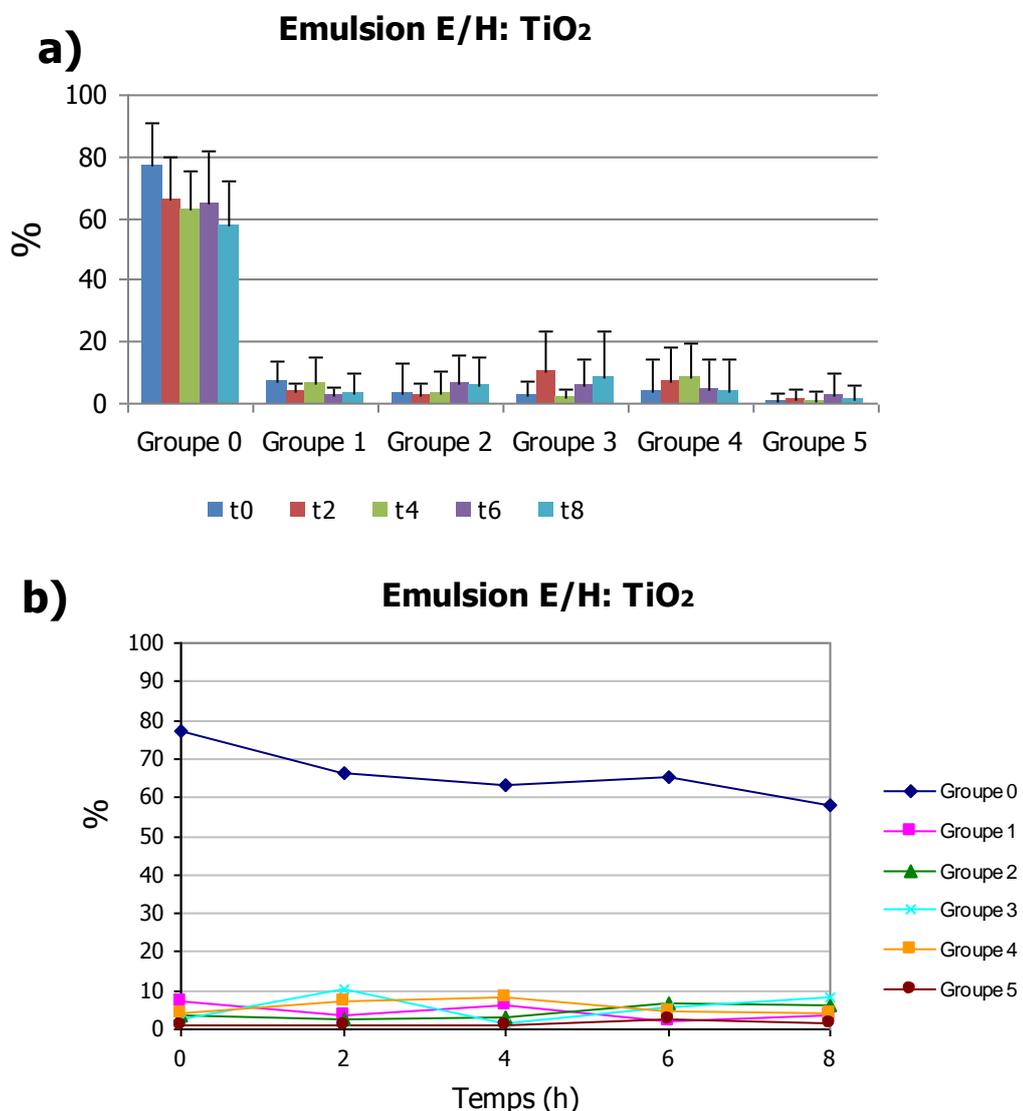
Plus de 65% étaient retrouvés dans le premier stripping. De la même façon que pour le MBBT, ceci peut être expliqué par le fait que les strippings ont plus de difficulté à récolter les filtres lorsqu'ils sont sous formes solides. Ceci est probablement dû au fait que les particules se retrouvent sous forme de plusieurs couches lors de leur

application, ce qui oblige à utiliser plus de patches pour prélever la totalité des particules.

Tout comme les filtres organiques, ils n'étaient plus détectés à partir du stripping n°6.

V.3.3.2.2 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée des filtres inorganiques: émulsion E/H

**Dioxyde de Titane**



**Figure 74:** (a) Répartition, en pourcentage, de TiO<sub>2</sub> à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/H et (b) taux de pénétration de TiO<sub>2</sub> en fonction du temps à travers le stratum corneum

**Tableau 34:** Taux de recouvrement total de TiO<sub>2</sub> dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 strippings (émulsion E/H)

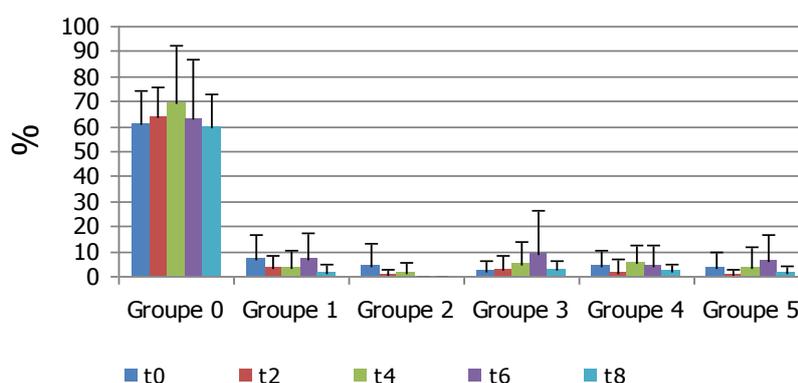
| Pourcentage en filtre après 30 strippings |                |                |                |                |                |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | t <sub>0</sub> | t <sub>2</sub> | t <sub>4</sub> | t <sub>6</sub> | t <sub>8</sub> |
| <b>TiO<sub>2</sub></b>                    | 95,1±8,1%      | 91,4±8,0%      | 75,7±6,1%      | 70,5±7,0%      | 74,7±9,3%      |

La quantité de TiO<sub>2</sub> retrouvée à la surface de la peau variait de 77,0 ± 14,0% au temps t<sub>0</sub> à 74,7±9,3% au temps t<sub>8</sub>. Le taux de recouvrement du filtre UV était supérieur à 70% tout au long de l'expérience.

## Oxyde de Zinc

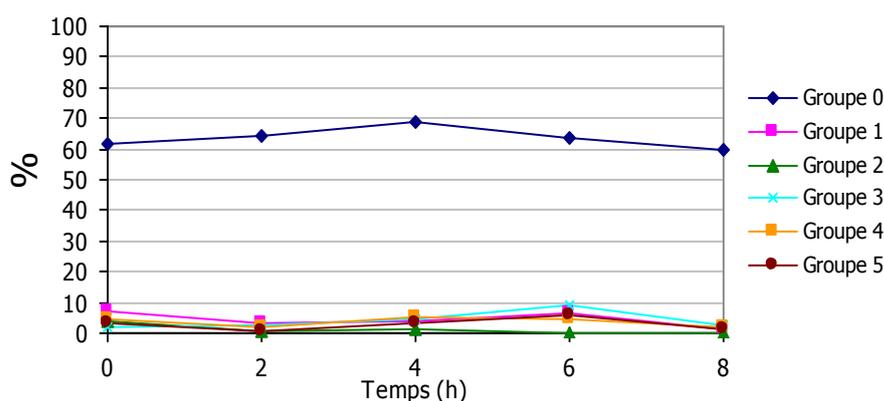
a)

### Emulsion E/H: ZnO



b)

### Emulsion E/H: ZnO



**Figure 75:** (a) Répartition, en pourcentage, de ZnO à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/Si et (b) taux de pénétration de ZnO en fonction du temps à travers le stratum corneum

**Tableau 35:** Taux de recouvrement du ZnO dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide de 30 strippings (émulsion E/H)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |                |                |                |                |                |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | t <sub>0</sub> | t <sub>2</sub> | t <sub>4</sub> | t <sub>6</sub> | t <sub>8</sub> |
| <b>ZnO</b>                                | 70,7±7,2%      | 66,7±5,8%      | 81,0±10,4%     | 79,6±11,7%     | 68,9±2,4%      |

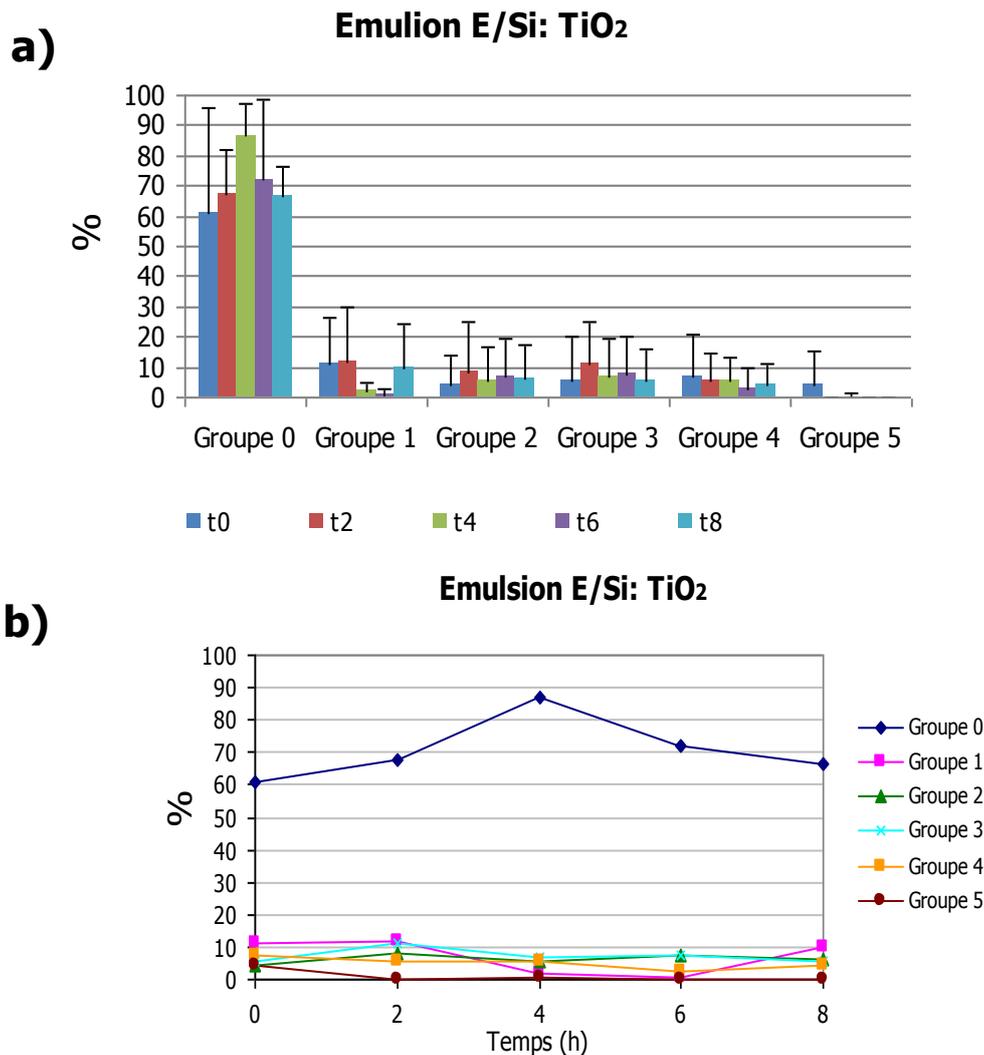
La quantité de ZnO retrouvée à la surface de la peau variait de 62,3 % ± 9,8 % au temps t<sub>0</sub> à 59,8 % ± 13,8 % au temps t<sub>8</sub>. Elle était donc stable au cours du temps et peu de variations ont été observées au cours de l'expérience. Le taux de recouvrement du filtre UV était supérieur à 66 % tout au long de l'expérimentation.

*V.3.3.2.3 Résultats de l'évaluation de la pénétration cutanée: émulsion E/Si*

**Dioxyde de Titane**

**Tableau 36:** Taux de recouvrement total de TiO<sub>2</sub> dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 strippings (émulsion E/Si)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |                |                |                |                |                |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | t <sub>0</sub> | t <sub>2</sub> | t <sub>4</sub> | t <sub>6</sub> | t <sub>8</sub> |
| <b>TiO<sub>2</sub></b>                    | 95,8±16,9%     | 104,6±11,8%    | 107,3±7,6%     | 90,3±10,0%     | 92,1±8,9%      |

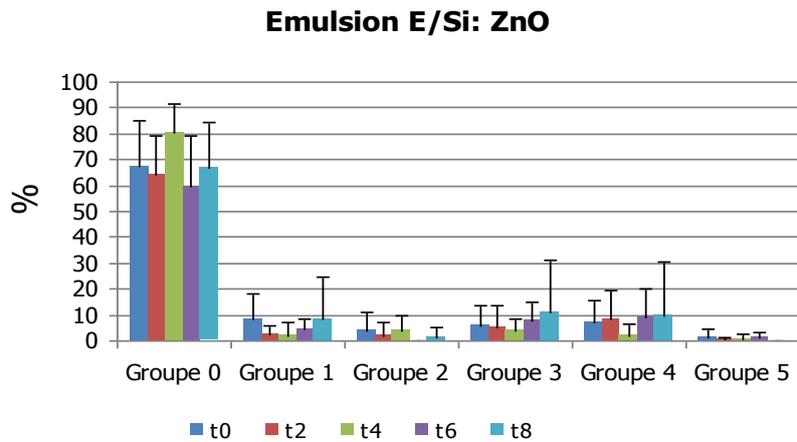


**Figure 76: (a)** Répartition, en pourcentage, de TiO<sub>2</sub> à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/Si et **(b)** taux de pénétration du TiO<sub>2</sub> en fonction du temps à travers le stratum corneum

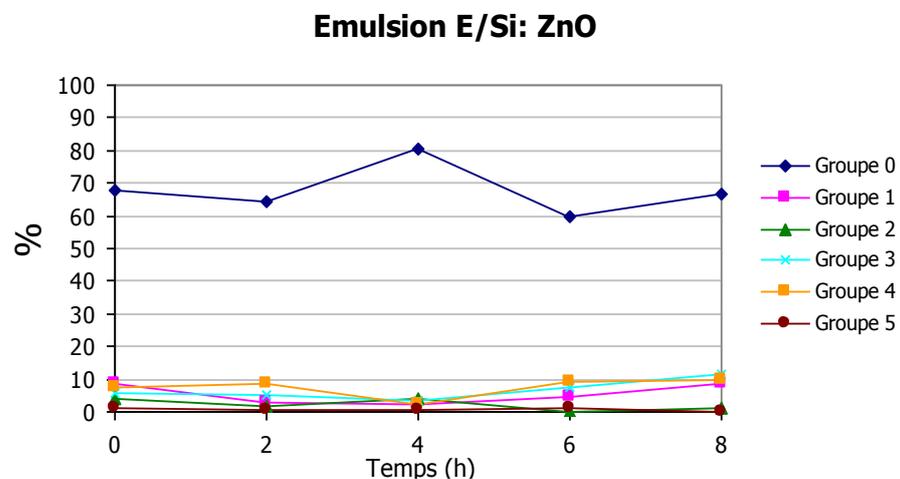
La quantité de TiO<sub>2</sub> retrouvée à la surface de la peau variait de  $61,2 \pm 34,6\%$  au temps t<sub>0</sub> à  $66,4 \pm 10,2\%$  au temps t<sub>8</sub>. Elle était donc stable au cours du temps et peu de variations ont été observées au cours de l'expérience. Le taux de recouvrement du filtre UV était supérieur à 90% tout au long de l'expérimentation.

## Oxyde de Zinc

a)



b)



**Figure 77:** (a) Répartition, en pourcentage, de ZnO à la surface de la peau (papier) ainsi que dans les différentes couches cellulaires de stratum corneum à partir de l'émulsion E/Si et (b) taux de pénétration de ZnO en fonction du temps à travers le stratum corneum

**Tableau 37:** Taux de recouvrement total de ZnO dans le stratum corneum après le prélèvement à l'aide des 30 strippings (émulsion E/Si)

| Pourcentage en filtre après 30 strippings |                |                |                |                |                |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|   | T <sub>0</sub> | t <sub>2</sub> | t <sub>4</sub> | t <sub>6</sub> | t <sub>8</sub> |
| <b>ZnO</b>                                | 94,5±%         | 83,6±%         | 106,8±%        | 79,1±%         | 97,5±%         |

La quantité de ZnO retrouvée à la surface de la peau variait de  $67,6 \pm 17,8\%$  au temps  $t_0$  à  $66,6 \pm 17,8\%$  au temps  $t_8$ . Elle était donc stable au cours du temps et

peu de variations ont été observées au cours de l'expérience. Le taux de recouvrement du filtre UV était supérieur à 80% tout au long de l'expérimentation.

#### V.3.3.2.4 Discussion des résultats de la pénétration cutanée des filtres UV inorganiques

Nous avons pu observer qu'une quantité importante de filtres inorganiques reste à la surface de la peau pendant toute la durée de l'expérimentation. En effet, les quantités de TiO<sub>2</sub> et de ZnO retrouvées sur le papier étaient supérieures à 55% pour les émulsions E/H et E/Si. De plus, les quantités dosées dans le groupe 5 (assises cellulaires 16 à 30) étaient négligeables (inférieures à 3% pour chaque filtre). Cependant, ces filtres inorganiques ont été retrouvés dans les groupes 1 à 4 à des concentrations comprises entre 1 et 10%. En effet, la peau possède un relief particulier qui présente des sillons et des ouvertures au niveau des follicules pileux. Les filtres UV inorganiques peuvent donc s'y retrouver (Bennat et Müller-Goymann, 2000) et ceux qui sont présents à ces endroits ne seront alors récoltés qu'à partir du 10<sup>ème</sup> disque adhésif appliqué sur la peau (Pflücker et col., 1999), c'est donc pour cette raison que les filtres inorganiques sont détectés tout au long de l'expérimentation. En effet, les strippings ont tendance à enlever plus facilement les particules qui se trouvent sur les arrêtes, que celles qui se trouvent dans les sillons profonds du stratum corneum. Ainsi, le numéro du disque adhésif ayant servi au prélèvement ne correspond pas forcément au même numéro en terme de couche cellulaire du stratum corneum. Les résultats obtenus pour les filtres inorganiques doivent être généralement interprétés avec précaution. Une étude a montré la présence de points blancs au niveau des orifices des follicules pileux des avant-bras après plusieurs prélèvements effectués avec des disques adhésifs (Weigmann et col., 1999). Cette accumulation peut être expliquée par le fait qu'*in vivo*, un déplacement continu et progressif des filtres UV est observé aux endroits où la peau est lisse (comme au niveau des avant-bras) et ferme comme chez les jeunes personnes (Diridollou et col., 2001), ce qui était le cas dans cette étude. Nous pouvons alors dire que les filtres inorganiques ne sont pas retrouvés dans les couches profondes du stratum corneum et qu'ils ne traversent pas la barrière cutanée.

Nous avons pu constater une différence entre les émulsions E/H et E/Si. En effet, le taux de récupération des filtres inorganiques était plus élevé à partir de l'émulsion E/Si que de l'émulsion E/H. Ceci peut être expliqué par le fait que l'émulsion E/Si a un caractère moins gras que l'émulsion E/H, ceci facilite les prélèvements à l'aide des disques adhésifs à partir de l'émulsion E/Si.

De façon générale, d'après plusieurs expérimentations *in vivo* conduites avec la même méthode des strippings, il a été constaté que les filtres inorganiques ne pénètrent pas la barrière cutanée et ne se retrouvent donc pas dans les parties vivantes de la peau que sont l'épiderme et le derme (Schulz et col., 2002 ; Mavon et col., 2007, Dussert et col., 1997). En général, après application du produit sur la peau, le Stratum Corneum est recouvert d'une couche cristalline, formée par les filtres inorganiques, qui entoure la surface irrégulière de la peau sans qu'il y ait une pénétration intracellulaire (Dussert et col., 1997). De plus, par rapport aux filtres organiques qui forment une couche homogène à la surface de la peau, il est moins aisé d'appliquer ce même type de couche pour les filtres inorganiques qui ont plus facilement tendance à former des agglomérats. Les mêmes observations ont été effectuées avec les dioxydes de titane enrobés de façon amphiphile, lipophile ou hydrophile (Pflücker et col., 2001).

L'étude *in vivo* a montré des résultats semblables à l'étude *in vitro* en terme de pénétration cutanée de filtres inorganique. Celle-ci n'a pas été montrée lors de l'étude *in vitro* et nous avons pu observer qu'ils restaient dans les couches superficielles du stratum corneum lors de l'étude *in vivo*. La corrélation entre les deux études est donc bonne, les filtres inorganiques ne subissent pas la diffusion passive et leur comportement est le même sur de la peau excisée et de la peau vivante.

#### **V.3.4 Conclusion**

Les deux études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la pénétration à travers le stratum corneum des cinq filtres organiques et des deux filtres inorganiques était négligeable ou totalement nulle. La corrélation des deux types d'études est donc

bonne. Cependant, les études *in vitro* ont tendance à surestimer les résultats qui pourraient être obtenus pendant les études *in vivo* (Benech-Kiefer et col., 2003). La combinaison des deux types d'études est donc importante car elles sont complémentaires. En effet, l'étude *in vitro* permet de donner une première estimation sur la capacité de pénétration cutanée des filtres solaires, tandis que les tests *in vivo* permettent de vérifier les résultats obtenus dans des conditions réelles. De plus, ils constituent une approche non invasive pour l'évaluation de la pénétration cutanée et permettent d'observer la capacité réservoir que possède l'épiderme et plus particulièrement le stratum corneum.

Que ce soit l'étude *in vitro* ou l'étude *in vivo*, nous avons pu observer une accumulation des filtres organiques et inorganiques dans les couches supérieures de l'épiderme. Il faut néanmoins considérer ces résultats avec précaution car les modes opératoires ne reflètent pas l'utilisation réelle des produits solaires par les consommateurs (Bissonnette, 2008). La majorité des filtres restent donc à la surface de la peau, ce qui est très important pour garantir la sécurité et l'efficacité des produits. En effet, les doses utilisées sont bien au-dessus de celles réellement appliquées.

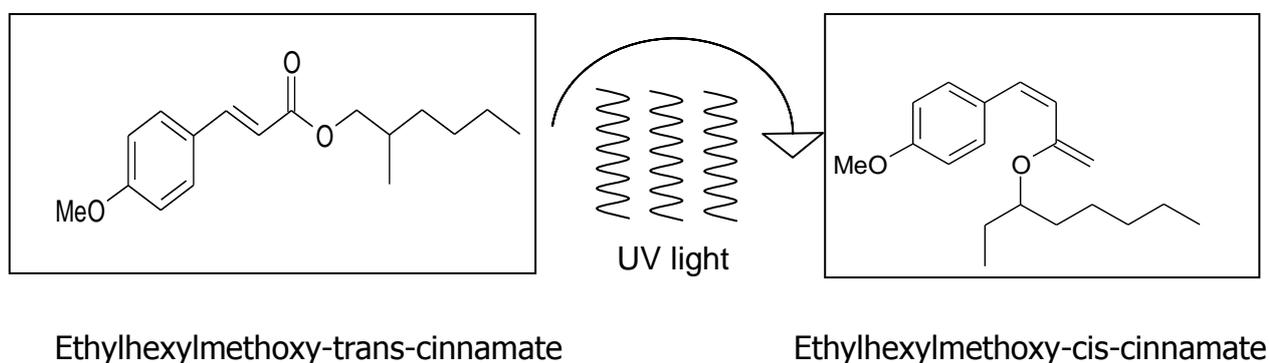
L'étude *in vivo* permet également de compléter l'étude *in vitro* en localisant les différentes molécules dans les différentes couches du stratum corneum.

Dans les deux cas, le taux de recouvrement de chaque filtre à la fin des expériences a été assez faible, ce qui peut être expliqué par différents paramètres : le rinçage, les liaisons avec les protéines de la peau, une faible métabolisation et la perte de produit lors de son application (Treffel et col., 1996).

## **V.4 Encapsulation de l’Ethylhexyl Methoxycinnamate (EMC)**

### **V.4.1 Introduction**

L’efficacité des produits solaires peut être améliorée en augmentant leur photostabilité. L’EMC est l’un des filtres solaires UVB le plus couramment utilisé dans les formulations de protection solaire. En effet, il possède une grande capacité d’absorption dans la région des courtes longueurs d’onde (290-320 nm), avec une longueur d’onde maximale de 310 nm (Vettor et col., 2008) qui est la valeur de référence lors de toutes les mesures de spectres réalisées sur l’EMC. Cependant, lorsque ce filtre est exposé à la lumière, il s’isomérisé et passe de sa configuration « trans » initiale à une configuration « cis » (Figure 78) (Pattanaargson et col., 2004, Huang et col., 2007).



**Figure 78:** Isomérisation de l’EMC sous l’action des rayons UV

Cette isomérisation est irréversible et provoque une diminution importante de l’efficacité du filtre à absorber les rayons UVB. En effet, la configuration « cis » est l’isomère le moins efficace dans l’absorption de l’énergie lumineuse (Pattanaargson et col., 2001 ; Tarras-Wahlberg et col., 1999), avec une diminution de l’absorption à 310 nm qui varie entre 25% et 30% en fonction de la dose de rayon UV lors de l’irradiation (Berset et col., 1996).

Une solution pour protéger l'EMC contre les dommages causés par les UV est de l'encapsuler dans une matrice lipidique afin de former des nano ou des micro particules. Le mélange de lipides solides et liquides (l'EMC est liquide à température ambiante) va créer des cristaux caractérisés par de nombreuses imperfections qui procurent plus d'espaces et permettent d'encapsuler plus de matière active. Les nanoparticules ainsi produites sont appelées « nanostructured lipid carriers » (NLC) (Pardeike et col., 2009 ; Müller et col., 2002). Lorsque les lipides choisis sont adéquats (bonne capacité d'encapsulation du produit, bonne tolérance cutanée, état solide à température ambiante), les NLC sont connues pour montrer une bonne tolérance lors des applications sur la peau.

Comparées aux nanoparticules polymériques, les NLC peuvent être produites sans utiliser de solvant et leur coût de fabrication est peu élevé (Xia et col., 2007). De plus, les températures de fusion des corps gras qui sont en général inférieures à 80°C permettent de travailler sur des durées assez courtes (par exemple, moins de 15 min pour des quantités inférieures à 200 ml), ce qui empêche les dégradations éventuelles des molécules actives à encapsuler. Les nanoparticules produites grâce à l'encapsulation dans une matrice solide vont diminuer la sensibilité à la lumière de l'EMC en le protégeant des radiations. De plus, de par leur taille de l'ordre du nanomètre, elles agissent en absorbant et en diffractant la lumière, de la même façon que les filtres inorganiques qui existent sous forme de nano ou de micro particules (Wissing et Müller, 2002). L'incorporation d'un filtre UV dans des NLC offre donc une synergie d'action entre les propriétés d'absorption des molécules de filtre UV et la capacité de réflexion de la lumière apportée par les nanoparticules elles-mêmes (Wissing et Müller, 2003 ; Yener et col., 2003). Cela peut ainsi permettre de diminuer leur propre concentration dans les formulations de produit solaire.

Le but de cette étude a donc été de diminuer la photo instabilité de l'EMC en l'encapsulant dans des micro et des nano particules. Trois types de lipides ont été investigués : le béhénate de glycérol, l'ozokérite et la cire de tégument de riz (Rice Bran wax=RBW). Les mélanges formés d'EMC et de lipides ont été évalués dans le but d'étudier leurs propriétés cristallines et de déterminer leur point de fusion. Les NLC ont été produites par la méthode de dispersion à chaud suivie de

l'homogénéisation haute pression (HHP). Les nanoparticules ont été caractérisées par leur taille et leur distribution de taille, leur cristallinité, leur capacité d'encapsulation de l'EMC et leur capacité à bloquer les rayons UV. A cause de leur très petite taille, la capacité de pénétration cutanée de l'EMC contenu dans chaque suspension de nanoparticules a été également évaluée.

## **V.4.2 Matériel et méthodes**

### V.4.2.1 Matériel

Les lipides et tensioactif utilisés ont été décrits précédemment (Cf. Partie IV.1.4).

### V.4.2.2 Méthodes

#### *V.4.2.2.1 Composition et évaluation préliminaires des mélanges lipidiques*

Les mélanges lipidiques ont été analysés au préalable en utilisant le calorimètre différentiel à balayage (Differential Scanning Calorimeter=DSC) et la hot stage microscopy (HSM) afin d'évaluer leurs propriétés cristallines et de déterminer leurs caractéristiques de fusion avant la formulation des nanosuspensions.

Ces deux techniques ainsi que les paramètres de mesure sont détaillés dans la partie matériel et méthodes (Cf. Partie IV.2.4).

#### *V.4.2.2.2 Préparation des nanosuspensions*

### **Composition des nanosuspensions**

Comme cela a été dit précédemment, trois lipides différents ont été investigués : un lipide semi-synthétique, le béhénate de glycérol ; une cire d'origine minérale (ozokérite) et une cire d'origine végétale (RBW) (Tableau 38). Ces lipides sont différents en terme de valeurs HLB (balance hydrophile/lipophile) : 2 pour le béhénate de glycérol (le plus lipophile), 9 pour l'ozokérite et 10 pour RBW (le moins lipophile). Cependant, chaque lipide présente un haut point de fusion (entre 65°C et

82°C) pour permettre l'encapsulation de grandes quantités en EMC. Ces hautes températures permettent aussi de conserver les nanoparticules à l'état solide lorsque l'on se retrouve à la température de la peau (32°C). De plus, ces lipides sont bien tolérés par la peau et sont utilisés dans de nombreuses formulations cosmétiques et dermatologiques.

Les tensioactifs ont été sélectionnés en fonction de leur valeur HLB et en référence à différentes publications (Müller et col., 2002 ; Xia et col., 2007 ; Wissing et Müller, 2002 ; Wissing et Müller, 2003 ; Yener et col., 2003 ; Mehnert et col., 2001 ; Müller et col., 2000 ; Jennings et col., 2000). Ensuite, nous avons procédé à un screening de différentes concentrations dans le but d'obtenir les nanosuspensions les plus stables possible. Pour chaque formulation, les suspensions de nanoparticules contenaient 70% d'EMC (m/m, par rapport à la masse lipidique totale). Cette concentration représentait la quantité maximale en EMC qui pouvait être incorporée dans la matrice lipidique. En effet, au-delà de cette concentration, les températures de fusion des mélanges lipidiques (déterminées par DSC et HSM) étaient trop basses pour permettre de les conserver à l'état solide à température cutanée.

**Tableau 38:** Composition des nanosuspensions et caractéristiques des lipides utilisés

| Formulations | Lipides  | HLB       | Plage de températures de fusion (°C) | EMC        | Tensioactifs                              |
|--------------|--|-----------|--------------------------------------|------------|---|
| <b>NLC 1</b> | Béhénate de glycérol<br><b>6%</b>                          | <b>2</b>  | 69-74                                | <b>14%</b> | Poloxamer 188<br><b>1,0%</b>              |
| <b>NLC 2</b> | Ozokérite<br><b>6%</b>                                     | <b>9</b>  | 63-68                                | <b>14%</b> | Span60 + Tween60<br><b>1,35%+0,65%</b>    |
| <b>NLC 3</b> | Cire de tégment de riz<br>(Rice Bran Wax RBW)<br><b>6%</b> | <b>10</b> | 77-82                                | <b>14%</b> | Sodium<br>cocoamphoacetate<br><b>2,5%</b> |

Dans un premier temps, des microparticules ont été préparées par la technique de dispersion à chaud en utilisant un homogénéisateur haute vitesse (Cf. Partie IV.2.4.3). Les deux phases, lipidique et aqueuse, ont été mélangées à une

température supérieure de 10°C à la température de fusion des lipides, dans le but d'avoir toute la matrice lipidique à l'état liquide et pour être à la bonne température d'émulsification (75°C pour l'ozokérite, 85°C pour le béhénate de glycérol et 90°C pour RBW). La phase lipidique contenant l'EMC a été ensuite dispersée dans la phase aqueuse chaude contenant le tensioactif, à une vitesse de 20.500 rpm pendant 1 min.

La taille des particules a ensuite été réduite en utilisant l'homogénéisation haute pression (HHP) dans le but d'obtenir des nanoparticules (EmulsiFlex-C5<sup>®</sup>; Avestin Inc., Ottawa, Canada). Cette technique, ainsi que les paramètres de formulation sont décrits dans la partie matériel et méthodes (Cf. Partie IV.2.4.4). Lorsque les trois cycles d'homogénéisation sont terminés, les échantillons sont rapidement refroidis en-dessous de la température ambiante à l'aide de glace pour permettre de former rapidement les particules solides.

#### V.4.2.2.3 Caractérisation et évaluation des NLC

##### **Taille des particules et distribution de taille des particules**

La taille et la distribution de taille des NLC dans la suspension ont été déterminées en utilisant la diffraction laser : le diffractomètre laser Mastersizer 2000<sup>®</sup> (Cf. Partie IV.2.2.2). Les mesures ont été effectuées avant et après passage de la suspension à l'homogénéisateur afin de vérifier la réduction de taille des particules.

##### **Mesure du potentiel zêta**

La stabilité des nanosuspensions a été également évaluée en mesurant le potentiel zêta (Cf. Partie IV.2.4.5). Ces mesures ont été réalisées sur les suspensions conservées pendant 2 mois à différentes températures : température ambiante, 30°C, 40°C et 50°C. Le stockage des suspensions à ces températures permet de soumettre les échantillons à un vieillissement accéléré.

##### **Capacité d'encapsulation de l'EMC par la matrice lipidique**

Le pourcentage d'EMC incorporé dans les nanoparticules a été évalué de la façon suivante: une quantité précise (3,0 g) de nanosuspension a été ultra centrifugée

pendant 1h à 4°C à 45.000 rpm (191.000xg) (LE-80 ultracentrifuge, Beckman Coulter Inc., CA, USA). Le surnageant a ensuite été enlevé et pesé. Si après la centrifugation, le surnageant était clair, l'EMC libre était directement quantifié. Si le surnageant n'était toujours pas clair après la centrifugation, il a été mis en contact avec le méthanol pendant 30 sec dans le but de solubiliser l'EMC mais pas la matrice lipidique. Des filtrations successives sont ensuite effectuées avec des filtres ayant des pores de diamètre différent (de 5,0 µm à 0,1 µm) afin d'éliminer les nanoparticules qui restent dans le surnageant.

Ensuite, la quantification de l'EMC libre (non encapsulé) et de l'EMC total (extrait des nanosuspensions après 30 min de passage aux ultrasons) a été effectuée comme cela a été décrit dans la partie Matériel et méthodes (Cf. Partie IV.2.3.2).

### **Evaluation de la capacité des NLC à protéger l'EMC contre les radiations UV**

Ceci a été déterminé à l'aide du simulateur de lumière (Suntest CPS+, Atlas, Lisengericht, Allemagne) et du spectrophotomètre UV-Visible HP 8453 (Agilent, Allemagne). Les conditions d'exposition ont été décrites précédemment (Cf. Partie IV.2.4.5). Différents échantillons ont été irradiés : (1) l'EMC pur, qui est ensuite solubilisé dans l'éthanol pour effectuer les mesures spectrophotométriques ; (2) les suspensions NLC 1, NLC 2 et NLC 3 qui sont ensuite diluées dans l'eau pour les mesures spectrophotométriques.

### **Evaluation de la capacité de pénétration cutanée de l'EMC**

Les différents types d'échantillons testés étaient les suivants : EMC non encapsulé, NLC 1, NLC 2 et NLC 3. L'EMC non encapsulé correspond à l'EMC pur solubilisé dans de l'éthanol puis dilué dans l'eau sous forme d'une dispersion colloïdale afin d'obtenir la même concentration en EMC que dans les nanosuspensions. La capacité de pénétration cutanée de l'EMC, à partir des nanosuspensions, puis à partir des nanoparticules incorporées dans les émulsions préparées précédemment (E/H : 06E2902 et E/Si : 06E3101), a été estimée à l'aide des cellules de diffusion de Franz (Cf. Partie IV.2.3.1). Les mêmes conditions que précédemment (Cf. Partie V.2.2.2) ont été utilisées. Dans un premier temps, une membrane de silicone a été utilisée

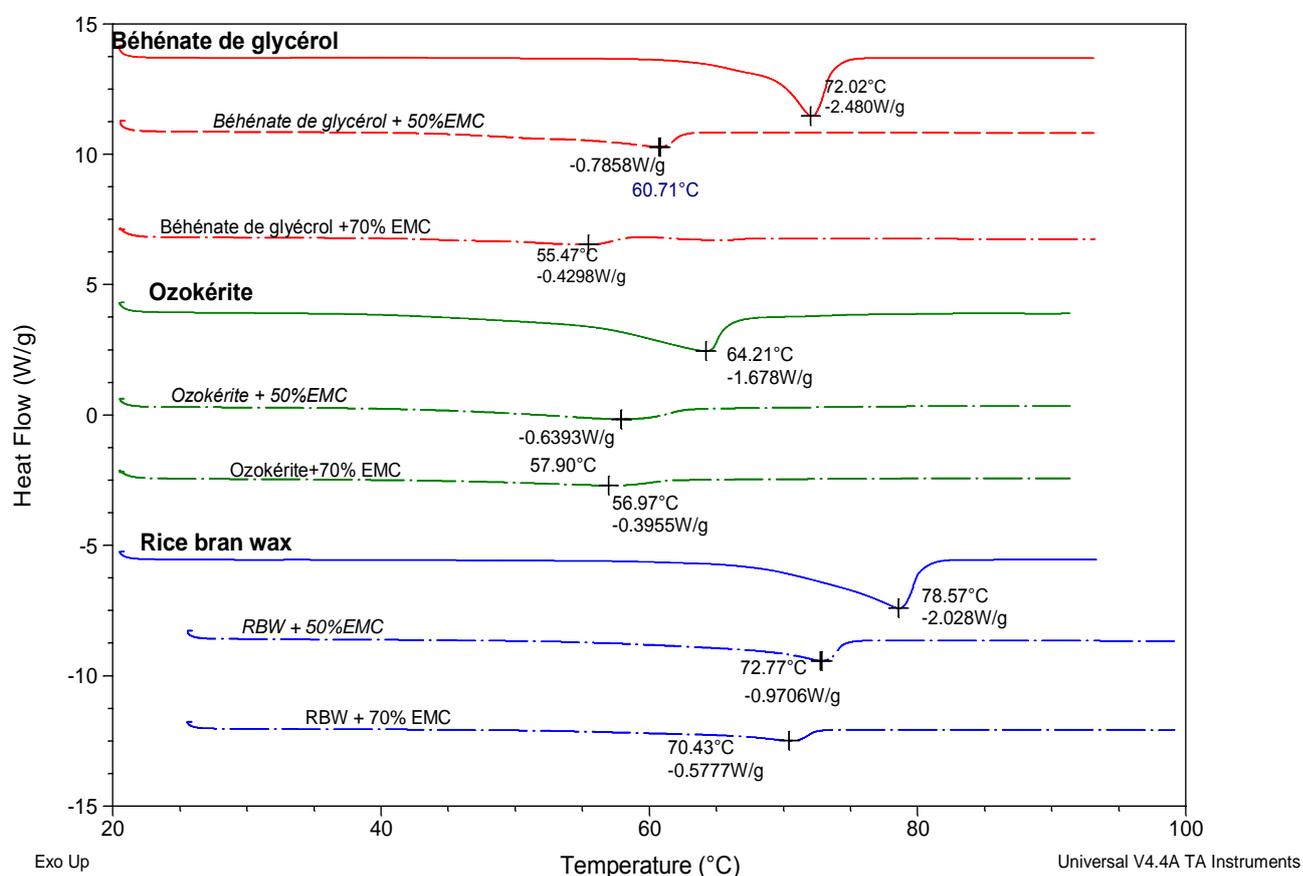
pour évaluer la capacité de diffusion puis, dans un deuxième temps, la peau humaine excisée a été employée.

### V.4.3 Résultats et discussion

#### V.4.3.1 Composition et évaluations préliminaires des mélanges lipidiques

##### DSC et HSM

La figure 79 montre les courbes DSC obtenues pour chaque lipide avec ou sans EMC.



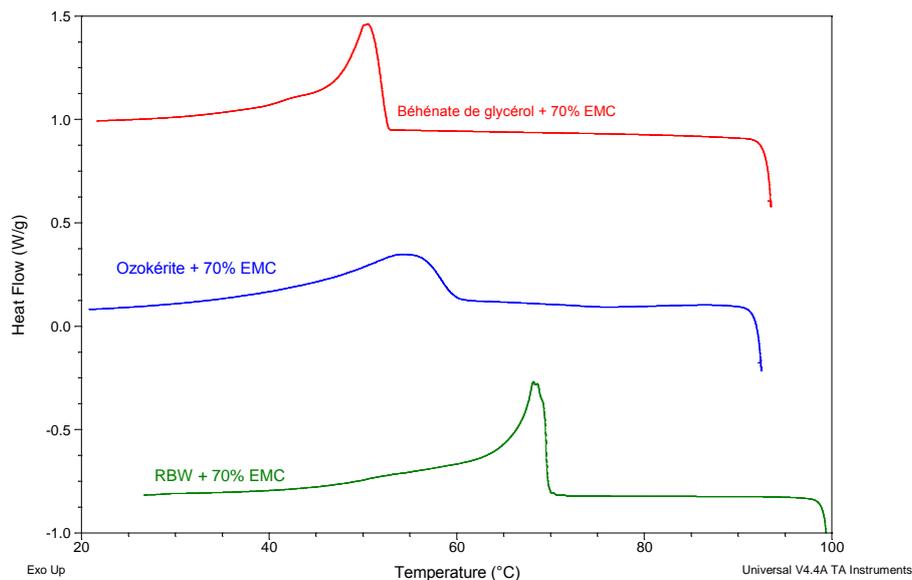
**Figure 79:** Courbes DSC obtenues à partir des lipides purs (courbes en continue) et à partir des mélanges lipides-EMC (courbes en pointillée) contenant 50% et 70% d'EMC

Un déplacement du point de fusion des mélanges lipidiques vers des plus basses températures par rapport aux corps gras purs a été observé pour chaque mélange : de 72°C à 55°C pour le glycéryl béhénate ; de 64°C à 57°C pour l'ozokérite et de

78°C à 70°C pour le RBW. Cette diminution était due à la présence d'EMC qui est liquide à température ambiante et qui possède donc une température de fusion plus basse que les corps gras solides. Ainsi, lorsqu'il était mélangé avec les différents lipides solides, il a provoqué une diminution du point de fusion, celle-ci augmentant avec la quantité d'EMC incorporée. Aucun pic additionnel n'est apparu sur les thermogrammes de chaque mélange lipidique, l'EMC était donc totalement miscible avec chaque corps gras après fusion de ceux-ci. Chaque mélange composé du corps gras solide et de l'EMC présentait donc un point de fusion plus bas que le lipide pur à l'état solide comme cela a déjà pu être observé dans d'autres études réalisées sur des mélanges binaires lipidiques (Jenning et col., 2000 A ; Xia et col., 2007 ). La diminution du point de fusion était équivalente pour l'ozokérite (-7°C) et pour RBW (-8°C), par contre elle était plus prononcée pour le béhénate de glycérol (-17°C). Ceci était certainement dû aux interactions qui sont différentes entre l'EMC et les différents lipides et qui provoquaient ainsi des variations de températures de fusion entre chaque lipide. Malgré cette diminution de température de fusion, celle-ci restait supérieure à 55°C et donc était bien adaptée pour le déroulement de la fabrication. Celle-ci permettait en effet de bien encapsuler l'EMC et de diminuer le risque de diffusion immédiate du filtre dans le milieu de dispersion. En outre, il est préférable d'avoir un mélange lipidique avec un point de fusion plus élevé que la température ambiante pour éviter les risques d'avoir une fusion des particules et ainsi améliorer la stabilité des nanosuspensions. Cette température permet également de garder le lipide à l'état solide à 32°C, qui est la température de la peau dans les conditions physiologiques normales.

Une diminution de l'enthalpie de fusion a été observée en même temps que la quantité en EMC augmentait. En effet, nous avons pu observer pour le béhénate de glycérol une variation allant de 120,8 J/g à 31,5 J/g pour des concentrations croissantes de 0% à 70% en EMC. Les mêmes observations ont été réalisées pour l'ozokérite et le RBW. Le profil des courbes a ainsi été modifié par l'ajout d'EMC avec une diminution de la hauteur des pics de fusion. Comme les mélanges sont composés d'un corps gras solide et d'un filtre organique liquide de nature lipophile, le mélange devient moins dur et l'énergie nécessaire pour la fusion est plus faible. Aucun polymorphisme n'a été observé, en effet, aucun pic supplémentaire sur les

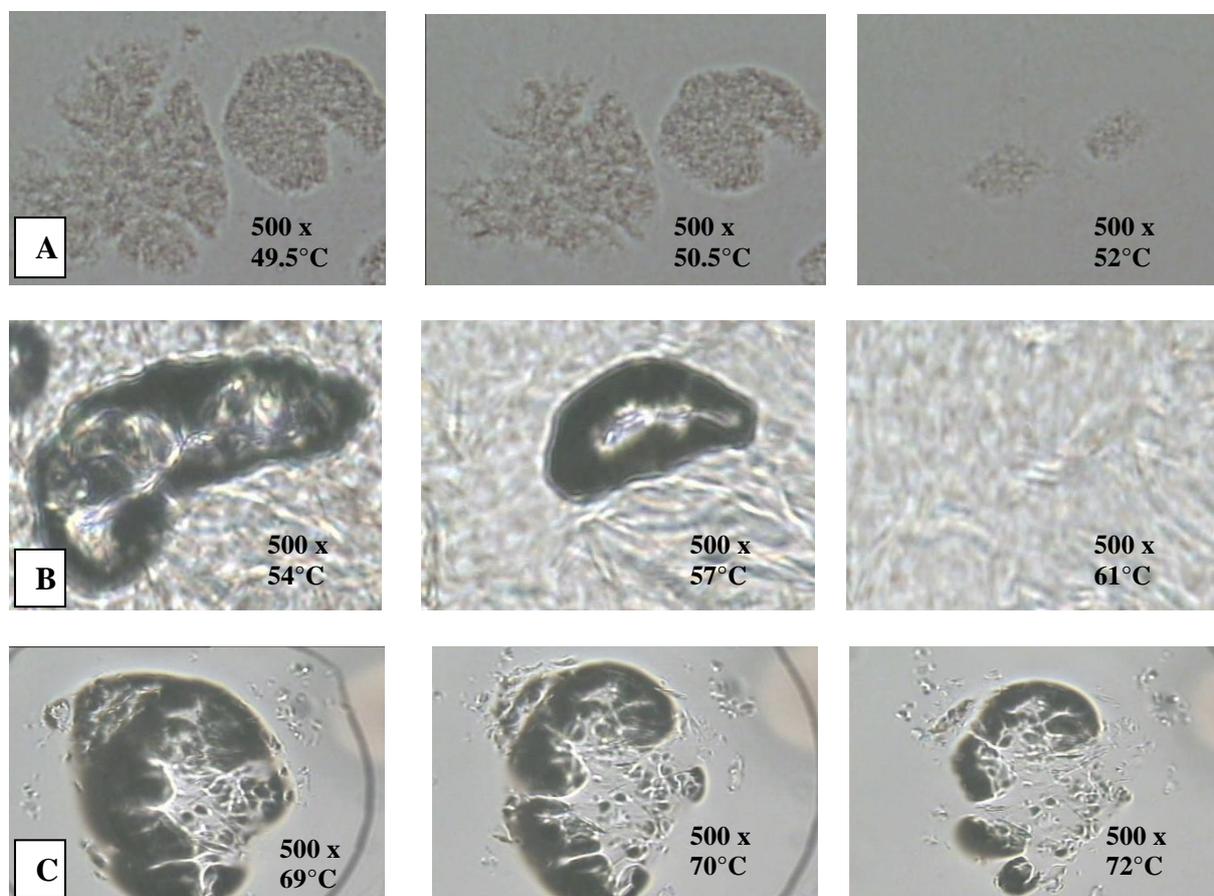
courbes DSC n'a été observé après avoir réalisé des balayages de températures sur les mélanges lipidiques. Il a donc été conclu que les mélanges lipidiques étaient homogènes lorsque 70% d'EMC était incorporé dans la matrice lipidique. Cette proportion d'EMC par rapport à la masse lipidique a donc été utilisée pour la suite de l'étude car elle représente la quantité maximale que l'on peut incorporer dans les corps gras, et donc dans les suspensions de nanoparticules.



**Figure 80:** Courbes DSC lors du refroidissement des mélanges lipidiques de: Béhénate de glycérol+70%EMC, Ozokérite+70%EMC et RBW+70%EMC

La cristallisation observée pendant l'étape de refroidissement (Figure 80) de la DSC était caractérisée par un pic exothermique et a également été observée par la HSM. Dans le but d'effectuer des comparaisons entre chaque formulation développée, l'index de cristallinité a été calculé pour chaque mélange. Cet index est défini comme le pourcentage de la matrice lipidique qui a recristallisé pendant le stockage. Il a été déterminé en utilisant le rapport entre l'enthalpie de fusion (J/g) du lipide pur et celui du mélange lipidique présent dans la suspension (Wissing et Col., 2001). Ils étaient de 99,0% pour le béhénate de glycérol, 91,8% pour le RBW et 86,3% pour l'ozokérite.

Après la DSC, la suite de la caractérisation préliminaire sur les mélanges lipidiques a été réalisée avec l'HSM.



**Figure 81:** Observation HSM pour les différents mélanges de lipides: A-Béhénate de glycérol 30% + EMC 70%; B-Ozokérite 30% + EMC 70% et C- RBW 30% + EMC 70%

La figure 81 illustre les observations réalisées avec l'HSM lors de la fusion de chaque mélange lipidique. Les températures de fusion des mélanges lipidiques étaient en accord avec les températures observées lors des expériences réalisées avec la DSC et qui permettaient d'observer les pics de fusion sur les thermogrammes (Tableau 39).

**Tableau 39** : Limites de température de fusion observées en HSM pour chaque corps gras pur et pour chaque mélange lipidique contenant 70% d'EMC

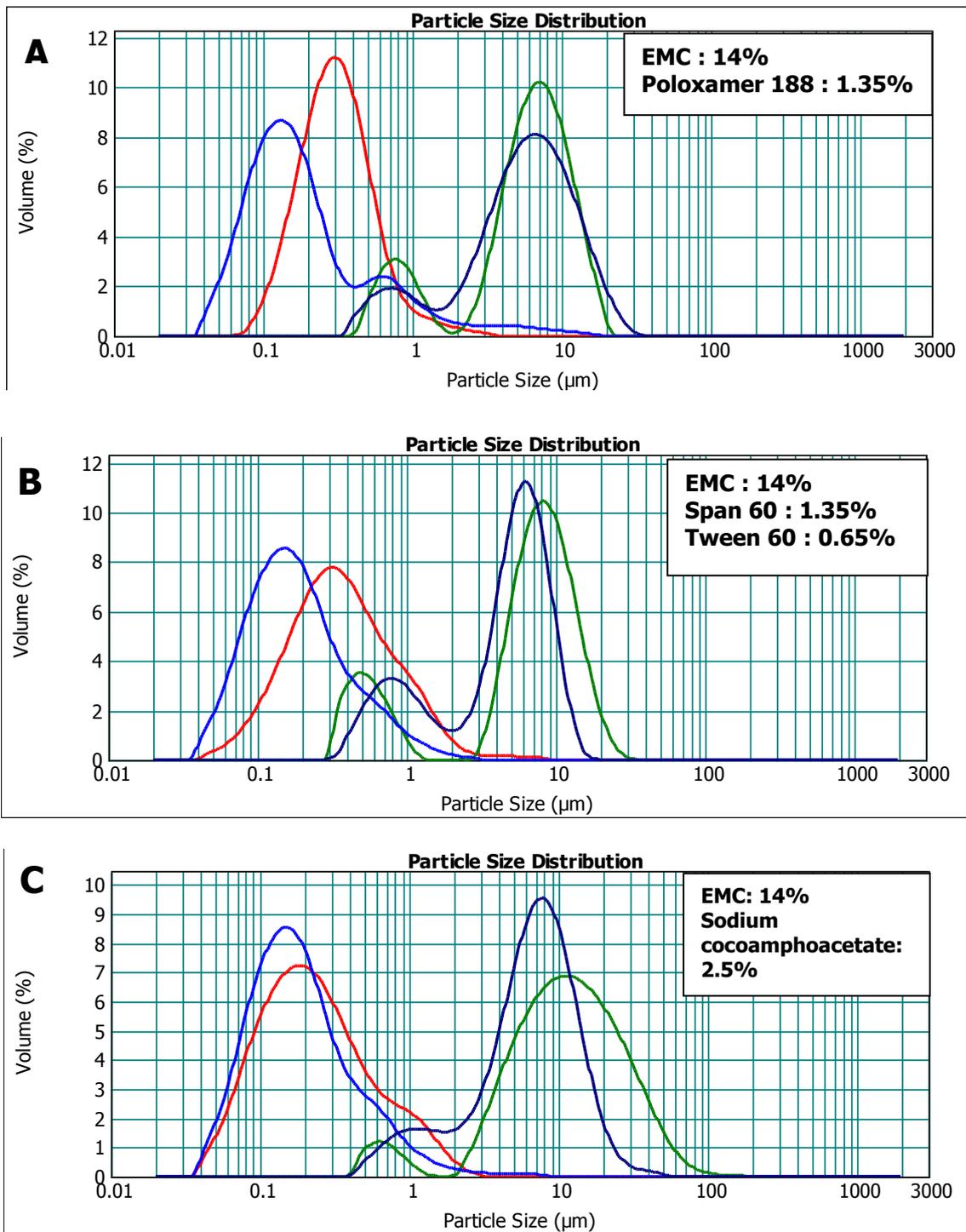
| Lipide pur           | Plage de températures de fusion (°C) | Mélange lipidique              | Plage de températures de fusion (°C) |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| Béhénate de glycérol | 67,5 – 72,0                          | Béhénate de glycérol + 70% EMC | 49,5 – 57                            |
| Ozokérite            | 59,5 – 65,9                          | Ozokérite + 70% EMC            | 54,0 – 60,0                          |
| RBW                  | 74,5 – 79,5                          | RBW + 70% EMC                  | 69,0 – 73,0                          |

#### V.4.3.2 Caractérisation et évaluation des NLC

##### V.4.3.2.1 Taille et distribution de taille des particules

Les mêmes formulations de nanoparticules mais sans EMC ont également été préparées afin d'observer les effets possibles du filtre solaire sur la taille des particules et sur la stabilité des nanosuspensions.

La distribution de taille des particules était bimodale pour chaque suspension avant le passage à l'HPH alors qu'elle était unimodale après réduction des tailles par homogénéisation à l'HPH (Figure 82). La dispersion à haute vitesse en utilisant l'Ultra-Turrax ne permettait pas de diminuer la taille des particules dans la gamme du nanomètre. La distribution de taille des microparticules montrait ainsi une importante proportion de microparticules et une petite proportion de nanoparticules.



**Figure 82:** Distribution des tailles des particules des suspensions de microparticules contenant 14% d'EMC (—), de microparticules sans EMC (—), de nanoparticules contenant 14% d'EMC (—), et de nanoparticules sans EMC (—) pour les formulations à base de béhénate de gly cerol (A), Ozokérite (B) et Rice Bran Wax (C)

Les trois formulations présentaient des caractéristiques similaires concernant les courbes de distribution de taille ainsi que les volumes médians. Des études précédentes réalisées sur des formulations de nanoparticules à base de mélanges binaires de lipides liquides (Mygliol 812 = triglycéride à chaîne moyenne) et solides (béhénate de glycérol) ont montré des résultats de tailles de même ordre de grandeur ( $D(0,5) = 350$  nm) (Jenning et col., 2000). Ces résultats sont aussi en accord avec des travaux précédents concernant l'encapsulation de l'EMC par des lipides ou des polymères. En effet, les  $D(0,5)$  étaient compris entre 200 et 250 nm pour des nanoparticules formulées avec du béhénate de glycérol ou de la cire de carnauba (Xia et col., 2007). Lorsque l'EMC était encapsulé par des polymères, les tailles nanoparticulaires étaient de l'ordre de 374 nm avec du poly-caprolactone et de 301 nm avec du poly (DL-lactide) (Jimenez et col., 2004 ; Vettor et col., 2008). Comme les lipides étaient entièrement fondus pendant tout le procédé de fabrication, cela a permis de diminuer la taille des particules. L'agrégation des lipides apparaissant après l'étape de réduction de taille, ou pendant le stockage, semblait dépendre uniquement de la nature chimique des surfactants ainsi que de l'association des lipides avec ces tensioactifs.

Après homogénéisation à l'HPH, les nanoparticules obtenues étaient caractérisées par un volume médian ( $D(0,5)$ ) de  $309 \pm 4$  nm,  $348 \pm 13$  nm et  $219 \pm 11$  nm lorsque l'EMC était encapsulé respectivement par le béhénate de glycérol, l'ozokérite et le RBW (Tableau 40).

Nous avons pu constater que l'incorporation de l'EMC dans la matrice lipidique avait pour conséquence une augmentation de la taille des nanoparticules. En effet, par exemple pour les formulations réalisées avec l'ozokérite, la taille des nanoparticules était de  $171 \pm 4$  nm sans EMC et de  $348 \pm 13$  nm pour les nanoparticules formulées avec 70% d'EMC. Il en était de même pour les formulations réalisées avec le béhénate de glycérol et RBW. L'EMC se mélange à chaque corps gras de façon homogène. Cependant, chaque tensioactif ne permet pas de garder la taille initiale des particules lorsque le filtre est rajouté à la matrice lipidique.

**Tableau 40** : Taille des particules obtenues pour les trois lipides dans les différentes conditions de formulations : nano- et microparticules avec EMC (NLC+70% EMC et MLC (Micro Lipid Carrier) + 70% EMC) ; nano- et microparticules sans EMC (NLC et MLC)

|             | Béhénate de glycérol |  | Ozokérite   |  | RBW          |  |
|-------------|----------------------|--|-------------|--|--------------|--|
|             | D(0,5) (µm)          | Diamètres englobant 95% des particules | D(0,5) (µm) | Diamètres englobant 95% des particules | D(0,5) (µm)  | Diamètres englobant 95% des particules |
| NLC+14% EMC | 0,309±0,004          | 100-900 nm                             | 0,348±0,013 | 100-900 nm                             | 0,219±0,011  | 50-900 nm                              |
| MLC+14% EMC | 6,269±0,045          | Distribution bimodale                  | 7,020±0,129 | Distribution bimodale                  | 16,757±5,229 | Distribution bimodale                  |
| NLC         | 0,166±0,006          | 100-900 nm                             | 0,171±0,004 | 40-600 nm                              | 0,171±0,005  | 50-700 nm                              |
| MLC         | 3,502±0,342          | Distribution bimodale                  | 4,945±0,092 | Distribution bimodale                  | 11,008±2,044 | Distribution bimodale                  |

Une bonne reproductibilité lors de la fabrication a été observée pour chaque nanosuspension ; les variations de taille intra-jours et inter-jours après avoir formulé les nanosuspensions étaient minimales (Tableau 41). En effet, les différences de tailles observées n'étaient pas significatives pour aucune des formulations (Wilcoxon signed rank ;  $p > 0,05$ ).

**Tableau 41** : Variations des tailles de particules : intra-jour (1) et inter-jours (2) des formulations NLC 1, NLC 2 et NLC 3 contenant l'EMC. Les tailles sont exprimées en nm (D(0,5))

| (1)     | NLC 1 | NLC 2 | NLC 3 | (2)    | NLC 1 | NLC 2 | NLC 3 |
|---------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| Essai 1 | 314   | 368   | 217   | Jour 1 | 314   | 368   | 217   |
| Essai 2 | 310   | 348   | 223   | Jour 2 | 329   | 374   | 230   |
| Essai 3 | 314   | 343   | 218   | Jour 3 | 309   | 352   | 219   |
| Essai 4 | 312   | 352   | 233   | Jour 4 | 320   | 380   | 227   |

Aucune augmentation de taille n'a été observée pour chacune des formulations (Tableau 42) au bout de trois mois de conservation à 25°C, ainsi qu'au bout d'un mois à 30°C et 40°C (Tukey-Kramer ;  $p > 0,05$ ).

**Tableau 42** : Taille des particules (en nm) après conservation pendant 3 mois à température ambiante, et 1 mois à 30°C et 40°C, de NLC 1, NLC 2 et NLC 3 contenant l'EMC

|                         | NLC 1<br>(Béhénate de glycérol) | NLC 2<br>(Ozokérite) | NLC 3<br>(RBW) |
|-------------------------|---------------------------------|----------------------|----------------|
| T0                      | 309±4                           | 348±13               | 219±11         |
| 3 mois : 25°C           | 306±2                           | 337±5                | 211±9          |
| 1 mois : 30°C           | 307±4                           | 340±7                | 213±6          |
| 1 mois : 40°C           | 305±3                           | 335±10               | 210±6          |
| $p$ (test Tukey-Kramer) | >0,05                           | >0,05                | >0,05          |

Les suspensions de microparticules ont montré une stabilité plus faible avec apparition de « caking » pour chaque formulation. Ceci pouvait être expliqué par la taille des particules et la largeur de la distribution de taille. Lorsque la taille des particules est plus petite, la stabilité physique des suspensions est meilleure. Nous avons observé que les limites de tailles englobant 95% des nanoparticules pour chaque formulation étaient comprises entre 0,1 µm et 0,9 µm. Cette distribution de taille étroite était optimale pour prévenir une augmentation de taille des particules causée par le murissement d'Ostwald, qui peut être conséquent lorsqu'une proportion non négligeable de particule se trouve au-dessus de 10 µm (Vettor et col. 2008). De plus, les nanosuspensions présentaient une distribution de taille unimodale tandis qu'elle était bimodale pour les microsuspensions. Ainsi, dans les microsuspensions, les petites particules étaient attirées par les plus grosses, ce qui contribuait à l'aggrégation de celles-ci, résultant en une instabilité du système.

#### V.4.3.2.2 Détermination du potentiel zêta

Tous les résultats des mesures de potentiel zêta étaient compris entre -30 mV et -50 mV (Tableau 43). Les résultats négatifs du zêta potentiel étaient en accord avec les types de tensioactif utilisés pour la préparation des suspensions de nanoparticules qui sont comparables à des émulsions H/E dont le potentiel zêta est négatif. Ces mesures étaient complémentaires des mesures de tailles des particules et elles ont démontré la stabilité de chaque système.

**Tableau 43** : Résultats de mesure du potentiel zêta des NLC conservées 1 mois à température ambiante, 30°C, 40°C et 50°C (n=5)

|                                       | Température ambiante | 30°C           | 40°C           | 50°C           |
|---------------------------------------|----------------------|----------------|----------------|----------------|
| NLC 1 (Glyceryl behenate)<br>(pH=5,7) | -44,2 ± 2,5 mV       | -44,5 ± 1,8 mV | -49,6 ± 1,8 mV | -38,2 ± 2,3 mV |
| NLC 2 (Ozokerite)<br>(pH=6,4)         | -44,8 ± 1,1 mV       | -46,4 ± 0,5 mV | -44,1 ± 0,4 mV | -44,8 ± 1,1 mV |
| NLC 3 (RBW)<br>(pH=7,1)               | -49,7 ± 1,0 mV       | -47,7 ± 1,0 mV | -50,0 ± 1,4 mV | -49,7 ± 1,0 mV |

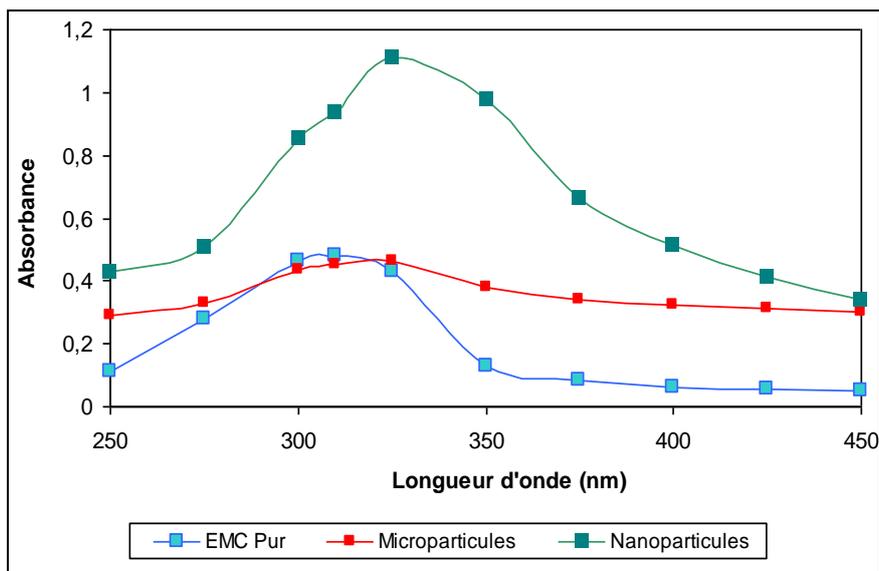
#### V.4.3.2.3 Capacité d'encapsulation de l'EMC

Le taux d'encapsulation était de 92±6%, 87±4%, et 93±4% pour les NLC1, NLC2 et NLC3 respectivement. Cette haute capacité d'encapsulation était due aux hauts points de fusion des lipides utilisés et à leur haute affinité pour l'EMC. En effet, le filtre a un caractère lipophile élevé ( $\log K_{O/W}=5,8$ ) et un faible poids moléculaire (290 g/mol). Ces considérations, ainsi que les résultats de DSC indiquent que l'EMC est bien miscible dans chaque matrice lipidique lorsque la phase lipidique est fondue pendant le procédé de fabrication. Cette importante capacité d'encapsulation est en

accord avec des études précédentes réalisées sur les encapsulations lipidiques et polymériques de l'EMC (Jimenez et col., 2004 ; Vettor et col. 2008).

#### *V.4.3.2.4 Evaluation de la capacité des NLC à protéger contre les radiations UV*

Dans un premier temps, afin de vérifier l'impact de l'encapsulation sur le spectre d'absorption de l'EMC, 3 types d'échantillon, non irradiés, ont été analysés par spectrophotométrie : l'EMC pur, les suspensions de MLC et les suspensions de NLC. La concentration en EMC pour réaliser ces mesures étaient de 0,2 mg/ml. Elle a été obtenue en solubilisant l'EMC pur dans l'éthanol et en diluant les suspensions dans l'eau. L'EMC a montré un important déplacement de son spectre d'absorption dans l'UV vers des valeurs plus hautes lorsqu'il est encapsulé sous forme de nanoparticules, par rapport aux microparticules et à l'EMC pur solubilisé dans l'éthanol (Figure 83). Les nanosuspensions contenant l'EMC encapsulé dans des matrices lipidiques ne sont pas des solutions limpides. Les résultats de la mesure de l'absorbance pour ces suspensions ne reflètent donc pas uniquement les résultats d'absorbance dus à la seule présence du filtre solaire, mais ils tiennent également compte des phénomènes d'interaction entre les particules et la lumière que sont la diffraction, la réflexion et la réfraction. Ainsi, les nanoparticules présentaient une importante capacité à diffracter les rayons UV grâce à leur taille appropriée qui se situe entre 200 nm et 400 nm. Ces tailles permettent de réfléchir et de diffracter les rayons UV de façon plus efficace que les microparticules (Villalobos-Hernandez et col., 2006 ; Wissing et col., 2001).

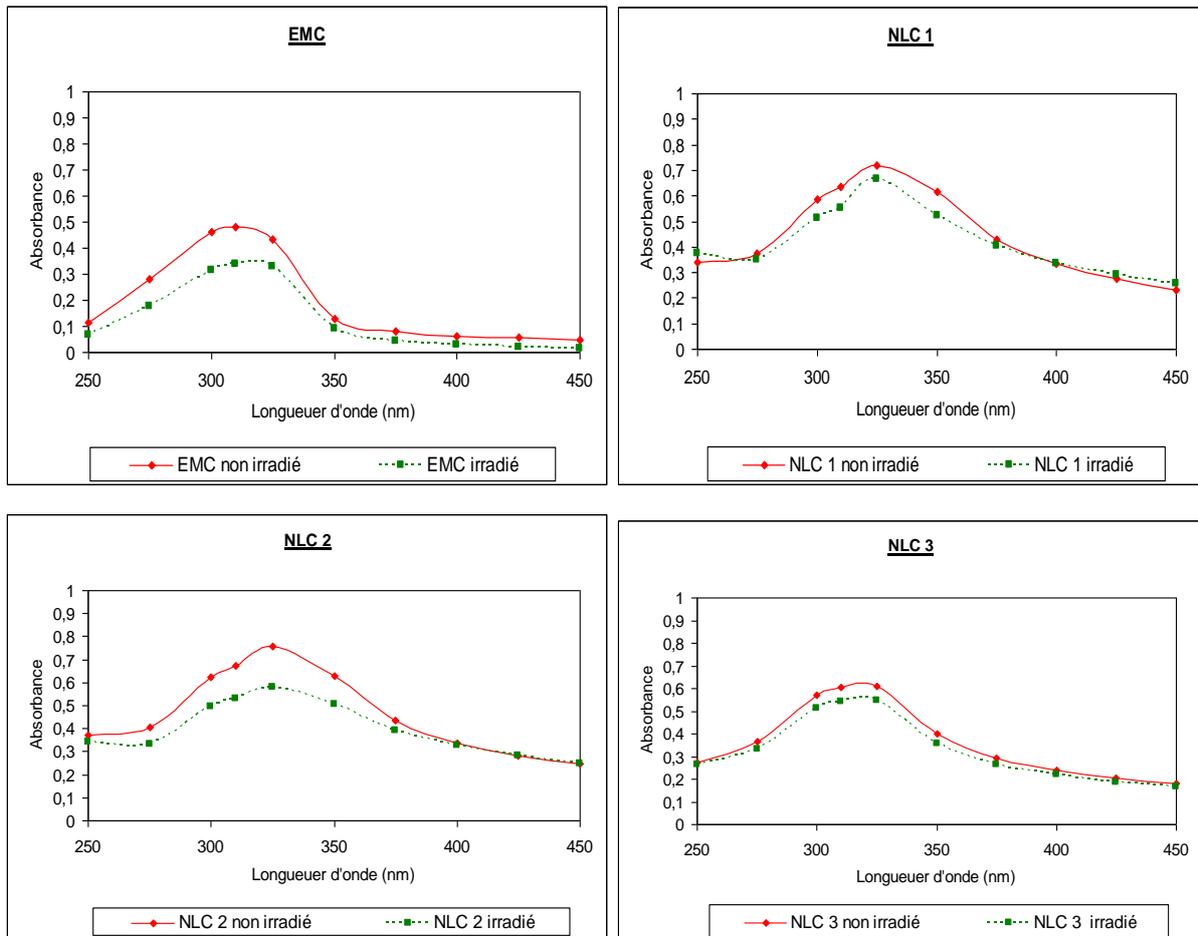


**Figure 83:** Spectre UV de l'EMC pur (solubilisé dans l'éthanol), des suspensions de microparticules et de nanoparticules formulées avec le béhénate de glycérol et diluées dans l'eau (concentration en EMC pour chaque spectre: 0,2 mg/ml)

Dans un deuxième temps, les spectres d'absorption de l'EMC pur et des NLC ont été mesurés avant et après irradiation afin de comparer les pertes d'efficacité de l'EMC sous ces différentes formes (Figure 84). La concentration en EMC pur était toujours de 0,2 mg/ml, alors qu'elle était de 0,028 mg/ml pour les nanosuspensions, afin d'avoir une absorbance inférieure à 1. Avant l'irradiation, pour chaque nanosuspension, les valeurs d'absorbance à 310 nm étaient de 0,67, 0,63 et 0,60 pour les suspensions NLC 2, NLC 1 et NLC 3 respectivement. La protection UV était efficace si l'on considère les résultats obtenus pour les mélanges évalués. En effet, l'EMC non encapsulé montrait une perte de 30% de son efficacité après 2h d'irradiation tandis que les trois nanosuspensions montraient une perte d'absorbance inférieure à 22% (Tableau 44).

Les protections les plus efficaces ont été obtenues avec NLC 3 qui était produite avec RBW (10% de perte d'efficacité) et NLC 1 qui était réalisée avec le béhénate de glycérol (13% de perte d'efficacité). Par contre, nous observons 22% de perte d'efficacité avec l'ozokérite. Cette variation était due à la différence de cristallinité des mélanges lipidiques composés d'EMC et des différents lipides solides. Le béhénate de glycérol (NLC 1) et le RBW (NLC 3) présentent un index de cristallinité

(99,0% et 91,8% pour NLC1 et NLC 3 respectivement) supérieur à celui de la formulation réalisée avec l'ozokérite (NLC 2 - index de cristallinité = 86,3%). La capacité de bloquer les radiations UV augmente avec l'index de cristallinité des NLC (Xia et col., 2007). Le béhénate de glycérol et le RBW ont une cristallinité plus élevée que l'ozokérite et donnent ainsi une meilleure protection contre les rayons UV.



**Figure 84:** Spectres d'absorption de l'EMC pur (solubilisé dans l'éthanol, concentration en EMC=0,2 mg/ml) et de chaque nanosuspension (NLC 1; NLC 2 et NLC 3; concentration en EMC=0,028 mg/ml)

**Tableau 44** : Perte d'absorbance à 310 nm pour l'EMC non encapsulé (solubilisé dans l'éthanol, concentration en EMC=0,2 mg/ml) et chaque formulation NLC 1, NLC 2 et NLC 3 (concentration en EMC=0,028 mg/ml)

|                   | Absorbance avant irradiation | Absorbance après irradiation | Perte d'absorbance |
|-------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|
| EMC non encapsulé | 0,480                        | 0,337                        | 30%                |
| NLC 1             | 0,633                        | 0,552                        | 13%                |
| NLC 2             | 0,671                        | 0,527                        | 22%                |
| NLC 3             | 0,604                        | 0,547                        | 10%                |

V.4.3.2.5 Evaluation de la capacité de pénétration cutanée de l'EMC à partir des nanosuspensions

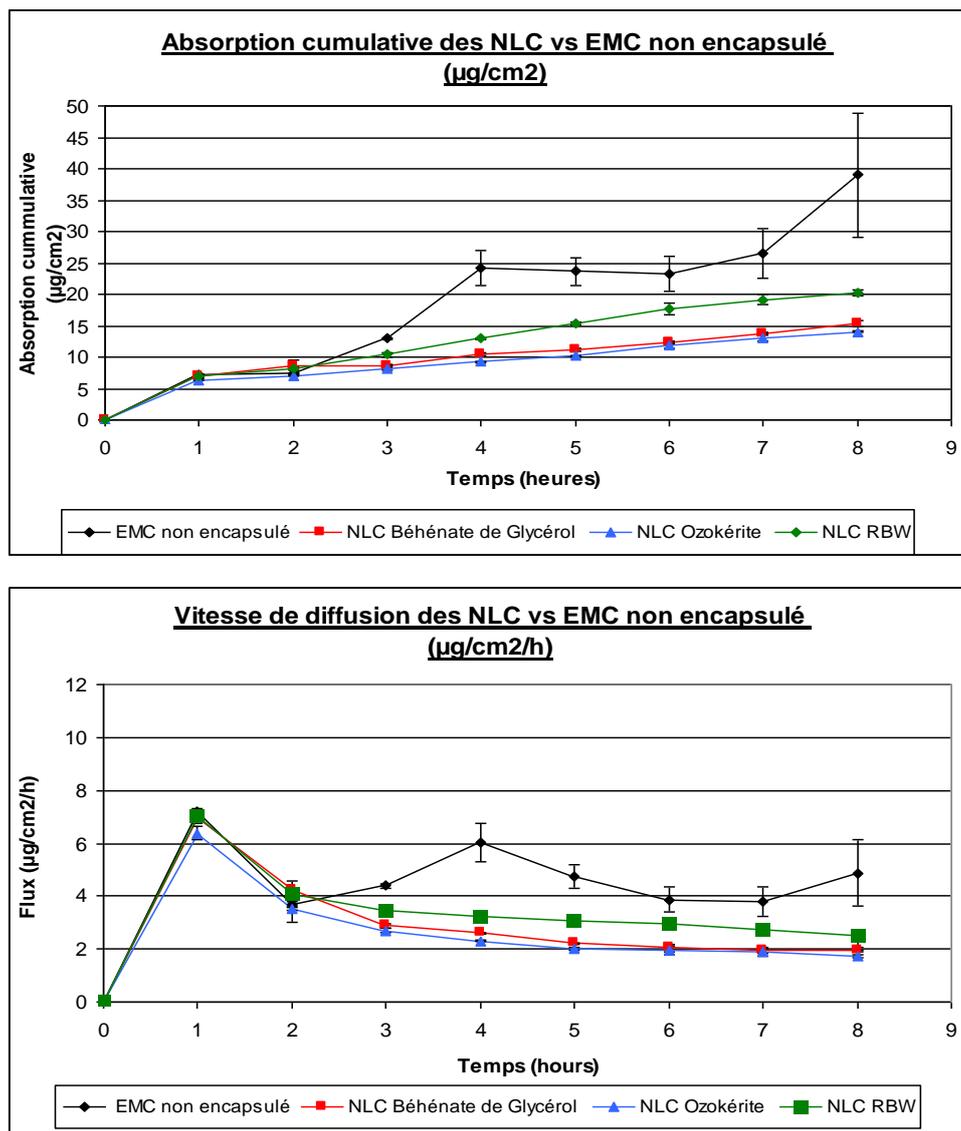
La pénétration cutanée a été investiguée pendant 8h. Chaque échantillon a été analysé en triplicate (Figure 85).

Dans un premier temps, la capacité de pénétration cutanée de l'EMC à partir des nanosuspensions a été mesurée en utilisant une membrane de silicone afin d'observer la capacité de diffusion passive de l'EMC en ayant un minimum d'interaction entre la membrane et l'EMC. De plus, la reproductibilité entre les tests est maximale comme il n'y a pas de variabilité au niveau des membranes. La quantité appliquée en EMC à partir des nanosuspensions et de la dispersion colloïdale était de 2mg/cm<sup>2</sup>. Nous avons observé, au bout de 8h d'expérience, que l'EMC non encapsulé, sous forme de dispersion colloïdale, présentait une plus grande absorption cumulative (39,0±7,6 µg/cm<sup>2</sup>) que dans les trois formulations de nanosuspensions (14,0±0,4 µg/cm<sup>2</sup> pour les NLC formulées avec l'ozokérite ; 16,2 µg/cm<sup>2</sup> pour les NLC formulées avec le béhénate de glycérol et 20,2±0,5 µg/cm<sup>2</sup> pour les NLC formulées avec RBW) (Figure 85).

La vitesse de diffusion était maximale après 1h pour chaque forme encapsulée (7,0±0,1 µg/cm<sup>2</sup>/h pour NLC 1 ; 6,4±0,0 µg/cm<sup>2</sup>/h pour NLC 2 et 7,1±0,3 µg/cm<sup>2</sup>/h pour NLC 3), puis une diminution est observée jusqu'à t<sub>8</sub> (1,9±0,0 µg/cm<sup>2</sup>/h pour NLC 1 ; 1,7±0,0 µg/cm<sup>2</sup>/h pour NLC 2 et 2,5±0,1 µg/cm<sup>2</sup>/h pour NLC 3). En effet, l'EMC qui se trouve en surface des particules va diffuser assez rapidement à

travers la membrane de silicone. Par la suite, il doit diffuser à travers la matrice lipidique avant de pouvoir traverser la membrane.

La vitesse de diffusion de l'EMC non encapsulé présente également un maximum à  $t=1h$  ( $7,2\pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), puis atteint la  $4,8\pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  à  $t=8h$ . Elle diminue moins fortement que les formulations de NLC. En effet, la diffusion à travers la matrice lipidique n'a pas lieu pour l'EMC non encapsulé et donc sa vitesse de diffusion à travers la membrane est plus rapide.



**Figure 85:** Test *in vitro* de la capacité de pénétration de l'EMC non encapsulé (présenté sous forme de dispersion colloïdale) et de l'EMC contenu dans les différentes nanosuspensions NLC 1, NLC 2 et NLC 3 à travers une membrane de silicone (n=3)

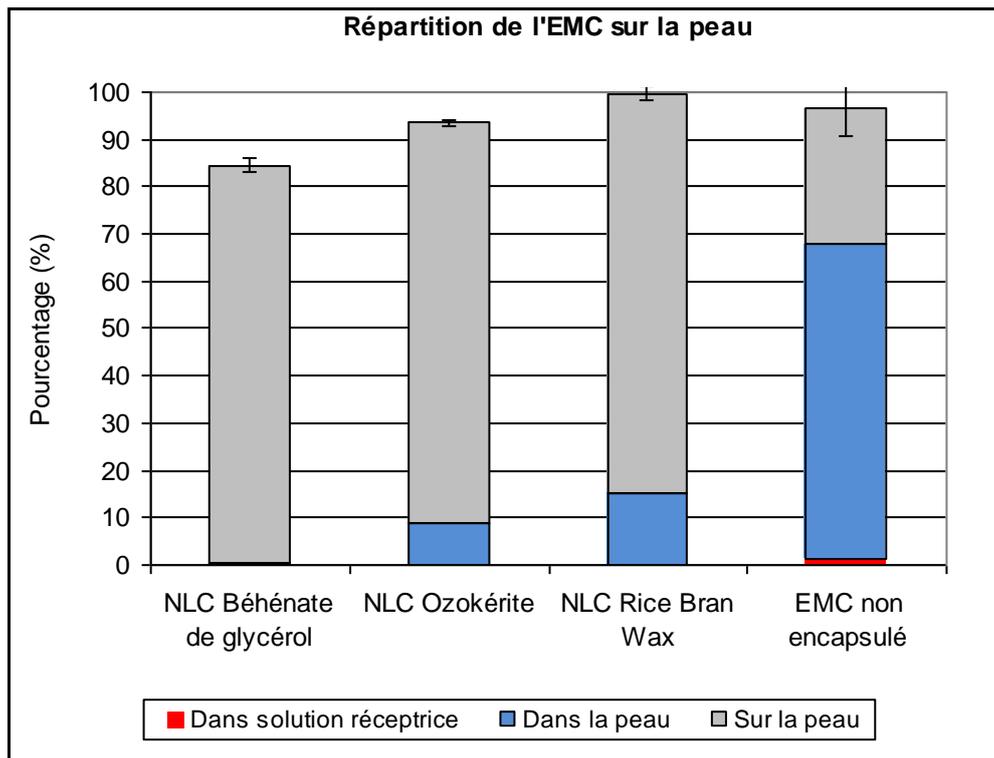
Au temps  $t=8h$ , il existe une différence significative de l'absorption cumulative en EMC entre la dispersion d'EMC non encapsulé et les 3 formulations de NLC (ANOVA :  $F_{8,12}=15,8$ ,  $p<0,05$ ). Par contre, les 3 formulations de NLC n'ont pas montré de différence significative entre elles pour l'absorption cumulative (Tukey-Kramer,  $p>0,05$ ). En effet, dans la dispersion colloïdale, l'EMC est présent sous forme de gouttelettes lipidiques. Dans les suspensions de NLC, l'EMC est incorporé dans une matrice lipidique qui limite sa capacité de diffusion. La diffusion à travers la matrice lipidique est le mécanisme principal d'une libération contrôlée à partir de celle-ci, la concentration en EMC étant négligeable à l'extérieur des nanoparticules. Cependant, la vitesse de diffusion de la molécule peut dépendre de la concentration. Ainsi, si une grande quantité d'ingrédient actif est pris en charge par la matrice lipidique, le potentiel de diffusion à travers celle-ci peut diminuer (Wissing et col., 2002 A). Dans notre cas, suite à la grande quantité d'EMC contenue dans les nanoparticules, les molécules d'EMC entrent en compétition les unes avec les autres afin de diffuser à travers la matrice lipidique puis à travers la membrane de silicone. Elles limitent ainsi leur propre diffusion membranaire.

Une étude *in vitro* a été ensuite réalisée à l'aide de peau humaine excisée. Ceci nous a permis de voir la répartition de l'EMC en surface de la peau ainsi que son potentiel d'accumulation au niveau de celle-ci. Les nanosuspensions ont donné lieu à une accumulation maximale de 14% en EMC dans la peau, alors que 51% d'EMC pénétrait dans la peau à partir de la dispersion colloïdale (Figure 86). De plus, l'EMC n'a pas été détecté dans le fluide récepteur pour les suspensions contenant les nanoparticules, mais il a été détecté en faible quantité (1,3%) pour la dispersion colloïdale. Ces données ont donc suggéré que l'encapsulation diminuait la capacité d'accumulation de l'EMC dans les couches profondes de la peau.

En effet, les molécules d'EMC doivent franchir le derme avant d'atteindre le fluide récepteur. Or elles ne sont pas détectées dans celui-ci, ce qui laisse supposer que l'EMC n'a pas atteint ces couches cellulaires profondes.

De plus, la taille des nanoparticules (entre 250 et 350 nm) était suffisamment élevée pour éviter une pénétration de celles-ci dans la peau. En effet, les particules ayant une taille supérieure à 20 nm ne pénètrent pas la barrière cutanée (SCCP, 2007).

Ainsi, les nanoparticules ne semblaient pas augmenter le processus de pénétration cutanée de l'EMC. Ceci était probablement dû à l'affinité importante de l'EMC pour les matrices lipidiques qui retenaient ainsi le filtre, ralentissant sa diffusion et donc son passage à travers la peau. Chaque lipide semble donc être sûr tant qu'il est utilisé sur une peau saine qui ne présente pas de lésion et dont le stratum corneum présente une résistance adéquate (Heurtault et col., 2003).

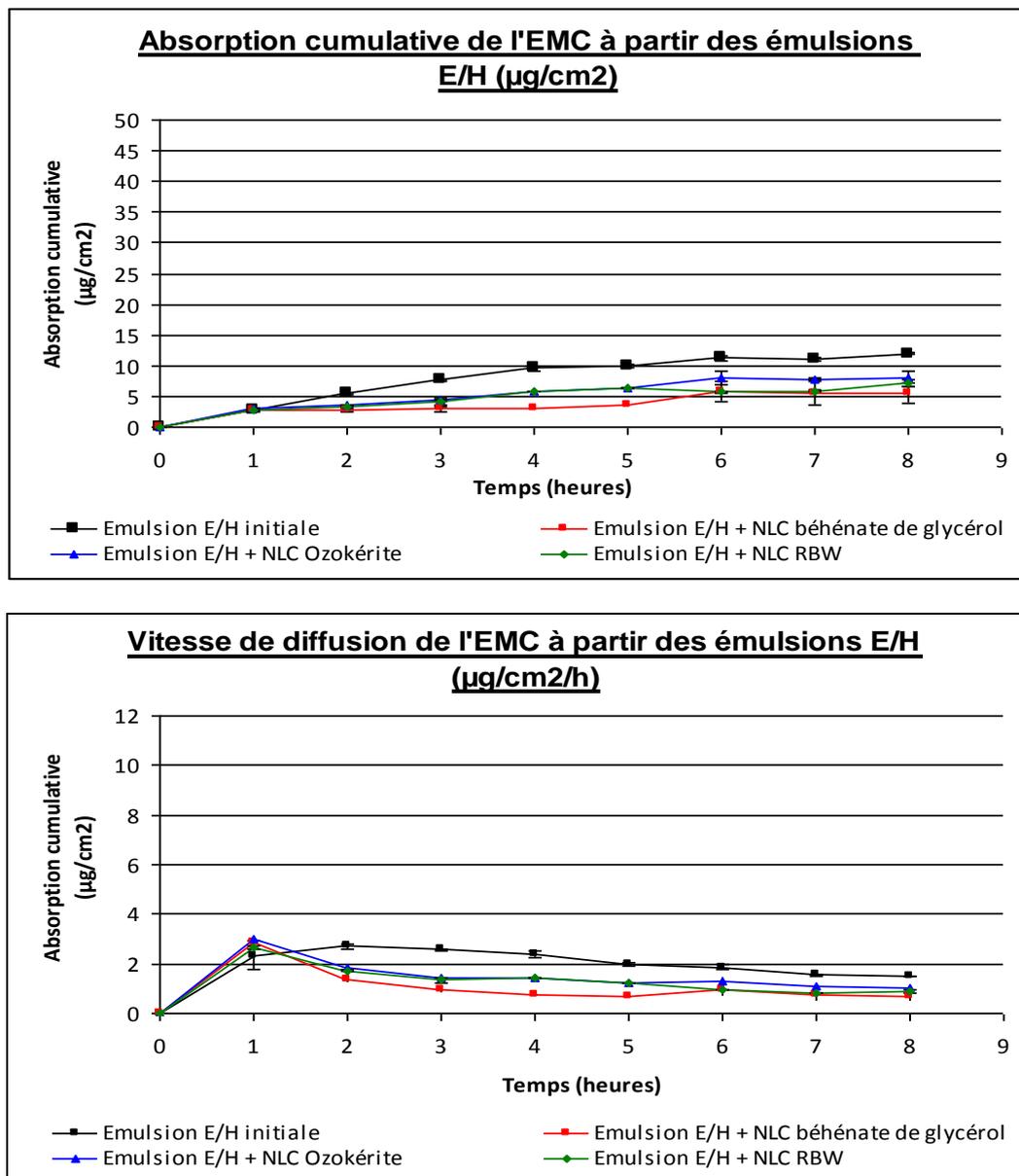


**Figure 86:** Distribution de l'EMC non encapsulé (dispersion colloïdale) et de l'EMC contenu dans les différentes nanosuspensions NLC 1, NLC 2 et NLC 3 lors de l'étude in vitro de la pénétration à travers une membrane de peau humaine (n=3)

#### V.4.3.2.6 Capacité de pénétration cutanée de l'EMC à partir des émulsions

Les nanoparticules ont ensuite été incorporées dans les deux types d'émulsions formulées au début du travail : les émulsions E/H et E/Si qui contenaient tous les filtres organiques et inorganiques (Cf. Partie V.2.2 Tableau 17). L'EMC y a été remplacé par l'EMC encapsulé par les lipides.

La même procédure que précédemment a été utilisée. Les émulsions ont été appliquées sur les membranes de silicone à raison de  $2 \text{ mg/cm}^2$ , soit une pesée précise de  $10 \text{ mg}$  qui permet de déterminer la quantité exacte d'EMC appliquée lors de l'expérience. Des prélèvements de  $2 \text{ ml}$  de fluide récepteur ont ensuite été effectués toutes les heures.

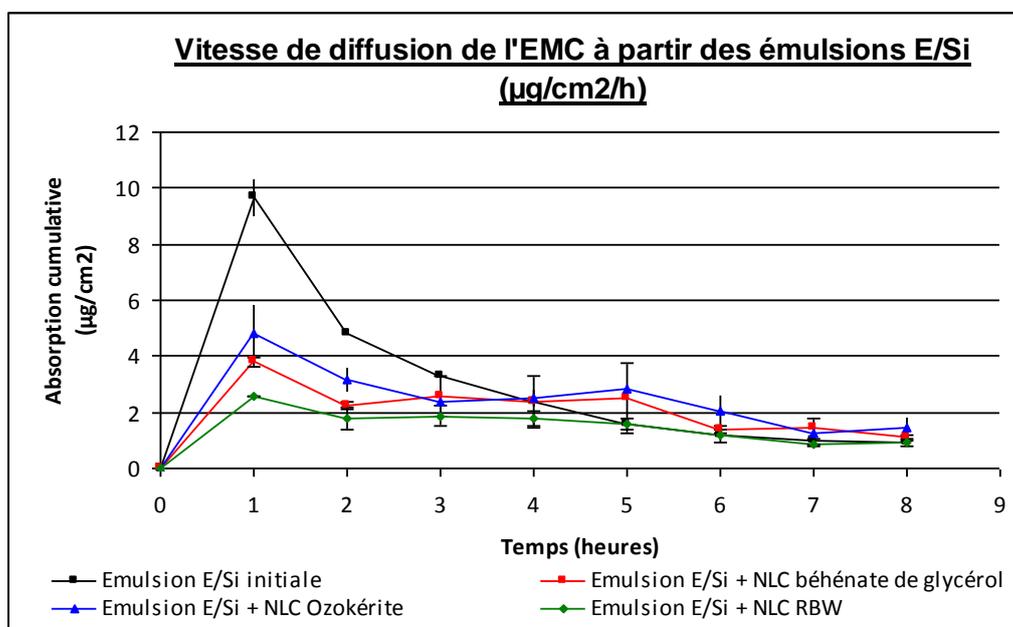
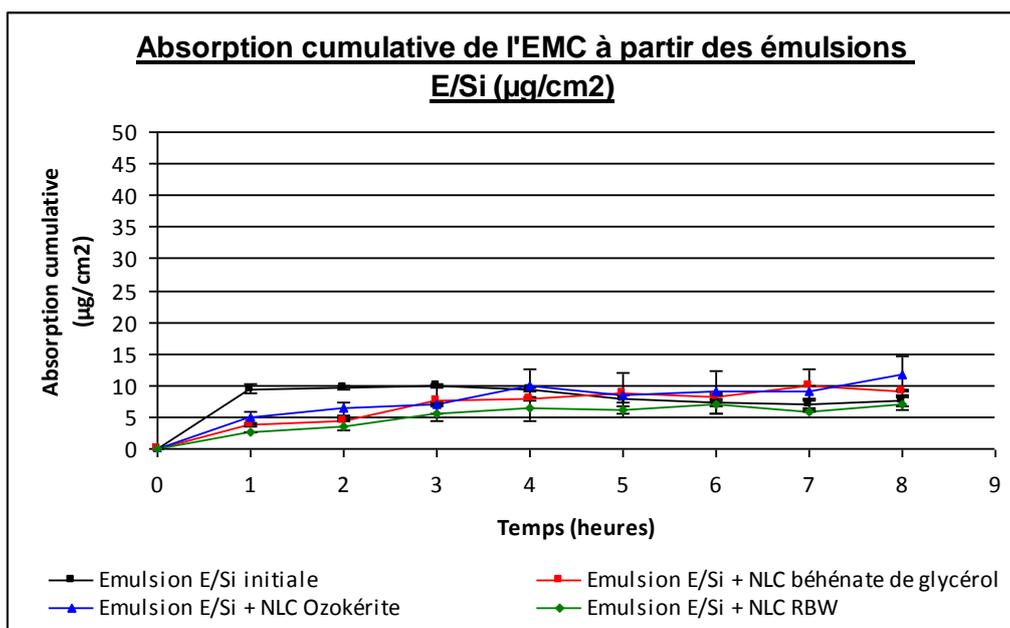


**Figure 87 :** Test *in vitro* de la capacité de pénétration de l'EMC incorporé dans l'émulsion E/H à travers une membrane de silicone (n=3)

Pour l'émulsion E/H, l'absorption cumulative maximale, après 8h d'expérience est obtenue avec l'EMC non encapsulé ( $14,0 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (Figure 87). Elle était de  $5,8 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour l'EMC encapsulé par le béhénate de glycérol, de  $8,2 \pm 1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour les nanoparticules formulées avec l'ozokérite et de  $7,4 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour la formulation réalisée avec RBW. L'absorption cumulative est ainsi deux fois plus élevée pour l'EMC non encapsulé. Les différences d'absorption cumulative entre les trois autres formulations ne sont pas significatives ( $p > 0,05$ , test de Tukey-Kramer). Comme cela a déjà été remarqué pour les nanosuspensions, l'EMC diffuse moins à travers les matrices lipidiques et donc sa capacité à traverser les membranes est plus faible.

De la même façon que pour les particules en suspension, nous pouvons constater que la vitesse de diffusion est maximale après 1h d'expérience pour chacune des émulsions (entre  $2,3 \pm 0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour les NLC 3 et  $2,6 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC2) puis qu'elle diminue au cours du temps pour atteindre  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC3 et  $1,0 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC2, après 8h d'expérience.

Les résultats de l'absorption cumulative à partir de l'émulsion E/Si (Figure 88) ont montré un maximum avec l'émulsion E/Si contenant les nanoparticules encapsulées par l'ozokérite ( $12,4 \pm 3,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  après 8h d'expérience). Elle était de  $9,4 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour l'EMC encapsulé par le béhénate de glycérol, de  $7,4 \pm 1,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour l'émulsion contenant les nanoparticules réalisées avec RBW et de  $10,1 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  pour l'émulsion E/Si contenant l'EMC non encapsulé. Ces résultats étaient également plus faibles que ceux obtenus pour les suspensions de nanoparticules et l'EMC non encapsulé. Les différences d'absorption cumulative entre les trois émulsions contenant les formes encapsulées d'EMC ne sont pas significatives ( $p > 0,05$ , test Tukey-Kramer). Comme cela a déjà été remarqué pour les nanosuspensions, l'EMC diffuse moins rapidement à travers les matrices lipidiques et donc sa capacité à traverser les membranes est plus faible.



**Figure 88** : Test *in vitro* de la capacité de pénétration cutanée de l'EMC incorporé dans l'émulsion E/Si à travers une membrane de silicone (n=3)

Par contre, la vitesse de diffusion maximale, était obtenue après 1h de test pour l'émulsion E/Si initiale ( $10,2 \pm 0,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ), les autres valeurs étaient de  $3,5 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC1 ;  $4,6 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC2 et  $2,2 \pm 0,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC3. Cela est sûrement lié au fait que l'EMC a plus d'affinité pour les silicones de la phase externe de l'émulsion que pour les polymères. Il diffuse ainsi plus vite à partir de

l'émulsion E/Si de départ qu'à partir des émulsions formulées avec les nanoparticules lipidiques.

Une diminution importante de la diffusion de l'EMC à partir de cette émulsion E/Si de départ a ensuite été observée. Par contre, on constatait une augmentation progressive de la vitesse de diffusion pour les formes encapsulées par les lipides entre  $t_1$  et  $t_5$ , puis à nouveau une diminution, pour atteindre finalement, au bout de 8h, des valeurs semblables à celle obtenue avec l'EMC contenu dans l'émulsion E/Si de départ ( $1,3 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour l'EMC contenu dans l'émulsion E/Si de départ,  $1,2 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC1,  $1,5 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC2 et  $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$  pour NLC3). Ces valeurs très proches sont dues au fait que l'EMC employé dans la formulation de l'émulsion E/Si est lui aussi encapsulé sous forme de particules polymériques et donc doit diffuser à travers ces polymères avant de diffuser à travers la membrane.

Dans les deux types d'émulsions (E/H et E/Si), les nanoparticules, polymériques et lipidiques, sont dispersées dans la phase aqueuse. Nous constatons que l'absorption cumulée de l'EMC au bout de 8h est plus importante à partir de l'émulsion E/Si que de l'émulsion E/H (par exemple, pour le béhénate de glycérol, elle est de  $9,4 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  à partir de l'émulsion E/Si et de  $5,8 \pm 1,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  à partir de l'émulsion E/H). En effet, l'EMC a une plus grande affinité pour les lipides de l'émulsion E/H, alors qu'il n'est pas miscible aux silicones de l'émulsion E/Si. Il est donc moins retenu par l'émulsion E/Si et présente une plus grande capacité à passer les membranes.

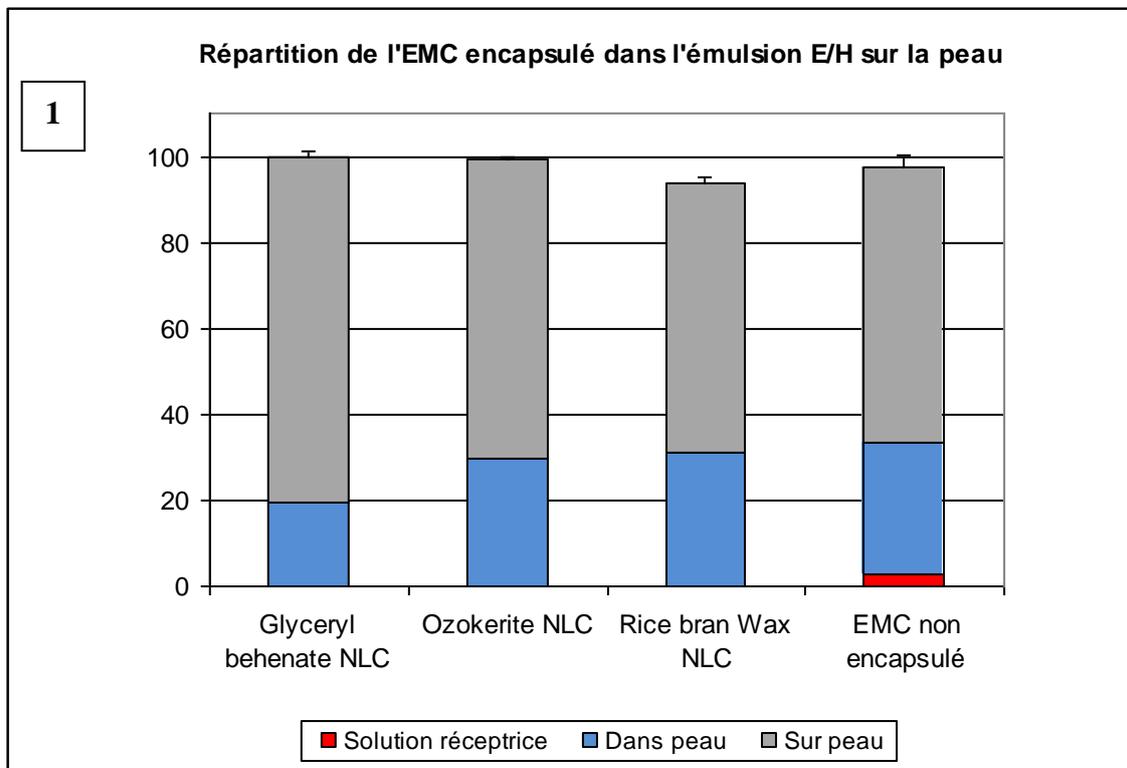
Les émulsions ont ensuite été appliquées sur les membranes constituées de peau humaine excisée (Figure 89).

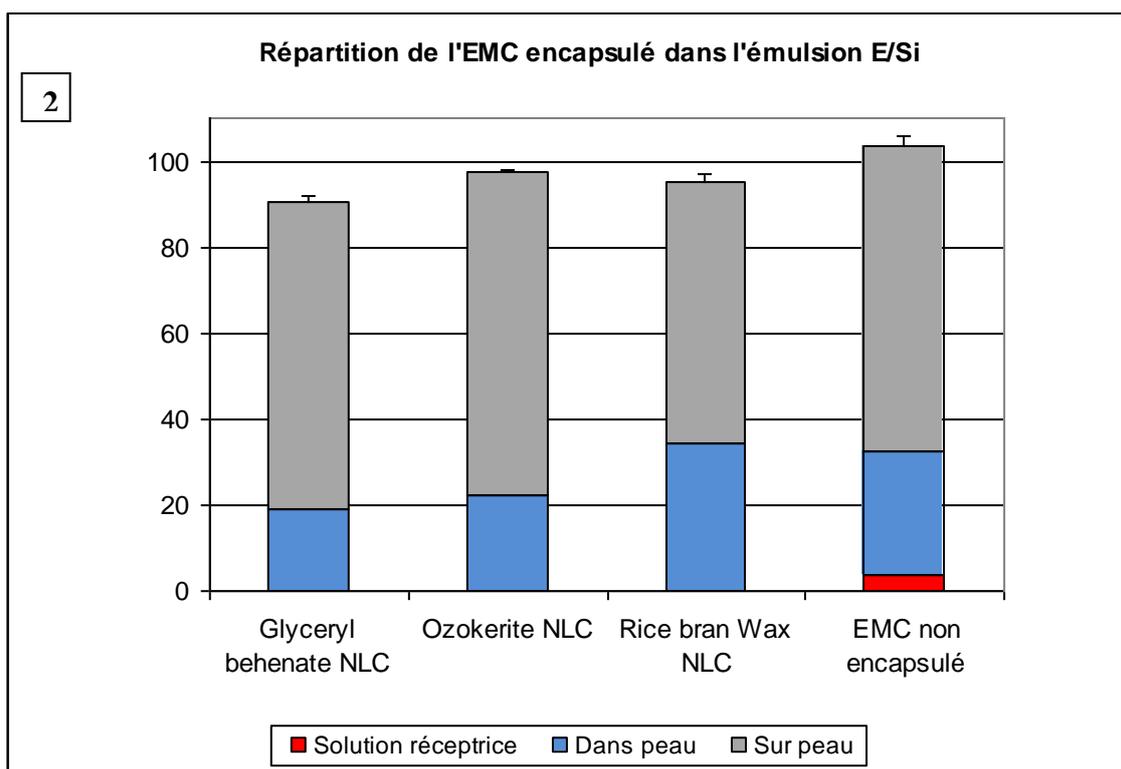
L'EMC n'a pas été retrouvé dans la solution réceptrice que ce soit pour les émulsions E/H ou pour les émulsions E/Si contenant l'EMC encapsulé dans les lipides. En effet, l'affinité du filtre pour chacune des matrices lipidiques ralentit sa diffusion et donc sa libération dans l'émulsion, ceci empêche donc le filtre d'atteindre les couches profondes de la peau et donc la solution réceptrice.

Une accumulation de l'EMC dans la peau au bout de 8h de test a été observée.

Celle-ci était de 19,5%, 29,7% et 31,2% à partir des émulsions E/H contenant respectivement NLC 1, NLC 2 et NLC 3 et de 30,6% pour l'EMC non encapsulé. A partir des émulsions E/Si, elle était de 18,9%, 22,4% et 34,2% pour les formes encapsulées NLC 1, NLC 2 et NLC 3 ; et de 31,5% pour l'EMC dans l'émulsion E/Si de départ. Les valeurs sont donc très proches pour les deux types d'émulsions et pour chacune des formes d'EMC. Finalement, la majorité de l'EMC reste en surface de la peau, quelle que soit la formulation.

L'encapsulation lipidique de l'EMC semble donc ne pas favoriser sa pénétration cutanée.





**Figure 89:** Distribution de l'EMC (encapsulé ou non) lors de l'étude *in vitro* de la pénétration à travers une membrane de peau humaine (n=3) : (1) émulsion E/H ; (2) émulsion E/Si

#### **V.4.4 Conclusion**

L'encapsulation par des lipides solides - le béhénate de glycérol, l'ozokérite et la cire de tégment de riz (RBW) - semble être efficace pour protéger le filtre solaire contre les dégradations causées par les rayons UV. L'incorporation de l'EMC dans ces matrices lipidiques améliore l'effet de blocage des rayons UV. L'augmentation de l'absorbance, due aux différents phénomènes de diffraction, réflexion et réfraction amenés par à la présence des nanoparticules, aux différentes longueurs d'onde du spectre d'absorption de l'EMC, et notamment à sa longueur d'onde de référence de 310 nm, dépend principalement des caractéristiques des matrices lipidiques (cristallinité, taille des particules).

La capacité d'encapsulation de 70% est une caractéristique bénéfique pour permettre la production de produits à haut FPS. Avec cette grande capacité

d'encapsulation d'EMC dans les nanoparticules lipidiques, les nanosuspensions évaluées pourraient être utilisés dans les formulations solaires car elles permettent de diminuer la quantité totale d'EMC.

L'évaluation *in vitro* de la pénétration cutanée a prouvé que l'encapsulation d'EMC n'a pas augmenté sa capacité de pénétration cutanée. De plus, les NLC sont capables de relarguer le filtre qui se libère alors de la matrice lipidique de façon continue au cours du temps. Ainsi, le filtre reste plus longtemps à la surface de la peau, qui est l'endroit où il doit agir.

Les résultats obtenus montrent l'importance de l'effet de l'encapsulation sur la protection contre les rayons UV et sur le potentiel de pénétration cutanée de l'EMC. La pulvérisation de ces nanoparticules via des aérosols ne pose pas de problème, car elles sont incorporées dans les émulsions et les tailles des gouttelettes vont surtout dépendre des valves et des diffuseurs choisies, comme il a été vu précédemment (Cf. partie IV.1.3). Les nanoparticules englobées dans des gouttelettes qui auront des tailles supérieures à 30  $\mu\text{m}$  ne présentent donc pas de potentiel de pénétration pulmonaire.

## **VI. Conclusion générale**

## **VI. Conclusion générale**

Des émulsions de produits solaires avec de grandes quantités en filtres UV et une quantité négligeable de gouttelettes de taille inférieure à 30  $\mu\text{m}$  ont été développées en optimisant les paramètres de formulation et en utilisant les valves et les diffuseurs appropriés. La taille des gouttelettes et la distribution de taille des gouttelettes émises ont été fortement influencées par tous les paramètres étudiés à savoir la concentration en gaz propulseur, la viscosité de départ de l'émulsion, la présence ou non de filtres inorganiques et le design des valves et des diffuseurs. En considérant le produit final et la taille des gouttelettes, les meilleurs produits ont été obtenus avec la plus faible concentration en gaz (22%), la plus grande concentration en filtre inorganique (4%) et la plus grande viscosité (6500 mPa.s). Il était donc important de considérer tous les paramètres techniques et de formulation lors de la mise en aérosol de ces produits afin d'optimiser leur sécurité en cas d'inhalation en gardant des tailles de gouttelettes qui évitent tout passage dans les poumons. En effet, afin d'obtenir une sécurité totale, il convenait de considérer que les gouttelettes devaient avoir une taille d'au moins 30  $\mu\text{m}$  de diamètre et pas plus de 1% des gouttelettes ne pouvaient avoir un diamètre inférieur ou égal à 10  $\mu\text{m}$ .

Une étude *in vitro* du passage cutané des filtres solaires (EMC, DHHB, ED-PABA, MBBT, BEMT,  $\text{TiO}_2$  et  $\text{ZnO}$ ) à travers la peau a été réalisée en utilisant une cellule de diffusion de Franz avec de la peau humaine excisée comme membrane. Pour cela, une méthode CLHP pour la détermination des filtres organiques ainsi qu'une méthode spectrométrique (ICP-OES) pour l'analyse du  $\text{TiO}_2$  et du  $\text{ZnO}$  ont été mises au point. Les résultats obtenus pour chaque filtre ont été cohérents avec des études réalisées précédemment par différents auteurs, en termes de pénétration cutanée. Aucune pénétration cutanée n'a été observée pour les filtres inorganiques. Pour les filtres organiques, seuls l'EMC et MBBT ont présenté un potentiel de pénétration cutanée très faible.

De plus, cette étude a confirmé l'importance du véhicule qui peut favoriser ou non la capacité de pénétration cutanée de chaque filtre UV. Toutes ces informations sont une aide précieuse pour la prédiction de la sécurité de tels produits lorsqu'ils sont utilisés sur une peau saine et non fragilisée par des blessures, des brûlures ou une maladie cutanée.

Une étude *in vivo* a été réalisée en utilisant la méthode du « Stripping » qui consiste à prélever le stratum corneum à l'aide de disques adhésifs. Nous avons ainsi pu observer que la majorité des filtres inorganiques restait à la surface de la peau pendant toute la durée de l'expérimentation. En effet, les quantités de TiO<sub>2</sub> et de ZnO retrouvées après rinçage à l'alcool étaient supérieures à 55% pour les émulsions E/H et E/Si. De plus, les quantités dosées dans les 15 couches cellulaires du stratum corneum les plus profondes étaient négligeables (inférieures à 3% pour chaque filtre).

Les deux études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'absorption des cinq filtres organiques et des deux filtres inorganiques était négligeable ou totalement nulle. La corrélation des deux types d'étude est donc bonne. Cependant, les études *in vitro* ont tendance à surestimer les résultats des études *in vivo*. En effet, la flexibilité de la peau excisée est plus faible que celle de la peau vivante, ce qui ne favorise pas la pénétration cutanée. De plus, la couche hypodermique n'est pas présente pour l'étude *in vitro* et représente donc une couche en moins à traverser.

La combinaison des deux types d'études est importante car elles sont complémentaires. En effet, l'étude *in vitro* permet de donner une première estimation sur la capacité de pénétration cutanée des filtres solaires, tandis que les tests *in vivo* permettent de vérifier les résultats obtenus dans les conditions réelles. De plus, elles constituent une approche non invasive pour l'évaluation de la pénétration cutanée et permettent d'observer la capacité de réservoir que possède l'épiderme et plus particulièrement le stratum corneum. La majorité des filtres reste à la surface de la peau, ce qui est très important pour garantir une bonne sécurité et une bonne efficacité du produit. L'étude *in vivo* a également permis de compléter l'étude *in vitro* en localisant les filtres solaires dans les différentes couches du stratum corneum.

La dernière partie du travail a porté sur l'encapsulation de l'EMC par des lipides solides. Celle-ci semble être efficace pour protéger le filtre de la dégradation causée par les rayons UV. L'incorporation de l'EMC dans ces matrices lipidiques améliore l'effet de blocage des rayons UV et l'augmentation de l'absorbance à 310 nm dépend principalement des caractéristiques des matrices lipidiques. La capacité d'encapsulation supérieure à 70% était une caractéristique bénéfique pour permettre la production de produits à haut FPS. L'évaluation *in vitro* de la pénétration cutanée a prouvé que l'encapsulation d'EMC n'a pas augmenté sa capacité de pénétration cutanée. Ainsi, le filtre reste plus longtemps à la surface de la peau, qui est l'endroit où il doit agir.

Deux critères importants sont à considérer pour les produits solaires en aérosol: l'impact sur la santé humaine et l'impact sur l'environnement. En effet, ces produits sont conditionnés sous une forme qui produit des gouttelettes de petites tailles. Celles-ci peuvent alors pénétrer les poumons lors d'une mauvaise utilisation des produits. Une approche sur la mesure des tailles des gouttelettes a donc été réalisée dans le cadre de ce travail. Cependant, il serait intéressant de mettre au point une étude d'évaluation de la quantité de produit susceptible de passer dans les poumons afin d'évaluer la toxicité cellulaire de ces produits. Les études sur animaux étant bannies pour les produits cosmétiques ainsi que pour les matières premières, ces expérimentations seraient à développer sur des cellules souches ou des épithéliums pulmonaires reconstitués.

Les produits solaires peuvent aussi avoir un impact sur l'environnement. Depuis quelques mois, il a été constaté qu'ils pouvaient atteindre l'intégrité de l'écosystème aquatique de certaines régions touristiques en empêchant les rayons UV de pénétrer dans l'eau. Les filtres solaires de nouvelle génération devront alors être de plus en plus naturels et biodégradables pour permettre d'éviter au maximum ces effets néfastes sur l'environnement.

## **VII. Bibliographie**

## **VII. Bibliographie**

**Abdulla**, F.R., Feldman, S.R, Williford, P.M, Krowchuk, D., and Kaur, M. Tanning and skin cancer. *Pediatric Dermatology*. Vol.22 (6). 501-512 **(2005)**

**Abram**, A.Z., Tomlinson, R.P.J. Mousses. Issu de: *Handbook of Cosmetic Sciences and Technology*. Barel, A.O., Paye, M and Maibach, H.I. Marcel and Dekker ed. New-York, USA. 221-232 **(2001)**

**Aérosol:** [www.aerosols-info.org](http://www.aerosols-info.org) **(2009 A)**

**Aérosol:** <http://www.aerosols.be/AbaFrench/MainABA.aspx> **(2009 B)**

**Ahmed**, A.H., Soyer, H.P., Saunders, N., Boukamp, P., Roberts, M.S. Non-melanoma skin cancers. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. Vol.5. 55-62 **(2008)**

**Akomeah**, F., Nazir, T., Martin G.P., Brown M.B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 21. 337-345 **(2003)**

**Arnaud**, P. Etat gazeux. Issu de: *Chimie Physique*. Arnaud,P., Rouquérol, F., Chambaud, G., Lissilour, R. Dunod édition. Paris, France. 264-282 **(2002)**

**Atanassova**, D., Stefanova, V., Russeva, E. Co-precipitative pre-concentration with sodium diethyldithiocarbamate and ICP-AES determination of Se, Cu, Pb, Zn, Fe, Co, Ni, Mn, Cr, and Cd in water. *Talanta*. 47. 1237-1243 **(1998)**

**Atkins**, P.W., de Paula, J. L'équilibre chimique- propriétés des gaz. Issu de : *Chimie Physique*. 2<sup>ème</sup> édition. De Boeck Universités édition. Bruxelles, Belgique. 3-30 **(2004)**

**Attwood, D., Florence, A.T.** Solubilization. Issu de: Surfactant systems, their chemistry, pharmacy and biology. 1ère edition. Chapman an Hall edition. New York, Etats-Unis. 227-288 **(1983)**

**Bag on valve:** <http://bagonvalve.com/en/index/htm> **(2010)**

**Barry, B.W.** Dermatological formulations: Percutaneous absorption. (Drug and the pharmaceutical sciences, Vol. 18) Swarbrick, J. ed. Marcel and Dekker, New-York, USA. 2-20 **(1983)**

**BASF.** UV Filters. Personal care ingredients. 1-24 **(2009)**

**Bastuji-Garin, S. and Diepgen, T.L.** Cutaneous malignant melanoma, sun exposure and sunscreen use: epidemiological evidence. British Journal of Dermatology. Vol. 146. 24-30 **(2002)**

**Benech-Kieffer, F., Meuling, W.J.A., Leclerc, C., Roza, L., Leclaire, J., Nohynek, J.** Percutaneous absorption of Meroxyl SX in human volunteers/ comparison with in vitro data. Skin pharmacology application and skin physiology. Vol. 16. 343-355 **(2003)**

**Bennat, C. and Müller-Goymann, C.C.** Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. International Journal of Cosmetic Sciences. Vol. 22. 271-283 **(2000)**

**Berset,G., Gonzenbach, H., Christ, R., Martin, R., Deflandre, A., Mascotto, R.E., Jolley, J.D.R., Lowell, W., Pelzer, R., Stiehm, T.** Proposed protocol for determination of photostability Part I: cosmetic UV filters. International Journal of Cosmetic Science. Vol.18. 167-177 **(1996)**

**Bissonnette, R.** Update on sunscreen. Skin Therapy Letter. 1-6 **(2008)**

**Boevski**, Iv., Daskalova, N., Havezov, I. Determination of barium, chromium, cadmium, manganese, lead and zinc in atmospheric particulate matter by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Spectrochimica Acta part B*. 55. 1643-1657 **(2000)**

**Bosquillon**, L., Derom, E., Stahl, E., Wahlin-Boll, E., Pauwels, R. The inhalation device influences lung deposition and bronchodilating effect of terbutaline. *American Journal of Respiratory Crit. Care. Med* Vol. 153(5). 1636-1640 **(2003)**

**Bouwstra**, J.A., Ponec, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica et Acta* 8, 2080-2095 **(2006)**

**Bressac-de-Paillerets**, B., Avril, M-F., Chompret, A., Demenais, F. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie*. Vol.84. 67-74 **(2002)**

**Brookfield**. Document interne. Measurement and control of viscosity. Brookfield engineering laboratories. Stoughton, Massachusetts USA. **(1998)**

**Brown**, D.A. Skin pigmentation enhancers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63. 148-161 **(2001)**

**Buenger**, J. Driller, H. Ectoin: an effective natural substance to prevent UVA-induced premature photoaging. *Skin Pharmacology and Physiology*. Vol.17. 232-237 **(2004)**

**Césarini**, J.P., Michel, L. Maurette, J.M., Adhoute, H., Béjot. M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxydant complex containing carotenoids. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*. Vol. 19. 182-189. **(2003)**

**Chatelain, E., Gabard, B., Surber, C.** Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*. Vol. 16. 28-35 **(2003)**

**Ciba** Specialty Chemicals Inc. Ciba® Tinosorb® UV filters for photostable, broad spectrum UV protection. Pub. No. Tinosorb UV.BB.0603.e.01. Switzerland. 1-4 **(2006)**

**Coffey, M.J. and Jickells, T.D.** Ion chromatography-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (IC-ICP-AES) as a method for determining trace metals in estuarine water. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. Vol. 40. 379-386 **(1995)**

**Colipa Statistics Working Group.** June 2006: Statistics. Colipa. 2006.

**Colipa.** <http://www.colipa.eu/about-colipa-the-european-cosmetics-association/facts-and-figure-colipa-the-european-cosmetic-cosmetics-association.html> **(2009)**

**Congdon, N.G.** Prevention strategies for age related cataract: present limitations and future possibilities. *British Journal of Ophtalmology*. Vol. 85. 516-520 **(2001)**

**Coster.** Aerosol Catalogue. Coster Technologie Speciali S.p.A. 1.1.03 **(2002)**

**Couteau, C., Perez Cullel, N., Connan, A.E., Coiffard, L.J.M.** Stripping method to quantify absorption of two sunscreens in human. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 222. 153-157 **(2001)**

**CTFA** South Africa, CTFA, JCIA, Colipa. International Sun Protection factor Test Method. **(2006)**

**Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V. Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J. and Toussaint, O.** repeated exposure of human skin fibroblast to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway. *Journal of Cell Science*. Vol. 18. 743-758 **(2005)**

**De Snoo, F.A., Hayward, N.K.,** Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Letters*. Vol. 230. 153-186 **(2005)**

**De Vries, E., Coebergh, J.W.** Cutaneous malignant melanoma in Europe. Vol. 40. 2355-2366 **(2004)**

**Diembeck, W., Beck, H., Benech-Kieffer, F., Courtellemont, P., Dupuis, J., Lovell, W., Paye, M., Spengler, J. and Steiling, W.** test guidelines for *In Vitro* assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. Vol.37. 191-205 **(1999)**

**Diepgen, T.L. and Mahler, V.** The epidemiology of skin cancer. *British Journal of Dermatology*. Vol. 146. 1-6 **(2002)**

**Diffey, B.L.** A method for broad spectrum classification of sunscreens. *International Journal of Cosmetic Sciences*. Vol. 16 (2). 47-52 **(1994)**

**(A) Diffey, B.L.** Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods*. Vol. 28. 4-13 **(2002)**

**(B) Diffey, B.L.** Human exposure to solar ultraviolet radiation. *Journal of Cosmetic Dermatology*. Vol. 1. 124-130 **(2002)**

**Diffey, B.L.** Sunscreens and melanoma: the future looks bright. *British Journal of Dermatology*. Vol.153. 378-381 **(2005)**

**Directive Européenne** 83/574/CEE, 76/768/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des Etats membres aux produits cosmétiques. **(1976)**

**Diridollou, S., Vabre, S., Berson, M., Vaillant, L., Black, D., Lagarde, J.M., Gall, Y., Patat, F.** Skin ageing : changes of physical properties of human skin in vivo. International Journal of Cosmetic Sciences. Vol. 23. 353-362 **(2001)**

**Dow Corning.** Silicone advantage. New solutions for High Performance Sun Care Applications. Science Sensuality. Dow Corning Corporation. USA. **(2002)**

**Dransfield, G.P.,** Inorganic sunscreens. Radiation Protection Dosimetry. Vol. 91. N° 1-3. 271-273 **(2000)**

**Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S., Hidaka, H. and Knowland, J.** Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. FEBS Letters. Vol. 418. 87-90 **(1997)**

**Durant, S., KArran, P.** Vanillins- a novel family of DNA-PK inhibitors. Nucleic Acids Research. Vol. 31 (19). 5501-5512 **(2003)**

**Dussert, A.S., Gooris, E.** Characterization of the mineral content of a physical sunscreen emulsion and its distribution onto human stratum corneum. International Journal of Cosmetic Sciences. Vol.19. 119-129 **(1997)**

**Duthie, M.S., Kimber, I., and Norval, M.** The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. British Journal of Dermatology. Vol. 140. 995-1009 **(1999)**

**EC.** 7<sup>th</sup> amendment to the EC Cosmetics Directive (L66/26-35). Directive 2003/15/EC of the European parliament and of the council of 27 February 2003, amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the member States relating to cosmetic products. 27 February 2003. Brussels, Belgium **(2003)**

**Edrees**, GMF, El-Kholy, WM., El.Habiby, EM., El-Sherbiny, SA. Protective action of peanut oil in rats exposed to gamma-rays. *Belgian Journal of Zoology*. Vol. 138 (2). 149-153 **(2008)**

**Elversson**, J., Millqvist-Fureby, A., Alderborn, G., Elofsson, U. Droplet and particle size relationship and shell thickness of inhale lactose particles during spray-drying. *Journal of pharmaceutical Sciences*. Vol. 92. 900-910. **(2003)**

**English**, D.R., Armstrong, B.K., Kricher, A. and Fleming, C. Sunlight and cancer. *Cancer Causes and Control*. Vol. 8. 271-283 **(1997)**

**Escobar-Chavez**, J.J., Merino-Sanjuan, V., Lopez-Cervantes, M., Urban-Morlan, Z., Pinon-Segundo, E., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 11(1). 104-130 **(2008)**

**Fairhurst**, D., Mitchnick, M. Particulate sun block: general principles. issu de "Sunscreens : Development, evaluation and regulatory aspects". Lowe, N., Shaath, N.A., Pathak, M.A. 2<sup>nd</sup> Edition, *Cosmetic and Sciences technologies*. 103-109 **(1997)**

**Gamer**, A.O., Leibold, E. and Van Ravenzwaay, B. The *in vitro* absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicology in vitro*. Vol.20. 301-307 **(2006)**

**Gange**, R.W., Soparkar, B.S., Matzinger, E., Dromgoole, S.H., Sefton, J., DeGryse, R. efficacy of a sunscreen containing butylmethoxydibenzoylmethane against ultraviolet A radiation in photosensitized subjects. *Journal of the Academy of Dermatology*. Vol. 15. 494-499 **(1986)**

**Garret**, H., Grisham, C.M. Le tétrahydrofolate (THF) et les unités monocarbonées. Issu de : *Biochimie*. 1<sup>ère</sup> édition. De Boeck Universités éd. Bruxelles, Belgique. 901-933 **(2000)**

**Giacomoni**, P.U. Open questions in photobiology III. Melanin and photoprotection. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 29. 87-89 **(1995)**

**Gibling**, A.-V, Thomas, J.M. Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. Vol. 60. 32-40 **(2006)**

**Gilbert**, Scott F. Les dérivés de l'ectoderme: le système nerveux central et l'épiderme. Issu de « Biologie du développement ». 2<sup>ème</sup> édition. De Boeck et Larcier S.A. Edition De Boeck Université. Bruxelles, Belgique. 417 **(2004)**

**Gonzalez**, H., Farbrot, A., Larkö, O., Wennberg, A-M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation. British Journal of Dermatology. Vol. 154. 337-340 **(2006)**

**Gonzalez**, S., Fernandez-Lorente, M., Gilaberte-Calzada, Y. The latest on skin photoprotection. Clinics in Dermatology. Vol. 26. 614-626 **(2008)**

**Graf**, R., Anzali, S., Buenger, J., Pfluecker, F., Driller, H. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. Clinics in Dermatology. Vol. 26. 326-333 **(2008)**

**Grant**, W.B., Strange, R.C. and Garland, C.F. Sunshine is good medicine. The health benefits of ultraviolet-B induced vitamine D production. Journal of Cosmetic Dermatology. Vol.2. 86-98 **(2004)**

**Groves**, G.A. *The sunscreen industry in Australia: past, present, and future* issu de "Sunscreens : Development, evaluation and regulatory aspects". Lowe, N., Shaath, N.A., Pathak, M.A. 2<sup>nd</sup> Edition, Cosmetic and Sciences technologies. 227-240 **(1997)**

**Gustafson**, D.L., Franz, H.R., Ueno, A.M., Smith, C.J., Doolittle, D.J. and Waldren, C.A. Vanillin (3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde) inhibits mutation induced by hydrogen peroxide, N-methyl-N-nitrosoguanidine and mitomycin C but not <sup>137</sup>Cs  $\gamma$  - radiation at the CD59 locus in human-hamster hybrid A<sub>L</sub> cells. *Mutagenesis*. Vol. 15 (3). 207-213 **(2000)**

**Harris**, R.B. and Alberts, S.S. Strategies for skin cancer prevention. *International Journal of Dermatology*. Vol. 43. 243-251 **(2004)**

**Hearing**, V.J. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of Dermatological science*. Vol. 37. 3-14 **(2005)**

**Hecq**, J. Development, characterization and evaluation of crystalline nanoparticles for enhancing the solubility, the dissolution rate and the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs. Thèse présentée à l'Université Libre de Bruxelles en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science Pharmaceutiques. **(2006)**

**Helfand**, M. Mahon, S.M., Eden, K.B., Frame, P.S. Screening for skin cancer. *American Journal of Preventive Medicine*. Vol. 20. 47-58 **(2001)**

**Heurtault**, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J-E., Benoit, J-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. Vol. 24. 4283-4300 **(2003)**

**Heyder**, J., Gebhart, J., Rudolf, G., Schiller, C.F., Stahlhofen W., Deposition of particles in the human respiratory tract in the size range 0,005-15 $\mu$ m. *Journal of aerosol Sciences*. Vol.17. 811-825. **(1986)**

**Hill**, H.Z. and Hill, G.J. UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma. *Pigment Cellulra research*. Vol. 13. 140-144 **(2000)**

**Hughes**, K.J., Lvovich, V.F., Woo, J., Moran, B., Soares, A., Truong, T. Novel methods for emollient characterization. *Cosmetic and Toiletries Manufacture Worldwide*. 1-6 **(2006)**

**Huong**, S.P., Andrieu, V., Reynier, J-P., Rocher, E., Fourneron, J-D. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexhyl *p*-methoxycinnamate and its influence on the sun protection factor. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol.186 (1). 65-70 **(2007)**

**Hussein**, M.R. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *Journal of Cutaneous Pathology*. Vol. 32. 101-205 **(2005)**

**Iannuccelli**, V., Coppi, G., Sergi, S., Mezzena, M., Scalia, S. In vivo and in vitro skin permeation of Butyl Methoxydibenzoylmethane from lipospheres. *Journal of pharmacological and biophysiological research*. Vol. 21. 30-38 **(2008)**

**Ineos** oligomers. Ineos isoalkanes in cosmetics formulations. General product information. *Ineos Oligomers*. 1-5 **(2006)**

**Jablonski**: <http://www.web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluorescence> **(2009)**

**Jacobi**, U., Weigmann, H.-J., Ulrich, J., Sterry, W. and Lademann, J. Estimation of the relative stratum corneum amount removed by tape stripping. *Skin research and – Technology*. Vol. 11. 91-96 **(2005)**

**Jalil**, S., Mikhova, B., Taskova, R., Mitova, M., Duddeck, H., Choudhary, M.I., and Atta-ur-Rahman. *In vitro* anti-inflammatory effect of *Carthamus lanatus* L. *Zeitschrift für naturforschung*. Vol. 58 (11-12). 830-832 **(2003)**

**Janjua**, N.R., Kongshoj, B., Andersson, A-M., Wulf, H.C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of European academy of dermatology and Venerology*. Vol.22. 456-461 **(2008)**

**Janjua**, N.R., Mogensen, B., Andersson, A-M., Petersen, J.H., Henriksen, M., Skakkebaek, N.E., Wulf, H.C. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, Octyl-Methoxycinnamate, and 3-(4-Methyl-Benzylidene) Camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *Journal of Investigative Dermatology*. Vol.123. 57-61 **(2004)**

**Janousek**, A. *Regulatory aspects of sunscreens in Europe* issu de "Sunscreens : Development, evaluation and regulatory aspects". Lowe, N., Shaath, N.A., Pathak, M.A. 2<sup>nd</sup> Edition, Cosmetic and Sciences technologies. 215-226 **(1997)**

**Javitt**, J.C. and Taylor, H.R. Cataract and latitude. *Documenta Ophtalmologica*. Vol. 88. 307-325 **(1995)**

**Jemal**, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J. and Thun, M.J. Cancer statistic, 2009. *A Cancer Journal for Clinicians*. Vol. 59. 225-249 **(2009)**

**Jenkins**, G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. Vol. 123. 801-810 **(2002)**

**Jenning**, V., Thünemann, A.F., Gohla, S.H. Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 1999. 167-177 **(2000)**

**Jenning**, V., Mäder, K., Gohla, S.H. Solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a H-NMR study. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 205. 15-21 **(2000 A)**

**Jiang**, R., Hayden, C.G.J., Prankerd, R.J., Robert, M.S., Benson, H.A.E. High-performance liquid chromatographic assay for common sunscreens agents in cosmetic products, bovine serum albumine and human plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*. Vol. 682. 137-145 **(1996)**

**Jiang, R., Roberts, M.S., Collins D.M and Benson H.A.E.** Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*. Vol.48. 635-637 **(1999)**

**Jimenez, M.M., Pelletier, J., Bobin, M.F., Martini., M.C.** Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octylmethoxycinnamate. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 272. 45-55 **(2004)**

**Katsambas, A., Andoniou, Ch., Stratigos, J., Arvanitis, I., Zolota, F., Varotsos, C., Cartalis, C. and Asimakopoulos, D.N.** A simple algorithm for simulating the solar ultraviolet radiation at the earth's surface: an application in determining the minimum erythema dose. *Earth, Moon and Planets*. Vol. 53. 191-204 **(1991)**

**Keck, C.M., Müller, R.H.** Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 62 (1). 3-16 **(2006)**

**Kennedy, C., Bastiaens, M.T., Bajdik, C.D., Willemze, R., Westendorp, R.G.J. and Bavink, N.B.** Effect of smoking and sun on the aging skin. *The Society for Investigative Dermatology*. 548-554 **(2002)**

**Kimbrough, D.R.** The photochemistry of sunscreens. *Journal of Chemical Education*. Vol. 74. 51-53 **(1997)**

**Kipp, J.E.** The role of solid particles technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 295. 269-281 **(2004)**

**Kippax, P.,** Issues in the appraisal of laser diffraction particle sizing techniques, *Pharm. Technol. Eur.* 32-39. **(2005)**

**Kippax** , P., Fracassi, J. Particles size characterisation in nasal sprays and aerosols. Lab Plus International. UK. Février-Mars **(2006)**

**Klein**, K. Sunscreen products: formulation and regulatory considerations. Issu de: Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects. 2ème édition. N.J. Lowe, Shaath, N.A, Pathak, M.A. Ed. Marcel Dekker, New York, USA., Cosmetic Science and technology. Vol.15. 285-312 **(1997)**

**Klein**, K., Steinberg, D. Encyclopedia of UV absorbers. Issu de : Sun products: protection and tanning. Cosmetic and toiletries. Allured Publishing Corporation, USA. 11-62 **(1998)**

**Kompaore**, F., Dupon, C. Marty, J.P. In vivo evaluation on man by two non-invasives methods of the stratum corneum barrier function after physical and chemical modifications. International Journal of Cosmetic Sciences. Vol. 13. 293-302 **(1991)**

**Kullavanijaya**, P. and Lim, H.W. Photoprotection. Journal of the American Academy of Dermatology. Vol.52 (6). 937-958 **(2005)**

**Lademann**, J., Weigmann, H-J., Rickmeyer, C. Barthelmes, H., Scheafer, H., Mueller, G., Sterry, W. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. Skin pharmacology application and skin physiology. Vol.12. 247-256 **(1999)**

**Latonen**,L., Laiho, M. Cellular UV damage responses-Functions of tumor suppressor p53. Biocimica et Biophysica acta. 1755. 71-89 **(2005)**

**Lautenschlager**, S., Wulf, H.C., Pittelkow, M.R. Photoprotection. Lancet. Vol.370. 528-537 **(2007)**

**Lee, M-Y., Lee, N-M., Jung, D., Lee, J-A., Seo, C-S., Lee, H., Kim, J-H., Shin, H-K.** Protective effects of allantoin against ovalbumin (OVA)-induced lung inflammation in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology*. **(2010)**

**Leong, K.H.** Theoretical principles and devices used to generate aerosol for research. *Issue de : Pharmaceutical inhalation aerosol technology*. Second edition. Marcel Dekker edition. New-York, USA. 253-278 **(2004)**

**Leray G.** L'innovation sous haute protection. *Cosmétique magazine n°46*. **(2004)**

**Levy, S.B.** *UV filters* issu de "Handbook of cosmetic science and technology". Barel, A.O., Paye, M., Maibach, H.I. 451-462 **(2001)**

**Liljelind, I.E., Michel, I., Damm, M., Eriksson, K.A.** Development, evaluation and data acquired with a tape-stripping technique for measuring dermal exposure to budesonide at a pharmaceutical manufacturing site. *Annals of Occupational Hygiene*. Vol.51. 407-413 **(2007)**

**Lindal:** <http://www.lindalgroup.com/documents/pdf/dm2501-03-04.pdf> **(2009)**

**Lohman, M.,** Nexbase Polydecene; New safe, soft and Sophisticated Ingredients for cosmetics Formulations. Fortum Oil and Gas OY. Beringen **(1999)**

**Lowe, N.J., Dromgoole, S.H., Sefton, J., Borget, T., Weingarten, D.** Indoor and outdoor efficacy testing of a broad-spectrum sunscreen against ultraviolet A radiation in psoralen-sensitized subjects. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Vol. 17 (2). 224-230 **(1987)**

**Maeda, K., Yokokawa, Y., Hatao, M., Naganuma, M., Tomita, Y.** Comparison of the melanogenesis in human black and light brown melanocytes. *Journal of Dermatological sciences*. Vol. 14. 199-206 **(1997)**

**Mackenzie**, I.C. Ordered structure of the epidermis. The Journal of Investigative Dermatology. Vol. 65. 45-51 **(1975)**

**Mackie**, R.M. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. Progress in Biophysics and Molecular biology. Vol. 92. 92-96 **(2006)**

**Malvern**, Instrument Ltd. Zeta potential measurements. Manual n° MAN0150. United Kingdom. **(2000)**

**Malvy**, D. J.-M., Guinot, C., Preziosi, P., Galan, P., Chapuy, M-C., Maamer, M., Arnaud, S., Meunier, P.J., Hercberg, S. and Tschachler, E. Vol. 71(4) **(2000)**

**Manning**, T. J. and Grow, W.R. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. The Chemical Educator. Vol. 2. N° 1. 1-19 **(1997)**

**Marginean**, L. G., Fructus, A. E., Baillet, A., Bocquet, J-L., Thomas, P., J.P. Marty. Sunscreen's photochemical behaviour: in vivo evaluation by the stripping method. International Journal of Cosmetic Sciences. Vol.19. 87-101 **(1997)**

**Marieb**, E.N. Anatomie et physiologie humaines. Quatrième édition américaine. De Boeck Université. Anjou (Québec). 142-163 **(1999)**

**Martini**, M-C., Anatomie et physiologie de la peau. Issu de : Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. Tec and Dec éd. Médicales internationales éd. Lavoisier. Paris, France. 11-30 **(2003)**

**Martini**, M-C., Pénétration cutanée. Issu de : Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. Tec and Dec éd. Médicales internationales éd. Lavoisier. Paris, France. 31-40 **(2003)**

**Mattorano**, D.A., Kupper, L.L., Nylander-French, L.A. Estimating dermal exposure to jet fuel (naphthalene) using adhesive tape strip samples. *Annals of Occupational Hygiene*. Vol.48. 139-146 **(2004)**

**Matsumura**, Y. and Ananthaswamy, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 195. 298-308 **(2004)**

**Mavon**, A., Miquel, C., Lejeune, O., Payre, B., Moretto, P. In vitro percutaneous absorption and in vivo Stratum Corneum distribution of an organic and a mineral sunscreen. *Skin Pharmacology and Physiology*. Vol.20. 10-20 **(2006)**

**Maziere**, J-C. Histophysiology of skin and cutaneous lipids layers of the epidermis and metabolism of lipids in relation to the hydric barrier function of the skin. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. Vol.4. (4). 258-265 **(1997)**

**Mitchnick**, M. A., Fairhurts, D., Pinnell, S. R. Microfine zinc oxide (Z-Cote) as a photostable UVA/UVB sunblock agent. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Vol. 40. 85-90 **(1999)**

**Mehnert**, W., Mäder, K. Solid lipid nanoparticles : production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Vol. 47. 165-196 **(2001)**

**Meunier**, L. Photoprotection de l'enfant et de l'adolescent - Photoprotection in children and teenagers. *Journal de pédiatrie et de puériculture*. Vol. 22. 19-22 **(2009)**

**Merck**. Rona. *Ronacare<sup>TM</sup> Ectoin : The cell protection factor*. Merck KGaA, Darmstadt, Germany. **(2001)**

**Merck**. Document interne. *Eusolex UV Pearl : Sunglasses for the skin*. Merck. Germany **(2006)**

**Mongiati, S., Herzog, B., Dehayes, C., König, P., Osterwalder, U.** BEMT: an efficient broad-spectrum UV filter. *Cosmetics and toiletries magazine*. Vol. 118 (2). 1-5 **(2003)**

**Moniteur Belge.** Lois, décrets, ordonnances et règlements. Ministère des affaires sociales, de la santé publique et de l'environnement. Arrêté royal du 15 octobre 1997 relatif aux produits cosmétiques. p.1046 **(1998)**

**Mortensen, L.J., Oberdörster, G., Pentland, A.P., and DeLouise, L.A.** In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model : the effect of UVR. *Nano Lett.* Vol. 8(9). 2779-2787 **(2008)**

**Mourtzinou, I., Konteles, S., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T.** Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry*. Vol. 114. 791-797 **(2009)**

**Muguet, V.** Agents de texture hydrophiles. Issu de : Actifs et additifs en cosmétologie. 3<sup>ème</sup> édition. M-C. Martini et M.Seiller, coord. Lavoisier édition. Mouguerre, France. 956-993 **(2006)**

**Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S.** Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 50. 161-177 **(2000)**

**Müller, R.H., Jacobs, C., Kayser, O.** Nanosuspension as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Review*. Vol. 47 (1) 3-19 **(2001)**

**Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A.** Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Review*. Vol. 54 Suppl. S131-S155 **(2002)**

**Murphy, E.G.** *Regulatory aspects of sunscreens in the United States.* issu de "Sunscreens : Development, evaluation and regulatory aspects". Lowe, N., Shaath, N.A., Pathak, M.A. 2<sup>nd</sup> Edition, Cosmetic and Sciences technologies. 201-214 **(1997)**

**Napolitano, A.** Di Donato, P., Prota, G. New regulatory mechanisms in the biosynthesis of pheomelanins: rearrangement vs. Redox exchange reaction routes of a transient 2*H*-1,4-benzothiazine-*o*-quinonimine intermediate. *Biochimica et Biophysica Acta.* 47-54 **(2000)**

**Nohynek, G.J.** and Schaefer, H. Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* Vol. 33. 285-299 **(2001)**

**Ortonne, J-P.** Photoprotective properties of skin melanin. *British Journal of Dermatology.* Vol. 146. 7-10 **(2002)**

**Otley, C.C.,** Non-melanoma skin cancer: past, present, and future. *Current Problems in Dermatology.* 109-113 **(2001)**

**Nole, G.** and Johnson, A.W. An analysis of cumulative lifetime solar ultraviolet radiation exposure and the benefits of daily sun protection. *Dermatologic Therapy.* Vol. 17. 57-62 **(2004)**

**Nohynek, G.J.,** Dufour, E.K., Roberts, M.S. Nanotechnology, cosmetics an the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacology and Physiology.* Vol. 21. 136-149 **(2008)**

**Pardeike, J.,** Hommoss, A., Müller, R.H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics.* Vol. 366. 170-184 **(2009)**

**Pattanaargson, S.,** Munhapol, T., Hirunsupachot, P., Luangthongaram, P. Photoisomeization of octyl methoxycinnamate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* Vol. 161. 269-274 **(2004)**

**Pattanaargson, S.,** Limphong, P., Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product. International Journal of Cosmetic Sciences. Vol. 23. 153-160 **(2001)**

**Peau:** <http://www.deodorant-tpe.com/accueil/peau> **(2009)**

**Pershing, L.K.,** Nelson, J.L., Corlett, J.L., Shrivastava, S.P., Hare, D.B., and Shah, V.P. Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. Journal of the American Academy of Dermatology. Vol. 48. 740-751 **(2003)**

**Persson, A.E.,** Edstrom, D.W., Backvall, H., Lundeberg, J., Ponten, F., Ros, A.M., Williams, C. The mutagenic effect of ultraviolet-A on human skin demonstrated by sequencing the p53 gene in single keratinocytes. Photodermatology Photoimmunology and Photomedecine. Vol.18. 22-32 **(2002)**

**Pflücker, F.,** Hohenberg, H., Hölzle, E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., Diembeck, W., Wenck, H., Gers-Barlag, H. The outermost stratum corneum layer is an effective barrier against dermal uptake of topically applied micronized titanium dioxide. International Journal of Cosmetic Science. Vol. 21. 399-411 **(1999)**

**Pflücker, F.,** Wendel, V., Hohenberg, H., Gärtner, E., Will, T., Pfeiffer, S., Wepf, R., Gers-Barmag, H. The human stratum corneum layer an effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronized titanium dioxide. Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology. Vol. 41. 92-97 **(2001)**

**Philippe, R.,** Cotte, S. Programme de prévention du mélanome : le « mode d'emploi du soleil » pendant les vacances d'hiver. Institut National du Cancer. Dossier de presse. **(2006)**

**Photoprotection:**<http://photoprotection.clinuvel.com/photodermatology-photobiology> **(2009)**

**Potard, G.,** Laugel, A., Baillet, H., Schaefer, H., Marty, J-P. Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous studies. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 189. 249-260 **(1999)**

**Poon, T.S.C,** Barnetson, R.St.C., Halliday, G.M. Prevention of immunosuppression by sunscreens in humans is unrelated to protection from erythema and dependant on protection from ultraviolet A in the face of constant ultraviolet B protection. Journal of Investigative Dermatology. Vol. 121. 184-190 **(2003)**

**Pourzand, C.,** Watkin, R.D., Brown, W.E and Tyrell, R.M. Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts: The role of ferritin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 96. 6751-6756 **(1999)**

**Popov, A.P.,** Prezzhev, A.V., Lademann, J. and Myllylä, R. TiO<sub>2</sub> nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens. Journal of Physics D: Applied Physics. Vol. 38. 2564-2570 **(2005)**

**Pubchem:** <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary.cgi?cid=13381> **(2009)**

**Puech-Plottova, I.,** Michel, J.L., Misery, L., Cambazard, F. Photodermatoses et photoprotection de l'enfant. Archives de Pédiatrie. Vol. 7. 668-679 **(2000)**

**Qiu, D.,** Tanaka, S., International comparisons of cumulative risk of skin cancer, from cancer incidence in five continents Vol. III. Japanese Journal of Clinical Oncology. Vol. 36 (8). 533-534 **(2006)**

**Ravanat, J-L.,** Douki, T., Cadet, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 63. 88-102 **(2001)**

**Rawle, A.** Basic principles of particle size analysis. Malvern Instruments Limited. Worcestershire, UK. **(2006)**

**Rawlings, A.V.**, Ethnic skin types: are there differences in skin structure and function. International Journal of Cosmetic Science. Vol. 28. 79-93 **(2006)**

**Rieger, M.M.** Aerosol Technology. Issu de *Harry's Cosmetology*. 8ème edition. Chemical Publishing, Co., Inc. New-York, N.Y. 333-347 **(2000)**

**Rieger, M.M.** The manufacture of cosmetics. Issu de *Harry's Cosmetology*. 8ème edition. Chemical Publishing, Co., Inc. New-York, N.Y. 787-874 **(2000 A)**

**Roberts, L.K.**, Beasley, D.G., Learn, D.B., Giddens, L.D., Beard, J. and Stanfield, J.W. Ultraviolet spectral energy differences affect the ability of sunscreen lotions to prevent ultraviolet-radiation-induced immunosuppression. Photochemistry and Photobiology. Vol. 63 (6). 874-884 **(1996)**

**Rosalam, S.**, England, R. Review of xanthum gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. Enzyme and Microbial Technology. Vol., 39 (2) 197-207 **(2006)**

**Rosen, C.F.** Photoprotection. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery. Vol. 18. No 4. 307-314 **(1999)**

**Sakai, H.**, Ito, E., Cai, R., Yoshioka, T. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration change of T24 cell under irradiation in the presence of  $\text{TiO}_2$  ultrafine particles. Biochimica et Biophysica acta. Vol. 1201. 259-265 **(1994)**

**Sanders, P.A.** Propellants an solvents. Issu de The science an technology of aerosol packaging. Edited by Sciarra, J.J. and Stoller, L. John Wiley and sons, Inc. New-York. USA. 97-149 **(1974)**

**SCCP** (Scientific Committee on Consumer Products) (1147/07). European commission. Safety of nanomaterials in cosmetic products. EC, Brussels, Belgium. **(2007)**

**Schaefer**, H., Moyal, D., Fourtanier, A. State of the art sunscreens for prevention of photodermatoses. Journal of Dermatological Sciences. Vol. 23. 62-74 **(2000)**

**Schakel**, D.J., Kalsbeek, D., Boer, K. Determination of sixteen UV filters in sun care formulations by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A. Vol. 1049. 127-130 **(2004)**

**Schulz**, J., Hohenberg, H., Pflücker, F., Gärtner, E., Will, T., Pfeiffer, T., Wepf, R., Wendel, V., Gers-Barlag, Wittern, K.-P. Distribution of sunscreens on skin. Advanced Drug Delivery reviews. Vol. 54 Suppl.1 S157-S163 **(2002)**

**Sciarra**, J.J. Physicochemical aspects of aerosol sciences and technology. Issu de Issu de The science an technology of aerosol packaging. Edited by Sciarra, J.J. and Stoller, L. John Wiley and sons, Inc. New-York. USA. 65-96 **(1974)**

**SEHSC**, Silicones Environmental, Health and Safety Council of North America. Guidance for Aerosol Applications of Silicone-Based Materials. Canada. **(2001)**

**Seu-Salerno**, M. Pigments traits. Issu de : Actifs et additis en cosmétologie. 3<sup>ème</sup> édition. Tec et doc ed. Lavoisier, Paris, France. 905-936 **(2006)**

**Shaath**, NA, Klein, K., and Steinberg, D. Encyclopedia. Issu de : Sun products: protection and tanning. Cosmetics and Toiletries. Allured Publishing corporation. USA 30-61 **(1998)**

**Sharon**. Paraben Salts. Sharon Laboratories Ltd. Ashod Israel. **(1998)**

**Shaw, D.T.** Introduction to colloidal and interface science. Butterworth Hienmann, Oxford, 4<sup>th</sup> Edition. **(1992)**

**Simeoni, S.,** Tursilli, R., Bianci, A., Scalia, S. Assay of common sunscreen agents in suncare products by high-performance liquid chromatography on a cyanopropyl-bonded silica column. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. Vol.38. 250-255 **(2005)**

**Skyberg, K.,** Skaug, V., Gylseth, B., Pedersen, J.R. and Iversen, O.H. Subacute inhalation toxicity of mineral oils, C<sub>15</sub>-C<sub>20</sub> Alkylbenzenes, and polybutene in male rats. Environmental Research. Vol. 53 (1). 48-61 **(1990)**

**Smyniotakis, C.G.,** Archontaki, H.A. Development and validation of a non-aqueous reversed phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of four chemical UV filters in suncare formulation. Journal of Chromatography A. Vol. 1031. 319-324 **(2004)**

**Smith, D.C.,** Garcia-Contreras, L., Cooney, D.J., Garmise, R.J., Jones, L.D., Hickey, A.J. Medical and pharmaceutical aerosols. Issu de: Aerosol handbook:Measurment, Dosimetry and Health effects. Edited by Lev. Skuzer and N.H. Harley. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. 265-280 **(2005)**

**Spickard, A.** and Hirshmann, J.V. Exogenous lipoid pneumonia. Archives of Internal Medecine. Vol. 154 (6). 686-692 **(1994)**

**Tadros, T.F.** Interraction between oil or water droplets containing an adsorbed polymeric surfactant-Steric stabilization. Issu de: Coolids in agrochemicals. Volume 5. Colloids and Interface Sciences Series. Wiley-VCH ed. 225-231 **(2009)**

**Tarras-Wahlberg, N.,** Stenhagen, G., Latko, O., Rosen, A., Wennberg, A.M., Wennerstrom, O. Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. Journal of Investigative Dermatology. Vol. 113. 548-553 **(1999)**

**Teichman, 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. *Journal of Investigative Dermatology*. Vol. 125. 264-269 **(2005)**

**Thomas, L.,** Cochran, AJ. Prise en charge du melanome cutané. *Cancer/Radiothérapie*. Vol.2. 732-746 **(1998)**

**Thompson, S.C.,** Jolley, D. and Marks, R. Reduction of solar keratose by regular sunscreen use. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 329. 1147-1151 **(1993)**

**Tortora, G.J.,** Grabowski, S.R., Le système tégumentaire *dans* Principes d'anatomie et de physiologie. Troisième édition française. De Boeck Université. Anjou (Québec). 148-169 **(2001)**

**Touitou, E.,** Meidan V.M., Horwitz E. Method for quantitative determination of drug localized in the skin. *Journal of controlled release*. Vol.56. 7-21 **(1998)**

**Trakatelli, M.,** Ulrich, C., del Marmol, V., Euvard, S., Stockfleth, E. and Abeni, D. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions. *British Journal of dermatology*. Vol. 156. 1-7 **(2007)**

**Tran, M.L.,** Powell, B.J., Meredith, P. Chemical and structural disorder in eumelanin: a possible explanation for broadband absorbance. *Biophysical Journal*. Vol. 90. 743-752 **(2006)**

**Trautinger, F.** Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology*. Vol. 26. 573-577 **(2001)**

**Treffel, P.** and Gabard, B. Skin penetration and sun protection factor of Ultra-violet filters from two vehicles. *Pharmaceutical research*. Vol.13. 770-774 **(1996)**

**Tsukahara, K.,** Moriwaki, S., Hotta, M., Fujimura, T., Sugiyama-Nakagiri, Y., Sugawara, S., Kitahara, T. and Takema, Y. The effect of sunscreen on skin elastase activity induced by ultraviolet-A irradiation. *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 28 (12). 2302-2307 **(2005)**

**Uniqema.** Suncare Seminar. 9<sup>th</sup> March 2006, Bruxelles, Belgique **(2006)**

**Urbach, F.,** Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 40. 3-7 **(1997)**

**Urbach, F.** The historical aspects of sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol. 64. 99-104 **(2001)**

**Urzua, A.** Secondary metabolites in the epicuticle of *Haplopappus Foliosus* DC. (Asteraceae). *Journal of the Chilean Chemical Society*. Vol. 49 (N 2). 137-141 **(2004)**

**UVA action:** <http://www.tetrahedron.fr/page4/page8/photoprotection.htm> **(2009)**

**Van Betteray-Kortekaas, A.M.G.,** Vos, G. Determination of titanium in milk powders by ICP-AES. *Fresenius Z Anal Chem*. Vol. 323. 493-494 **(1986)**

**Varvaresou, A.** Percutaneous absorption of organic sunscreens. *Journal of cosmetic dermatology*. Vol.5. 53-57 **(2006)**

**Verschooten, L.,** Declercq, L., and Garmyn, M. Adaptive response of the skin to UVB damage: role of the p53 protein. *International Journal of Cosmetic Science*. Vol. 28. 1-7 **(2006)**

**Vettor**, M., Perugini, P., Scallia, S., Conti, B., Genta, I., Modena, T., Pavanetto, F. Poly (D,L-lactide) nanoencapsulation to reduce photoinactivation of a sunscreen agent. International Journal of Cosmetic Sciences. Vol. 30. 219-227 **(2008)**

**Villalobos-Hernandez**, J.R., Müller-Goyman, C.C. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: the synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale. International Journal of Pharmaceutics. Vol. 322. 161-170 **(2006)**

**Wacker:**<http://www.wacker.com/cms/en/products.product.jsp?product=10511>  
**(2009)**

**Walters**, K.A., Roberts, M.S. The structure and function of skin. Dermatological and transdermal formulations. Drugs and the Pharmaceutical sciences. 119. K.A. Walters. Marcel Dekker. New-York. **(2002)**

**Wamer**, W.G., Yin, J.-J. and Wei, R.R. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. Free Radical Biology and Medicine. Vol. 23. 851-858 **(1997)**

**Wang**, T., Kasichayanula, S., Gu, X. In vitro permeation of repellent DEET and sunscreen oxybenzone across three artificial membranes. International journal of pharmaceutics. Vol. 310. 110-117 **(2006)**

**Weigmann**, H.J., Lademann, J., Meffert, H., Schaefer, H., Sterry, W. Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. Skin Pharmacology and applied Skin Physiology. Vol.37. 185-187 **(1999)**

**Westerdahl**, J., Ingvar, C., Masback, A., Olsson, H. Sunscreen use and malignant melanoma. International Journal of Cancer. Vol. 87. 145-150 **(2000)**

**Wissing, S.A., Müller, R.H.,** A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. *International Journal of Cosmetic Sciences*. Vol. 23. 233-243 **(2001)**

**Wissing, S.A., Müller, R.H.** The development of an improved carrier system for sunscreen formulations. *International Journal of Cosmetic Sciences*. Vol. 242. 373-375 **(2002)**

**Wissing, S.A., Müller, R.H.** Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration . *Journal of Controlled Release*. Vol. 81. 225-233 **(2002 A)**

**Wissing, S.A., Müller, R.H.** Cosmetic application for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 254. 65-68 **(2003)**

**Whiteman, D.C., Valery, P., McWhirter, W. and Green, A.C.** Risk factors for childhood melanoma in Queensland, Australia. *International Journal of Cancer*. Vol. 70. 26-31 **(1997)**

**Wolf, R., Wolf, D., Morganti, P., Ruocco, V.** Sunscreens. *Clinics in Dermatology*. Vol. 19. 452-459 **(2001 A)**

**Wolf, R., Tüzün, B. and Tüzün, Y.** Sunscreens. *Dermatologic Therapy*. Vol. 14. 208-214 **(2001 B)**

**Xia, Q., Saupe, A., Müller, R.H., Souto, E.B.** Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations. *International Journal of Cosmetic Sciences*. Vol.29. 473-482 **(2007)**

**Yener, G., Incegül, T., Yener, N.** Importance of using solid lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. *International Journal of pharmaceutics*. Vol. 258. 203-207 **(2003)**

**Yoshioka, S.** Ishihara, Y., Terazono, T., Tsunakawa, N., Murai, M., Yasuda, T., Kitamura, Y. Kunihiro, Y., Sakai, K., Hirose, Y., Tonooka, K., Takayama, K., Imai, F., Godo, M., Matsuo, M., Nakamura, K., Aso, Y., Kojima, S., Takeda Y., and Terao, T. Quinine actinometry as a method for calibrating ultraviolet radiation intensity in light-stability testing of pharmaceuticals. *Drug Dev Ind Pharm.* 20 (13). 2049-2062 **(2004)**

**Young, A. R.,** Sheehan, J.M., Chadwick, C.A., Potten, C.S. Protection by ultraviolet A and B sunscreens against *In situ* dipyrimidine photolesions in human epidermis is comparable to protection against sunburn. *The Journal of investigative Dermatology.* Vol.115. 37-41 **(2000)**

**Zanen, P.,** Go, L.T., Lammers, J.W. The optimal particle-size for beta adrenergic aerosols in mild asthmatics. *Inyernational journal of Pharmaceutics.* Vol 107. 211-217 **(1994)**

**Zanen, P.,** Go, L.T., Lammers, J.W. Optimal particle size for beta 2 agonist and anticholinergic aerosols in patients with severe airflow obstruction. *Thorax.* Vol. 5(10). 977-980 **(1996)**

## **VIII. Annexes**

## VIII. Annexes

### VIII.1 Liste des filtres UV qui peuvent entrer dans la composition des produits cosmétiques

#### Annex VII (Part 1)

List of permitted UV filters which cosmetic products may contain

| Reference No | Substance   | Maximum authorized concentration | Other limitations and requirements | Conditions of use and warnings which must be printed on the label |
|--------------|---|----------------------------------|------------------------------------|---|
| a            | b   | c                                | d                                  | e   |
| 2            | N,N,N-Trimethyl-4-(2-oxoborn-3-ylidenemethyl) anilinium methyl sulphate   | 6%                               |                                    |   |
| 3            | Homosalate (INN)  | 10%                              |                                    |   |
| 4            | Oxybenzone (INN)  | 10%                              |                                    | Contains oxybenzone (1)   |
| 6            | 2-Phenylbenzimidazole-5-sulphonic acid and its potassium, sodium and triethanolamine salts  | 8% (expressed as acid)           |                                    |   |
| 7            | 3,3'-(1,4-Phenylenedimethylene) bis (7,7-dimethyl-2-oxobicyclo-[2,2,1] hept-1-ylmethanesulphonic acid) and its salts  | 10% (expressed as acid)          |                                    |   |
| 8            | 1-(4-tert-Butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl) propane-1,3-dione  | 5%                               |                                    |   |
| 9            | alpha-(2-Oxoborn-3-ylidene) toluene-4-sulphonic acid and its salts  | 6% (expressed as acid)           |                                    |   |
| 10           | 2-Cyano-3,3-diphenyl acrylic acid, 2-ethylhexyl ester (Octocrylene)   | 10% (expressed as acid)          |                                    |   |
| 11           | Polymer of N-((2 and 4)-[2-oxoborn-3-ylidene)methyl]benzyl)acrylamide   | 6%                               |                                    |   |
| 12           | Octyl methoxycinnamate  | 10%                              |                                    |   |
| 13           | Ethoxylated Ethyl-4-Aminobenzoate (PEG-25 PABA)   | 10%                              |                                    |   |
| 14           | Isopentyl-4-methoxycinnamate (Isoamyl p-Methoxycinnamate)   | 10%                              |                                    |   |
| 15           | 2,4,6-Trianiino-(p-carbo-2'-ethylhexyl-1'-oxy)-1,3,5-triazine (Octyl Triazone)  | 5%                               |                                    |   |
| 16           | Phenol, 2-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4-Methyl-6-(2-Methyl-3-(1,3,3,3-Tetramethyl-1-(Trimethylsilyl)Oxy)-Disiloxanyl)Propyl (Drometrizole Trisiloxane)                 | 15%                              |                                    |   |
| 17           | Benzoic acid, 4,4-[[6-[[[1,1-dimethylethyl)amino]carbonyl]phenyl]amino]-1,3,5-triazine-2,4-diyl]ditrimino}bis-, bis(2-ethylhexyl)ester}                           | 10%                              |                                    |   |
| 18           | 3-(4'-Methylbenzylidene)-dl-camphor (4-Methylbenzylidene Camphor)   | 4%                               |                                    |   |
| 19           | 3-Benzylidene camphor (3-Benzylidene Camphor)   | 2%                               |                                    |   |
| 20           | 2-Ethylhexyl salicylate (Octyl-salicylate)  | 5%                               |                                    |   |
| 21           | 4-Dimethylaminobenzoate of ethyl-2-hexyl (octyl dimethyl PABA)  | 8%                               |                                    |   |
| 22           | 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone-5-sulfonic acid (Benzophenone-5) and its sodium salt  | 5% (of acid)                     |                                    |   |
| 23           | 2,2'-Methylene-bis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(tetramethyl-butyl)-1,1,3,3-phenol); 2,2'-Methylenebis(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol) | 10%                              |                                    |   |
| 24           | Monosodium salt of 2,2'-(1,4-Phenylene)bis-1H-benzimidazole-4,6-disulphonic acid  | 10% (of acid)                    |                                    |   |
| 25           | (1,3,5)-Triazine-2,4-bis-((4-(2-ethyl-hexyloxy)-2-hydroxy-phenyl)-6-(4-methoxyphenyl))  | 10%                              |                                    |   |
| 26           | Dimethyldiethylbenzalmalonate (Cas No 207574-74-1)  | 10%                              |                                    |   |
| 27           | Titanium dioxide  | 25%                              |                                    |   |
| 28           | Benzoic acid, 2-[[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-Hexylester. (INCI name: Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate) CAS No 302776-68-7                       | 10%                              |                                    |   |

#### PREAMBLE

For purposes of this Directive, UV filters are substances which, contained in cosmetic sun-screen products, are specifically intended to filter certain UV rays in order to protect the skin from certain harmful effects of these rays. These UV filters may be added to other cosmetic products within the limits and under the conditions laid down in this Annex. Other UV filters used in cosmetic products solely for the purpose of protecting the product against UV rays are not included in this list.

#### NOTES

(1) Not required if concentration is 0.5% or less and when it is used only for product protection purposes

## **VIII.2 Principaux documents relatifs à l'étude *in vitro***

### **VIII.2.1 Demande d'avis au Comité d'Ethique**

- 1 Titre et Résumé du projet (justification, objectifs, recrutement, méthodologie, etc.)  
NE PAS DEBORDER LA PAGE 1 du présent formulaire, caractère 11, interligne simple

Titre :

Evaluation, ex-vivo, de la pénétration cutanée de produits de protection solaires conditionnés en aérosols.

Résumé :

Cette étude a pour but d'estimer l'absorption dermique et la pénétration percutanée des composés chimiques, et notamment des filtres UV organiques et inorganiques contenus dans des produits de protection solaire conditionnés sous forme d'aérosol.

Ces études ex-vivo vont révéler le potentiel de pénétration des substances, contrairement aux études in vivo qui indiquent la pénétration réelle des composés chimiques à travers la peau.

D'après le 7ème amendement de la Directive des produits cosmétiques (L66/26-35), les tests sur animaux pour les produits cosmétiques doivent être bannis pour 2009. Des méthodes alternatives aux tests in vivo sur animaux doivent donc être mises au point.

Le produit à tester est appliqué sur la surface intacte d'un disque de membrane, constituée de peau humaine excisée, positionnée entre une chambre supérieure et une chambre inférieure d'une cellule de diffusion (Cellule de Franz). L'échantillon à tester reste en contact avec la membrane du compartiment donneur pendant une période définie en fonction de l'usage du produit à tester. Des échantillons seront prélevés du compartiment récepteur à des temps déterminés à l'avance afin de pouvoir établir un profil de pénétration. La membrane et/ou les fluides sont analysés par des méthodes appropriées, afin de quantifier le passage éventuel des substances à travers la peau. Les méthodes de chromatographie liquide haute performance et de spectrométrie d'absorption atomique seront utilisées dans ce but.

Les échantillons de peau sont prélevés à partir de résidus opératoires provenant de chirurgie plastique. Ils doivent provenir, de préférence, de sujets de type caucasien, âgés entre 18 et 40 ans.

Ils peuvent être obtenus à partir de divers sites anatomiques dont l'abdomen après réduction chirurgicale de celui-ci. La peau doit être récoltée le plus vite possible. Les échantillons sont rapidement observés pour constater d'éventuelles altérations dues aux opérations chirurgicales. Pour le transport des échantillons de l'hôpital vers les laboratoires, la peau peut être conservée dans un pot stérile et dans un container isotherme dont la température n'excède pas les 4°C. Dans le laboratoire, tous les échantillons doivent être identifiés et la couche sous-cutanée grasseuse est enlevée. Les échantillons sont ensuite conservés dans des sacs plastics sellés puis stockés à -20°C jusqu'à utilisation. La durée du stockage est de maximum 6 mois.

### **Questions Administratives**

2 N° EudraCT :

N° CCB :

Référence CE-Erasme :

Fin présumée étude (mm/aaaa): 12/2008

### **3: Investigateur principal :**

Pour cocher une case, double-clic et choisir case activée

Interne à l'institution :

Médecin :

Externe à l'institution :

Autre (spécifiez) : Institut de Pharmacie ULB

Nom, Prénom : Durand Laurence

Service : Pharmacie galénique et Biopharmacie

Dénomination de l'institution ou l'étude sera conduite : Institut de pharmacie

Adresse : Campus de la plaine. Bd du triomphe accès 2. CP 207. 1050 Ixelles

#### **4 : Type d'étude :**

~ étude qui ne tombe pas sous l'application de la loi du 7 mai 2004

- étude rétrospective
- étude sur surplus matériel biologique humain
- étude sur embryon
- étude psychologique

~ étude tombant sous l'application de la loi du 7 mai 2004

- étude interventionnelle
- étude observationnelle (non-interventionnelle)

#### **5 : Promoteur de l'étude :**

- étude non commerciale ou académique  
origine promoteur
  - Hôpital Erasme
  - Association scientifique
  - Faculté de Médecine – ULB
  - ISEPK – ULB
  - Faculté de Psychologie - ULB
  - Autre ; spécifiez : Institut de Pharmacie-ULB
- étude commerciale ou non académique  
promoteur industriel

#### **6 : Etude Mono / Multicentrique :**

- monocentrique
- multicentrique comité dirigeant
- multicentrique comité non dirigeant

#### **7 : Discipline dont relève l'étude (une seule réponse) :**

- |  |  |   |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Chirurgie               | <input type="checkbox"/> Psychiatrie             | <input type="checkbox"/> Soins intensifs  |
| <input type="checkbox"/> Médecine interne        | <input type="checkbox"/> Oncologie radiothérapie | <input type="checkbox"/> Soins palliatifs |
| <input type="checkbox"/> Gynécologie/obstétrique | <input type="checkbox"/> Biologie clinique       | <input type="checkbox"/> Soins infirmiers |
| <input type="checkbox"/> Pédiatrie               | <input type="checkbox"/> Bactério/virologie      |   |

Autre ; spécifiez Dermatologie

#### **8 : Etude portant sur un médicament (une seule réponse) :** Phase 1

Phase 2

Phase 3

Phase 4

Autre; spécifiez :

Bioéquivalence/pharmacocinétique

Pharmaco-vigilance

Pharmaco-économie

Usage compassionnel

#### **9 : Etude ne portant pas sur un médicament (une seule réponse) :** Appareillage médical / prothèse

Etude diagnostique

Physiologie / Physiopathologie

Etude psychologique

Etude sociologique

Etude épidémiologique

Autre ; spécifiez  Etude de diffusion transcutanée de filtres UV contenus dans des produits de protection solaire

**10 : Choix des sujets (plusieurs réponses possibles):**

- Adultes capables d'exprimer leur volonté
- Adultes incapables d'exprimer leur volonté
- Mineurs
- Situation d'urgence
- Femmes gravides ou susceptibles de le devenir pendant l'étude
- Femmes allaitant
- Nombre de sujets :
- Affection
- Age :
- Sexe :

**11 : Notification de l'étude à la Direction de l'institution :**

- OUI
- NON / sans objet
- Pour quelle raison ?
- Sans Objet

**12 : Assurance :**

- Attestation jointe :
- Démarche en cours :
- Sans objet :

Si sans objet, pour quelle raison : L'étude étant réalisée sur des résidus opératoires, le patient ne court aucun risque pendant l'étude.

**13 : Le dossier** de chaque patient entrant dans l'étude contiendra-t-il à la rubrique "Recherche clinique" :

- un court résumé de l'étude en cours :  
OUI   
NON
- le lieu de dépôt du protocole complet :  
OUI   
NON

**Considérations éthiques**

**14** Fondements / background de l'étude proposée.

L'étude ex-vivo permet de ne pas utiliser de volontaires humains et ne pas réaliser d'expérimentation animale. Cette dernière étant bannie à partir de 2009 pour tous les produits cosmétiques.

**15** Question / Hypothèse principale de l'étude proposée (si utile, hypothèses secondaires)

Les filtres UV utilisés dans les produits de protection solaire fabriqués dans nos laboratoires passent-ils la barrière cutanée ? Et si oui, les quantités qui passent sont-elles acceptables ?

**16** Si le projet évalue une substance pharmacologique (essai clinique), brève description de la nature chimique et de l'action pharmacologique.

Non applicable

**17** Description de la méthodologie de l'étude et dans le cadre d'un essai clinique, mise en évidence des différences par rapport à la prise en charge thérapeutique standard (Liste des actes requis exclusivement par l'étude y compris nature, fréquence et volume des prélèvements effectués)

**a) Préparation des échantillons de peau humaine excisée:**

Les échantillons de peau sont prélevés à partir de résidus opératoires provenant de chirurgie plastique. Ils peuvent être obtenus à partir de divers sites anatomiques dont l'abdomen après réduction chirurgicale de celui-ci. La peau doit être récoltée le plus vite possible. Les échantillons sont rapidement observés pour constater d'éventuelles altérations dues aux opérations chirurgicales. Pour le transport des échantillons de l'hôpital vers les laboratoires, la peau peut être conservée dans un pot stérile et dans un container isotherme dont la température n'excède pas les 4°C. Dans le laboratoire, tous les échantillons doivent être identifiés et la couche sous-cutanée grasseuse est

enlevée. Les échantillons sont ensuite conservés dans des sacs plastiques sellés puis stockés à -20°C jusqu'à utilisation. La durée du stockage est de maximum 6 mois.

Au moment des tests, des cercles d'échantillons de peau d'une taille supérieure à l'aire de la cellule de Franz sont découpés.

b) Préparation de la cellule de diffusion :

- Température du liquide de thermostatisation: 37°C. En effet, elle représente la température corporelle qui permet d'obtenir la température cutanée qui atteint les 32°C.
- Fluide récepteur : il doit être proche des conditions physiologiques mais ne doit pas être le facteur limitant de diffusion et donc les composés chimiques à tester doivent être solubles dedans.

Il est composé de : 0.9% de NaCl

0.1% de gentamycine (pour prévenir les contaminations éventuelles)

Tampon phosphate pour ramener le pH à 7.4

1% d'albumine de sérum de bovin (ce qui permet d'augmenter la solubilité

des substances liposolubles)

- Aire de la membrane : 1 à 2 cm<sup>2</sup>
- Nombre de membranes utilisées par test : 3 (triplicate)
- Nombre de donneurs : 3 par test maximum à cause des variations interindividuelles.
- Quantité de produit appliqué par test : 2 mg/cm<sup>2</sup> (quantité qui correspond à celle utilisée pour la mesure du Facteur de Protection Solaire)

Agitation du fluide récepteur : avec un barreau magnétique à 500 rpm

L'échantillon de peau est placé comme une barrière entre les deux moitiés de la cellule de diffusion, le stratum corneum faisant face au compartiment donneur, qui est à l'air libre (condition non occlusive). La chambre réceptrice est remplie par le fluide récepteur, fermée et thermostatisée à 37°C pendant 1h avant le début de l'expérimentation.

c) Application du produit sur la membrane (peau) :

La dose de produit appliquée est de 2 mg/cm<sup>2</sup>. Celle-ci est prélevée à l'aide d'une seringue (à cause de la faible viscosité du produit). Puis elle est étalée sur la peau à l'aide d'une spatule spéciale pour cet effet (qui est pesée avant et après l'application du produit pour réajuster la quantité du produit).

d) Expérimentation et prélèvement des échantillons de produits à analyser :

L'expérimentation débute immédiatement après l'application du produit

La durée du test est de 8h. (Temps d'exposition au soleil maximal estimé sur une journée)

Application du produit : toutes les 2h (dose d'utilisation préconisée lors de l'utilisation de produits solaires)

Prélèvement des échantillons : toutes les 30mn (afin de déterminer le profil de pénétration cutanée éventuelle)

Quantité prélevée : 0.5ml, à chaque fois remplacée par la même quantité de solution du fluide récepteur.

e) Analyse des échantillons :

Les échantillons sont ensuite analysés par HPLC , couplée à la spectro UV, pour doser les filtres organiques qui ont éventuellement passé la barrière cutanée, puis par SAA pour doser les filtres inorganiques.

Les droites d'étalonnages pour chaque filtre doivent être établies à l'avance.

Le blanc utilisé est la solution du fluide récepteur.

f) Présentation des résultats :

Sous forme de courbe représentant le pourcentage de filtre UV passant la barrière cutanée en fonction du temps.

**18** Description des mesures prises pour que le participant soit informé des actes exclusivement requis par l'étude, des dispositions prises pour que ces actes ne soient facturés ni au participant, ni à l'INAMI.

Non applicable

**19** Bénéfices éventuels pour les participants. (Présenter les bénéfices attendus soit pour le participant, soit en terme de meilleure connaissance de phénomènes physiopathologiques)

Non applicable

- 20** Evaluation des risques prévisibles liés au traitement et/ou aux procédures de l'étude (douleur, inconfort, manipulations invasives et moyens mis en oeuvre pour réduire ces risques et prendre en charge les éventuels effets indésirables en cours de procédure / en dehors des procédures, contact possible avec l'investigateur, ...)  
Non applicable
- 21** Présenter **votre propre** évaluation de la balance risques/bénéfices.  
Non applicable
- 22** S'il s'agit d'un essai clinique, plan de traitement et prise en charge des soins après l'arrêt de la participation à l'étude du participant (qui en assure la responsabilité ?)  
Non applicable
- 23** Critères d'arrêt ou d'interruption prématurée de l'étude sur le site / en règle générale.  
Non applicable
- 24** Expérience précédente de l'investigateur / du site dans la conduite de ce type d'étude.  
Non applicable
- 25** Description de la procédure de recrutement (y compris le matériel utilisé).  
Planning opératoire de chirurgie plastique, critères d'inclusion du protocole, accord du chirurgien
- 26** Description de la procédure d'information et d'obtention du consentement éclairé du participant ou du représentant légal (qui donnera l'information et quand, nécessité d'un représentant légal, d'un témoin, etc.).  
Informations présentées par le chirurgien ou le doctorant
- 27** S'il y a lieu, exposer les raisons pour lesquelles des participants de groupes vulnérables sont sollicités comme des mineurs, des sujets temporairement ou définitivement incapables.  
Non applicable
- 28** Description de la relation entre participant et investigateur (patient - médecin, étudiant – enseignant, etc.)  
Non applicable
- 29** Procédures locales pour éviter que le participant ne soit impliqué simultanément dans plusieurs études ou pour vérifier qu'un temps suffisant ce soit écoulé entre 2 participations à des études (point particulièrement important pour la participation de volontaires sains dans des essais médicamenteux).  
Non applicable
- 30** Exigences et procédures pour évaluer la santé des volontaires sains (ex. dossier médical ou exigences nationales)  
Avis chirurgien plasticien
- 31** Procédures de recherche, enregistrement et rapport d'effets indésirables (décrire quand, par qui et comment [questions ouvertes et/ou listes])  
Non applicable
- 32** Procédures mises en place pour protéger la confidentialité –a) des données récoltées et éventuellement transmises à des tiers, -b) des archives des documents sources ou –c) des échantillons conservés (si applicable).  
Non applicable
- 33** Considérations statistiques, définitions du nombre de participants nécessaires.  
Le nombre de patients nécessaire est de un par test afin de permettre les comparaisons entre les résultats.
- 34** Montants et procédures d'indemnisation des participants (description des sommes versées durant la participation à l'étude et justification [frais de transport / parking, dédommagement pour inconfort, etc.]).

Non applicable

- 35** Convention d'accès de l'investigateur aux données, de publication des résultats, etc.  
Il n'y a pas de convention d'accès de l'investigateur aux données car celles-ci sont accessibles par tous. Il en est de même pour les résultats.
- 36** Sources de financement et information sur les avantages financiers ou autres de l'investigateur.  
Le financement est réalisé par le service de Galénique et de Biopharmacie de l'Institut de Pharmacie (ULB).

| <b>Déclaration de l'investigateur.</b>   |   |
|--|---|
| Titre de l'expérimentation   |   |
| <p>Je confirme que les informations fournies dans cette demande d'avis au Comité d'Ethique sont correctes.</p> <p>Je confirme avoir déclaré les éventuels conflits d'intérêt qui pourraient découler des relations que moi-même ou un de mes proches entretient avec la firme qui est impliquée dans l'étude faisant l'objet de cette demande.</p> <p>Je pense que cette étude pourra être menée dans le respect du protocole et des principes de la « Déclaration d'Helsinki », des « Bonnes Pratiques Cliniques » et de la loi Belge du 7 mai 2004, relative aux expérimentations sur la personne humaine.</p> <p>Je m'engage notamment à être particulièrement attentif à la protection de la vie privée des participants que je recruterai pour cette étude. Ceci signifie :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Qu'aucune donnée identifiante ne quittera l'institution,</li><li>• Qu'aucune association de données (comme par exemple les initiales vraies combinées à la date de naissance exprimée en jj/mm/aaaa et le sexe) pouvant éventuellement permettre la ré-identification du participant ne quittera l'institution,</li><li>• Que les données et/ou les échantillons biologiques transmis au promoteur de cette étude seront codés.<ul style="list-style-type: none"><li>○ Je serai, avec mes collaborateurs, le seul détenteur de la base de données associant le code d'identification dans l'étude et le dossier du participant.</li><li>○ Cette base de données sera conservée en lieu sûr (armoire fermée / protection par mot de passe si base de données électronique) et détruite au plus tard 15 ans après la date de clôture de l'étude sauf si stipulé autrement dans le contrat conclu avec le promoteur.</li></ul></li><li>• Que tout accès aux données sources et au dossier médical du patient par des tiers se fera sous ma supervision directe ou celle d'un de mes collaborateurs.</li><li>• Que les fichiers informatiques contenant les données récoltées seront protégés des utilisations abusives.</li></ul> <p>Je m'engage à transmettre au Comité d'Ethique</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• les dates marquant la progression de l'étude (inclusion du premier participant, inclusion du dernier participant, clôture de l'étude),</li><li>• tout événement indésirable sévère suspect et inattendu survenu chez un des participants que j'aurai recruté,</li><li>• <b>ma nouvelle évaluation de la balance "risques / bénéfiques" pour les participants à l'étude chaque fois que je transmettrai / le promoteur me demandera de transmettre au Comité d'Ethique des documents en rapport avec la sécurité des participants à l'étude,</b></li><li>• <b>un rapport annuel accompagné de mon évaluation de la balance risques / bénéfiques pour les participants à l'étude,</b></li><li>• le rapport de clôture de l'étude.</li></ul> |   |
| Date : 09/05/2007  | <u>Nom, Prénom de l'investigateur principal.</u><br><br>Durand Laurence<br>Signature: |

## **VIII.2.2 Formulaire de consentement éclairé**

### **Etude pour l'évaluation *ex-vivo* de la pénétration cutanée de produits de protection solaires conditionnés sous forme d'aérosols**

Votre intervention nécessite l'enlèvement de morceaux de peaux qui sont habituellement détruits. Ces tissus résiduels peuvent servir à tester les effets biologiques de certains traitements du tissu cutané humain. Il est évident que cette utilisation en laboratoire ne modifie en rien l'intervention qui va vous être faite. Cependant nous avons besoin de votre autorisation pour pouvoir utiliser en laboratoire ces résidus cutanés dans nos protocoles expérimentaux.

Je soussigné donne mon accord à l'utilisation des résidus cutanés éliminés lors de mon intervention chirurgicale.

Fait à Bruxelles le

Nom :

Prénom :

Signature

Je soussigné, le chirurgien, confirme avoir fourni oralement les informations nécessaires sur l'étude, avoir remis un exemplaire du formulaire d'information et de consentement signé par les diverses parties, être prêt à répondre à toutes les questions supplémentaires, le cas échéant et n'avoir exercé aucune pression pour que le patient participe à l'étude. Ce dernier a également été informé qu'une interruption anticipée n'aura aucune influence sur nos relations et donc sur les soins qui lui seront prodigués.

Je déclare travailler en accord avec les principes éthiques énoncés notamment dans la "Déclaration d'Helsinki" et dans la loi belge du 7 mai 2004, relative aux expérimentations sur la personne humaine.

Signature

### **VIII.2.3 Information au patient**

#### **Etude pour l'évaluation *ex-vivo* de la pénétration cutanée de produits de protection solaires conditionnés sous forme d'aérosols**

##### **Protocole :**

Vous êtes invités à participer à une étude portant sur l'évaluation de la pénétration à travers la peau de produits de protection solaire. Ces produits sont conditionnés sous forme d'aérosol.

Le but de cette étude est d'évaluer leur sécurité lors de l'application sur peau humaine. Les filtres solaires doivent normalement rester en surface et ne peuvent pas (dans certaines limites) passer à travers la peau.

Pour réaliser cette étude, nous avons besoin de résidus opératoires de peau qui peuvent provenir de chirurgie plastique. Nous devons donc récolter, après votre opération, les résidus de peau enlevée durant votre intervention chirurgicale.

##### **Que se passe-t-il si vous décidez de participer à l'étude ?**

Concrètement, pour vous, il ne se passera rien car les échantillons de peau seront récoltés juste après votre intervention. Vous ne verrez rien et ne sentirez rien.

##### **Quels sont les avantages à participer à l'étude ?**

Vous n'allez pas tirer un avantage direct de cette étude mais en participant, vous aidez à évaluer la sécurité de produits solaires et à améliorer celle-ci le cas échéant. Par la même occasion, vous permettez de réaliser cette étude sans utiliser d'animaux.

##### **Y a-t-il des effets secondaires ou des risques ?**

Aucun effet secondaire ou risques ne peut vous arriver car toutes les expériences sont réalisées sur des résidus opératoires obtenus après intervention chirurgicale.

##### **Confidentialité et traitement des données.**

Le chirurgien qui prélève les échantillons de peau a un devoir de confidentialité vis à vis des données collectées. Ceci veut dire qu'il s'engage non seulement à ne jamais divulguer votre nom dans le cadre d'une publication ou d'une conférence mais aussi qu'il prendra toutes les mesures indispensables à la protection de vos données. En pratique, le chirurgien qui va effectuer les prélèvements de peau va transmettre ceux-ci aux investigateurs avec certaines données vous concernant, à savoir votre âge, votre sexe et la couleur de peau. En aucun cas, nous ne recevrons de données vous identifiant directement, comme vos initiales ou votre date de naissance. Ceci permet une anonymisation des prélèvements de peau effectués.

Cette étude a été évaluée par un Comité d'Ethique indépendant, à savoir le comité d'Ethique de l'Hôpital Erasme, qui a émis un avis favorable. En aucun cas vous ne devez prendre l'avis favorable du Comité d'Ethique comme une incitation à participer à cette étude.

Si vous acceptez de participer à cette étude, vous signerez le formulaire de consentement éclairé et confirmant ainsi que vous avez reçu les informations suffisantes sur l'étude, qu'aucune pression n'a été exercée pour que vous acceptiez de participer à l'étude

Si vous avez des questions concernant l'étude, contactez :

## **VIII. 2.4 Approbation du comité d’Ethique**

CLINIQUES UNIVERSITAIRES DE BRUXELLES  
**UNIVERSITE LIBRE  
DE BRUXELLES  
HOPITAL ERASME**

**ULB**

ROUTE DE LENNIK 808 - B-1070 BRUXELLES

Brussels, the May 31th, 2007

COMITE D'ETHIQUE  
Agréation : N°OM021

Mme Laurence DURAND  
Galenic and Biopharmacy  
Pharmacie galénique et Biopharmacie  
Campus de la Plaine, CP 207, Bld du Triomphe  
1050Bruxelles

Secrétariat: Tél.: 32.2.555.37.07  
Fax: 32.2.555.46.20  
E-mail: ethique.hopitalerasme@ulb.ac.be

Dear Mme DURAND,

Please find further on the answer of the Ethics Committee concerning the below mentioned study.

### **ETHICS COMMITTEE APPROVAL**

We, undersigned,  
Chairman & Secretary of

Pr. A. HERCHUELZ & Mr. G. NISSET  
Ethics Committee Erasme Hospital  
808, route de Lennik  
B-1070 Brussels, Belgium  
N° of agréation by "Ordre des Médecins": OM021

confirm that the documents submitted for approval were initially examined during the meeting held on 22/05/2007 (dd/mm/yyyy).

After examination of the answers to the comments and of the new version of the information sheet and consent form received the 30/05/2007, the Ethics Committee gave its agreement on 31/05/2007 to the following documents:

- Protocol (**Our Ref.: P2007/137**) entitled: "*Procédure pour l'évaluation ex-vivo de la pénétration cutanée de produits de protection solaire conditionnés sous forme d'aérosols.*" (Version undefined)
- French Patient Information Sheet: Version 2, dated May 24, 2007 and French Informed Consent Form: Version 2, dated May 24, 2007
- Dutch Patient Information Sheet: Version 2, dated May 24, 2007 and Dutch Informed Consent Form: Version 2, dated May 24, 2007
- Investigator's Curriculum Vitae

The list of the names and qualifications of the members of the Ethics Committee present at the meeting is added in appendix.

We hereby confirm that this Ethics Committee is organized and operates according to ICH GCP and the applicable law and regulations.

  
p. Mr. G. NISSET  
Secretary

  
Pr. A. HERCHUELZ  
Chairman

## **VIII.3 Principaux documents relatifs à l'étude *in vivo***

### **VIII.3.1 Demande d'avis au Comité d'Ethique**

- 1 Titre et Résumé du projet (justification, objectifs, recrutement, méthodologie, etc.)  
**NE PAS DEBORDER LA PAGE 1 du présent formulaire**, caractère 11, interligne simple

**Titre :**

Evaluation in vivo de la pénétration cutanée de filtres UV contenus dans des produits de protection solaire

**Résumé :**

Cette étude a pour but d'estimer la pénétration cutanée et l'absorption dermique de filtres UV organiques et inorganiques contenus dans des produits de protection solaire conditionnés sous forme d'aérosol.

Cette étude a aussi pour but de poursuivre l'investigation qui a été réalisée sur ces mêmes produits lors d'une étude ex vivo préalable. Elle nous permettra ainsi de confirmer (ou d'infirmer) les résultats précédemment obtenus.

Le produit à tester est appliqué sur une surface déterminée de peau de volontaires humains sains (sur la face interne de l'avant-bras). L'application doit se faire à l'aide d'une spatule et de façon à exercer toujours la même pression. Les différentes formulations sont testées chez dix volontaires. Neuf applications sont effectuées sur chaque avant-bras (un type d'émulsion par avant bras) au temps  $t_0$ . Des prélèvements sont ensuite effectués à l'aide des strippings à différents temps prédéterminés en fonction du site d'application du produit. .

Les volontaires ne peuvent ni se rincer ni se nettoyer les zones « traitées » pendant toute la durée de l'expérimentation.

Les prélèvements du Stratum Corneum sont réalisés par la technique du stripping qui consiste à appliquer des strips (ceux-ci se présentent sous forme de cercle en plastique rigide recouvert sur une face de colle spéciale permettant d'enlever le stratum corneum par couche) aux endroits du corps où les produits solaires ont été appliqués. Le strip est ensuite retiré d'un coup sec. Cette opération est répétée au moins 15 fois afin d'enlever toute la couche cornée. Les filtres UV sont ensuite extraits du matériel de prélèvement et dosés soit par des techniques HPLC pour les filtres organiques, soit par des techniques de spectrométrie d'émission atomique, pour les filtres inorganiques.

Cette méthode d'évaluation de pénétration cutanée est non invasive et elle s'effectue sur des volontaires sains de type caucasien âgés entre 20 et 40 ans.

### **Questions Administratives**

2 N° EudraCT :

Référence CE-Erasme :

N° CCB :

Fin présumée étude : 12/2009

3 : **Investigateur principal :**

pour cocher une case, double-clic et choisir case activée

Interne à l'institution :

Médecin :

Externe à l'institution :

Autre (spécifiez) : Institut de Pharmacie ULB

Nom, Prénom : Amighi Karim

Service : Pharmacie Galénique et Biopharmacie

Dénomination de l'institution ou l'étude sera conduite : Institut de Pharmacie

Adresse : Campus de la plaine.

Boulevard du Triomphe accès 2. CP 207. Local BC6 211.  
1050 Ixelles

#### **4 : Type d'étude :**

~ étude qui ne tombe pas sous l'application de la loi du 7 mai 2004

- étude rétrospective
- étude sur surplus matériel biologique humain
- étude sur embryon
- étude psychologique

~ étude tombant sous l'application de la loi du 7 mai 2004

- étude interventionnelle
- étude observationnelle (non-interventionnelle)

#### **5 : Promoteur de l'étude :**

- étude non commerciale ou académique  
origine promoteur
  - Hôpital Erasme
  - Association scientifique
  - Faculté de Médecine – ULB
  - ISEPK – ULB
  - Faculté de Psychologie - ULB
  - Autre ; spécifiez : Institut de Pharmacie - ULB
- étude commerciale ou non académique  
promoteur industriel

#### **6 : Etude Mono / Multicentrique :**

- monocentrique
- multicentrique comité dirigeant
- multicentrique comité non dirigeant
- 

#### **7 : Discipline dont relève l'étude (une seule réponse) :**

- |  |  |   |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> Chirurgie               | <input type="checkbox"/> Psychiatrie             | <input type="checkbox"/> Soins intensifs  |
| <input type="checkbox"/> Médecine interne        | <input type="checkbox"/> Oncologie radiothérapie | <input type="checkbox"/> Soins palliatifs |
| <input type="checkbox"/> Gynécologie/obstétrique | <input type="checkbox"/> Biologie clinique       | <input type="checkbox"/> Soins infirmiers |
| <input type="checkbox"/> Pédiatrie               | <input type="checkbox"/> Bactério/virologie      |   |

Autre ; spécifiez Dermatologie, Dermo-Cosmétologie

#### **8 : Etude portant sur un médicament (une seule réponse) :**

- Phase 1
- Phase 2
- Phase 3
- Phase 4

Autre; spécifiez :

- Bioéquivalence/pharmacoconétique
- Pharmaco-vigilance
- Pharmaco-économie
- Usage compassionnel

**9 : Etude ne portant pas sur un médicament (une seule réponse) :**

- Appareillage médical / prothèse
- Etude diagnostique
- Physiologie / Physiopathologie
- Etude psychologique
- Etude sociologique
- Etude épidémiologique
- Autre ; spécifiez  Etude du potentiel de pénétration cutanée de filtres UV contenus dans des produits de protection solaire

**10 : Choix des sujets (plusieurs réponses possibles):**

- Adultes capables d'exprimer leur volonté
- Adultes incapables d'exprimer leur volonté
- Mineurs
- Situation d'urgence
- Femmes gravides ou susceptibles de le devenir pendant l'étude
- Femmes allaitant
- Nombre de sujets :10
- Affection
- Age : 20-40 ans
- Sexe :

**11 : Notification de l'étude à la Direction de l'institution :**

- OUI
- NON / sans objet
- Pour quelle raison ? L'Etude aura lieu sur le campus de la plaine de l'ULB (Bld du Triomphe-1050-Bruxelles). Le Dr P.Vereecken assurera l'assistance médicale en cas de besoin.

**12 : Assurance :**

- Attestation jointe :
- Démarche en cours :
- Sans objet :
- Si sans objet, pour quelle raison :

**13 : Le dossier** de chaque patient entrant dans l'étude contiendra-t-il à la rubrique "Recherche clinique" :

- un court résumé de l'étude en cours :  
OUI   
NON
- le lieu de dépôt du protocole complet :  
OUI   
NON

**Considérations éthiques**

- 14** Fondements / background de l'étude proposée.  
L'étude in vivo utilisant les strappings permet de ne pas utiliser de méthodes invasives sur volontaires sains
- 15** Question / Hypothèse principale de l'étude proposée (si utile, hypothèses secondaires)  
Les filtres UV utilisés dans les produits de protection solaire fabriqués dans nos laboratoires passent-ils la barrière cutanée ? Et si oui, les quantités qui passent sont elles acceptables ?
- 16** Si le projet évalue une substance pharmacologique (essai clinique), brève description de la nature chimique et de l'action pharmacologique.

Non applicable

- 17** Description de la méthodologie de l'étude et dans le cadre d'un essai clinique, mise en évidence des différences par rapport à la prise en charge thérapeutique standard (Liste des actes requis exclusivement par l'étude y compris nature, fréquence et volume des prélèvements effectués)

a) Application du produit sur les volontaires humains :

Les volontaires humains sont sains, âgés entre 20 et 40 ans et consentants. Le produit solaire est appliqué sur leur avant bras dans une zone déterminée. Deux produits sont à analyser, une émulsion E/H et une émulsion E/Si. Un blanc sans les filtres solaire sera aussi appliqué. La dose de produit appliquée est de 2 mg/cm<sup>2</sup>. Celle-ci est prélevée à l'aide d'une seringue (à cause de la faible viscosité du produit). Puis elle est étalée sur la peau à l'aide d'une spatule spéciale pour cet effet (qui est pesée avant et après l'application du produit pour réajuster la quantité du produit).

Les différentes formulations sont testées chez neuf volontaires. Cinq applications sont effectuées sur chaque avant bras (un type d'émulsion par avant bras) au temps t<sub>0</sub>. Des prélèvements sont ensuite effectués au niveau de chaque site d'application à différents temps prédéterminés :

Les produits sont déposés sur la peau à l'aide d'une spatule et avec une pression la plus reproductible possible.

b) Expérimentation et prélèvement des échantillons de produits à analyser :

L'expérimentation débute immédiatement après l'application du produit.

La durée du test est de 8h (Temps d'exposition au soleil maximal estimé sur une journée).

Application du produit : une fois en début d'expérience sur 9 sites d'application différents

Prélèvement des échantillons : aux temps : 0h, 2h, 4h, 6h, 8h en fonction des sites d'application. Ils sont effectués à l'aide de papier collant (« tape »). Quinze prélèvements sont effectués à l'aide de trente tape différents afin de déterminer la distribution des filtres solaires dans les différentes couches cutanées.

Extraction : les produits sont ensuite extraits des tapes à l'aide d'une méthode d'extraction validée.

c) Analyse des échantillons :

Les échantillons sont ensuite analysés par HPLC, couplée à un détecteur UV-DAD, pour doser les filtres organiques qui ont éventuellement passé la barrière cutanée, puis par SEA pour doser les filtres inorganiques.

Les droites de calibration pour chaque filtre doivent être établies à l'avance.

d) Présentation des résultats :

Sous forme d'histogramme des concentrations en filtre UV en fonction des différentes couches du Stratum corneum et donc des différents strippings.

- 18** Description des mesures prises pour que le participant soit informé des actes exclusivement requis par l'étude, des dispositions prises pour que ces actes ne soient facturés ni au participant, ni à l'INAMI.

Non applicable

- 19** Bénéfices éventuels pour les participants. (Présenter les bénéfices attendus soit pour le participant, soit en terme de meilleure connaissance de phénomènes physiopathologiques)

Cette étude n'a aucune visée thérapeutique, elle est simplement destinée à avoir une meilleure visualisation et une meilleure compréhension du comportement des filtres solaires après application cutanée dans le but d'évaluer la sécurité d'utilisation de ce type de produit. Le volontaire n'en retire donc aucun bénéfice thérapeutique

- 20** Evaluation des risques prévisibles liés au traitement et/ou aux procédures de l'étude (douleur, inconfort, manipulations invasives et moyens mis en oeuvre pour réduire ces risques et prendre en charge les éventuels effets indésirables en cours de procédure / en dehors des procédures, contact possible avec l'investigateur, ...)

L'expérimentation n'est pas de nature à entraîner des risques pour le patient. (sauf allergie éventuelle au produit)

**21** Présenter **votre propre** évaluation de la balance risques/bénéfices.

Les risques étant négligeables par rapport aux bénéfices, la balance risque/bénéfice est bonne.

**22** S'il s'agit d'un essai clinique, plan de traitement et prise en charge des soins après l'arrêt de la participation à l'étude du participant (qui en assure la responsabilité ?)  
Non applicable

**23** Critères d'arrêt ou d'interruption prématurée de l'étude sur le site / en règle générale.  
Si le patient ne supporte pas le produit ou présente des symptômes d'irritation ou d'allergie au produit appliqué.

**24** Expérience précédente de l'investigateur / du site dans la conduite de ce type d'étude.  
Non applicable

**25** Description de la procédure de recrutement (y compris le matériel utilisé).  
Critères d'inclusion du protocole

**26** Description de la procédure d'information et d'obtention du consentement éclairé du participant ou du représentant légal (qui donnera l'information et quand, nécessité d'un représentant légal, d'un témoin, etc.).  
Informations présentées par l'un des investigateurs  
Présentation d'un formulaire de consentement éclairé

**27** S'il y a lieu, exposer les raisons pour lesquelles des participants de groupes vulnérables sont sollicités comme des mineurs, des sujets temporairement ou définitivement incapables.  
Non applicable

**28** Description de la relation entre participant et investigateur (patient - médecin, étudiant – enseignant, etc.)  
Etudiant – Enseignant

**29** Procédures locales pour éviter que le participant ne soit impliqué simultanément dans plusieurs études ou pour vérifier qu'un temps suffisant ce soit écoulé entre 2 participations à des études (point particulièrement important pour la participation de volontaires sains dans des essais médicamenteux).  
Non applicable

**30** Exigences et procédures pour évaluer la santé des volontaires sains (ex. dossier médical ou exigences nationales)  
Dossier médical

**31** Procédures de recherche, enregistrement et rapport d'effets indésirables (décrire quand, par qui et comment [questions ouvertes et/ou listes])  
Au moment de l'étude (au cours de celle-ci), par l'investigateur, questions ouvertes

**32** Procédures mises en place pour protéger la confidentialité –a) des données récoltées et éventuellement transmises à des tiers, -b) des archives des documents sources ou –c) des échantillons conservés (si applicable).  
Non applicable

**33** Considérations statistiques, définitions du nombre de participants nécessaires.  
Le nombre requis de volontaires est de 10 minimum.

**34** Montants et procédures d'indemnisation des participants (description des sommes versées durant la participation à l'étude et justification [frais de transport / parking, dédommagement pour inconfort, etc.]).

Aucun frais lié à la participation à l'étude n'est réclamé au volontaire.

Les volontaires faisant partie du corps académique, scientifique et technique de l'Institut de Pharmacie, aucune rémunération n'est prévue à leur participation à l'étude.

**35** Convention d'accès de l'investigateur aux données, de publication des résultats, etc.

Il n'y a pas de convention de l'investigateur aux données car celles-ci ont accessibles par tous. Il en est de même pour les résultats.

**36** Sources de financement et information sur les avantages financiers ou autres de l'investigateur.

Le financement est réalisé par le service de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie de l'Institut de Pharmacie

### Déclaration de l'investigateur.

#### Titre de l'expérimentation

Je confirme que les informations fournies dans cette demande d'avis au Comité d'Ethique sont correctes.

Je confirme avoir déclaré les éventuels conflits d'intérêt qui pourraient découler des relations que moi-même ou un de mes proches entretient avec la firme qui est impliquée dans l'étude faisant l'objet de cette demande.

Je pense que cette étude pourra être menée dans le respect du protocole et des principes de la « Déclaration d'Helsinki », des « Bonnes Pratiques Cliniques » et de la loi Belge du 7 mai 2004, relative aux expérimentations sur la personne humaine.

Je m'engage notamment à être particulièrement attentif à la protection de la vie privée des participants que je recruterai pour cette étude. Ceci signifie :

- Qu'aucune donnée identifiante ne quittera l'institution,
- Qu'aucune association de données (comme par exemple les initiales vraies combinées à la date de naissance exprimée en jj/mm/aaaa et le sexe) pouvant éventuellement permettre la ré-identification du participant ne quittera l'institution,
- Que les données et/ou les échantillons biologiques transmis au promoteur de cette étude seront codés.
  - Je serai, avec mes collaborateurs, le seul détenteur de la base de données associant le code d'identification dans l'étude et le dossier du participant.
  - Cette base de données sera conservée en lieu sûr (armoire fermée / protection par mot de passe si base de données électronique) et détruite au plus tard 15 ans après la date de clôture de l'étude sauf si stipulé autrement dans le contrat conclu avec le promoteur.
- Que tout accès aux données sources et au dossier médical du patient par des tiers se fera sous ma supervision directe ou celle d'un de mes collaborateurs.
- Que les fichiers informatiques contenant les données récoltées seront protégés des utilisations abusives.

Je m'engage à transmettre au Comité d'Ethique

- les dates marquant la progression de l'étude (inclusion du premier participant, inclusion du dernier participant, clôture de l'étude),
- tout événement indésirable sévère suspect et inattendu survenu chez un des participants que j'aurai recruté,
- ma nouvelle évaluation de la balance "risques / bénéfiques" pour les participants à l'étude chaque fois que je transmettrai / le promoteur me demandera de transmettre au Comité d'Ethique des documents en rapport avec la sécurité des participants à l'étude,
- **un rapport annuel accompagné de mon évaluation de la balance risques / bénéfiques pour les participants à l'étude,**
- le rapport de clôture de l'étude.

Date :

Nom, Prénom de l'investigateur principal.

Signature:

### **VIII.3.2 Formulaire de consentement éclairé**

## **Information du sujet volontaire**

|   |
|---|
| <p><b>Evaluation <i>in vivo</i> de la pénétration cutanée de filtres UV contenus dans des produits de protection solaires</b></p> |
|---|

### **1. But de l'étude/ Notion de recherche**

Cette étude a pour but d'estimer la pénétration cutanée et l'absorption dermique de filtres UV organiques et inorganiques contenus dans des produits de protection solaire conditionnés sous forme d'aérosol. En effet, un produit solaire sera d'autant plus efficace qu'il restera en surface de la peau et qu'il présentera un taux de pénétration cutanée le plus faible possible. Cette étude entre dans le cadre d'un travail de recherche pour une thèse de doctorat, elle ne revêt aucun aspect commercial et n'est pas financée par une industrie Cosmétique ou autre.

Les émulsions utilisées contiennent des ingrédients, c'est-à-dire des substances non actives ainsi que des filtres solaires qui protègent de l'action non bénéfique de rayonnements ultraviolets du soleil. La liste des ingrédients et des actifs est reprise ci-dessous. Ces substances sont inoffensives pour autant que le volontaire ne présente pas d'allergie connue à leur rencontre.

Emulsion 1: Aqua (Water), Isohexadecane, Hydrogenated Polydecene, Ethylhexylmethoxycinnamate, Propane, Methylene Bis-benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol, C12-15 Alkylbenzoate, 2-EthylhexylDimethylPABA, Propylene Glycol, Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate, Titanium Dioxyde, Bis-Ethylhexylphenol Methoxyphenyltriazine, Zinc Oxyde, Vanilla tahitensis Extract, Bisabolol, Xanthan Gum, Dissodium EDTA, Magnesium Sulfate, Isodeceth-6, Oleth-8, Tocopheryl Acetate, Diphenylsimethicone, Phenoxyethanol, Methylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, Propylparaben.

Emulsion 2: Aqua (Water), Cyclopentasiloxane, Ethylhexylmethoxycinnamate, Methylene Bis-Benzotriazolyl Tetramethylbutylphenol, Cetyl Dimethicone, Propylene

Glycol, PEG-Dimethicone Crosspolymer, Titanium Dioxyde, Zinc Oxyde, Phenoxyethanol, Ectoin, Sodium Chloride, Dissodium EDTA, Xanthan Gum, Silica, PVP, BHP, Chlorphenesin, Isodeceth-6, Oleth-10, Alumina, Aluminium Stearate, Simethicone, Diazolidinyl Urea, Allantoin, Diphenyl Caprylmethicone, Methylparaben, Ethylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, Propylparaben.

L'estimation de la quantité de filtre solaire qui reste à la surface de la peau est effectuée de façon directe.

Le produit à tester est appliqué sur une surface déterminée de peau de volontaires humains sains (au niveau de la face interne de l'avant bras). L'application doit se faire à l'aide d'une spatule et de façon à exercer toujours la même pression. Le produit est appliqué pour une durée maximum de 8h et n'est pas recouvert d'un pansement occlusif. Les volontaires ne peuvent ni se rincer ni se nettoyer les zones « traitées » pendant toute la durée de l'expérimentation.

A des temps déterminés, les prélèvements du Stratum Corneum (c'est-à-dire la partie superficielle de la peau) sont réalisés par la technique du stripping qui consiste à appliquer du papier collant aux différents endroits du corps où les produits solaires ont été appliqués. Le papier collant est ensuite retiré d'un coup sec. Cette opération est répétée 15 fois afin d'enlever toute la couche cornée. Cette méthode d'évaluation de la pénétration cutanée est non invasive et elle s'effectue sur des volontaires sains de type caucasien âgés entre 20 et 40 ans.

## **2. Bénéfices thérapeutiques**

L'étude in vivo proposée ici n'a aucune visée thérapeutique, elle est simplement destinée à estimer la capacité du produit à rester en surface de la peau. Le volontaire n'en retire donc aucun bénéfice thérapeutique.

## **3. Caractère volontaire de la participation**

La fiche signalétique du sujet volontaire doit être complétée avant l'étude. Ce questionnaire est conçu pour établir les critères médicaux d'exclusion et d'inclusion d'un sujet dans l'étude. Il est dès lors dans l'intérêt du sujet volontaire de répondre le plus complètement et en toute honnêteté aux questions posées.

La présente étude ne débutera qu'après approbation et autorisation du comité d'Ethique Médicale de l'Hôpital Erasme. Cette étude sera réalisée selon les normes scientifiques et éthiques actuelles et en respectant les droits du sujet volontaire.

Ce formulaire de consentement éclairé est destiné à informer le sujet volontaire quant à la nature de l'étude ainsi que de ses droits et devoirs. Il doit être obligatoirement signé pour accord par le volontaire avant toute participation à l'étude. Il pourra également en discuter avec le coordonnateur de l'étude et/ou toute autre personne de son choix, y compris son médecin traitant, avant de donner son accord. Le sujet dispose d'un temps de réflexion de trois jours ouvrables avant de signer le présent formulaire. Si le sujet accepte de participer à cette étude, il reste libre de la quitter à tout moment sans avoir à se justifier.

La participation à cette étude se faisant sur des bases volontaires, le sujet peut librement refuser de participer à l'étude ou décider de quitter l'étude à tout moment. Aucun moyen de pression ne sera utilisé à l'encontre du volontaire en cas de refus de participation ou d'abandon de l'étude.

#### **4. Contraintes avant la session d'étude**

Le sujet ne devra pas avoir subi d'intervention chirurgicale au niveau cutané sur les avant-bras et ne devra présenter aucun signe extérieur d'irritation, d'allergie ou autre affection avant le début de l'étude. Le sujet ne devra s'être appliqué aucun produit sur la peau depuis la veille (crème...).

#### **5. Contraintes en cours d'étude, durée de l'étude**

L'étude se déroulera sur une durée de 8h par sujet volontaire. Le volontaire s'engage à être disponible de 8h à 17h30 le soir. Les prélèvements étant effectués par l'investigateur toutes les heures.

##### 1-Préparation de la peau :

**A 8h**, la peau est préalablement nettoyée à l'aide d'un savon puis soigneusement rincée et séchée. La peau ne doit pas être irritée et ne doit pas présenter de blessure éventuelle.

##### 2- Application des produits sur la peau :

**A 8h30**, les produits sont appliqués sur l'avant bras des volontaires en quantité de 2 mg/cm<sup>2</sup> sur une surface bien définie de peau (5,30 cm<sup>2</sup>) délimitée grâce à un dispositif circulaire de 2.6 cm de diamètre, correspondant au diamètre des disques de patch. Les produits sont appliqués à l'aide d'une spatule (qui est pesée avant et après l'application de l'émulsion afin de réajuster la quantité du produit).

Les différentes formulations sont testées chez neuf volontaires. Cinq applications sont effectuées sur chaque avant bras (un type d'émulsion par avant bras) au temps t<sub>0</sub>. Des prélèvements sont ensuite effectués au niveau de chaque site d'application à différents temps prédéterminés :

1-Prélèvement t<sub>0</sub>

2-Prélèvements t<sub>2</sub> (2h)

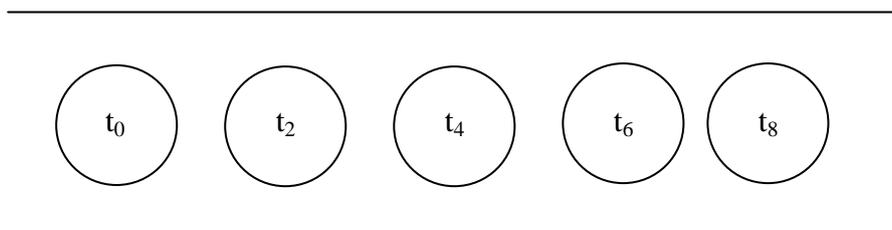
3-Prélèvements t<sub>4</sub> (4h)

4-Prélèvements t<sub>6</sub> (6h)

5-Prélèvements t<sub>8</sub> (8h)

Les volontaires ne peuvent pas se laver les zones « traitées » pendant toute la durée d'une expérimentation test.

La figure 1 montre les zones d'application des produits sur les avant bras des volontaires.



*Figure 1 : Schéma d'application des produits sur les avant-bras*

## 6. Participation, recrutement durée

La durée d'une session est de 8h à 17h30. Tous les prélèvements sont effectués au laboratoire, aucun prélèvement n'est à effectuer à son domicile.

Le nombre de sujets recrutés pour l'étude est de neuf volontaires.

La durée totale de l'étude est de 9 sessions, étalées sur deux semaines complètes, soit 14 jours.

## **7. Lieu des sessions d'étude**

Université Libre de Bruxelles

Institut de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie (niveau 6)

Campus de la Plaine-CP207

Bd du triomphe 1050 Bruxelles

## **8. Date et heure de la convocation**

Pour des raisons techniques, un retard de maximum 15 minutes est autorisé avant l'exclusion du sujet de l'étude.

## **9. Contact pour information**

Prof.K.Amighi. ULB Institut de Pharmacie), Tél. : 02/6505252

Email : [kamighi@ulb.ac.be](mailto:kamighi@ulb.ac.be)

Médecin dermatologue : Dr P. Vereecken (Hôpital Erasme)

## **10. Risques prévisibles**

Plusieurs publications présentent ce genre d'étude avec des produits qui contiennent ou non des filtres UV. Des effets indésirables ne sont jamais reportés car le risque d'effets indésirables est très faible.

## **11. Assurance RC**

Toute étude clinique comprend un risque, si minime soit-il. Conformément à la loi belge du 7 mai 2004 relative aux expérimentations sur la personne humaine (article 29), le promoteur assume, même sans faute, la responsabilité du dommage causé au participant (ou à ses ayant droit) et lié de manière directe ou indirecte aux expériences réalisées. Dans cette pratique, le promoteur a souscrit un contrat d'assurance.

## **12. Paiement, frais et rémunération**

Aucun frais lié à la participation à l'étude n'est réclamé au volontaire.

Les volontaires faisant partie du corps académique, scientifique et technique de l'Institut de Pharmacie, aucune rémunération n'est prévue à leur participation à l'étude.

## **13. Confidentialité des données**

L'investigateur principal qui réalise les expérimentations a un devoir de confidentialité vis-à-vis des données collectées. Ceci veut dire qu'il s'engage non seulement à ne jamais divulguer le nom des volontaires dans le cadre d'une publication ou d'une conférence mais aussi qu'il prendra toutes les mesures indispensables à la protection de leurs données. En pratique, l'investigateur principal va collecter certaines données qui sont confidentielles et tenues sous forme d'une base de données anonymisée par l'investigateur. En cas de besoin, seuls l'investigateur principal et le Dr P. Vereecken de l'Hôpital Erasme pourront y avoir accès. Auquel cas, le médecin est bien évidemment tenu par le secret médical.

## **14. Approbation du volontaire**

L'étude ne débutera qu'après l'approbation du comité d'éthique de l'Hôpital Universitaire Erasme et après une lecture attentive de ce formulaire d'information au sujet volontaire et la signature de celui-ci par le sujet. Cette signature doit être précédée de la mention, « Lu et approuvé ».

**Bruxelles le :**

**Nom et Prénom du volontaire :**

**Signature du volontaire précédée de la mention « lu et approuvé » :**

## **Formulaire de consentement éclairé du patient** **(Confidentiel)**

**Intitulé de l'étude :** Evaluation *in vivo* de la pénétration cutanée de filtres UV contenus dans des produits de protection solaire.

**Responsable de l'étude :** Prof. K.Amighi

Université Libre de Bruxelles

Institut de Pharmacie

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie (niveau 6)

Campus de la Plaine-CP207

Bd du triomphe 1050 Bruxelles

Tél : 02/6505252

Email : [kamighi@ulb.ac.be](mailto:kamighi@ulb.ac.be)

### **Fiche signalétique du patient:**

Nom et Prénom :

Sexe :

Age :

Coordonnées complètes :

### **Durée de l'étude:**

L'étude se déroulera sur une période de **8h** durant laquelle le volontaire s'engage à être disponible de **8h à 17h30**.

### **Lieu de l'étude :**

Université Libre de Bruxelles, Institut de Pharmacie

Campus de la Plaine-CP207

Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie (niveau 6)

Bd du triomphe 1050 Bruxelles

Personne de contact : pro. K. Amighi Tél. : 02/6505252

Email : [kamighi@ulb.ac.be](mailto:kamighi@ulb.ac.be)

**Questions:** (Biffer les mentions inutiles)

1. Avez-vous récemment souffert d'une affection dermatologique quelconque ?  
(Exemples : allergie cutanée, brûlure (coup de soleil ou autre), exzéma, ...)

**-OUI**

**-NON**

2. Suivez-vous une quelconque médication actuellement ?

**-OUI**

**-NON**

3. Avez-vous subi une quelconque intervention chirurgicale au niveau cutané sur les avant-bras ?

**-OUI**

**-NON**

Si la réponse à l'une de ces questions est positive, le volontaire ne participera pas à l'étude.

**Connaissance du formulaire information au patient:**

Le patient volontaire sain déclare avoir pris connaissance du document « information au patient », d'en avoir compris le sens et y avoir mûrement réfléchi, en foi de quoi, il consent à rejoindre l'étude dont l'intitulé est : « Evaluation *in vivo* de la pénétration cutanée de filtres UV contenus dans des produits de protection solaire »

Je soussignée, Laurence Durand, doctorante, confirme avoir fourni oralement les informations nécessaires sur l'étude, avoir remis un exemplaire du formulaire d'information et de consentement signé par les diverses parties, être prêt à répondre à toutes les questions supplémentaires, le cas échéant et n'avoir exercé aucune pression pour que le patient participe à l'étude. Je déclare travailler en accord avec les principes éthiques énoncés notamment dans la « déclaration d'Helsinki » et dans la loi belge du 7 mai 2004, relative aux expérimentations sur la personne humaine.

**Bruxelles le :**

**Nom et Prénom du volontaire :**

**Signature du volontaire précédée de la mention « lu et approuvé » :**

## VIII.3.3 Approbation du comité d'éthique

CLINIQUES UNIVERSITAIRES DE BRUXELLES  
**UNIVERSITE LIBRE  
DE BRUXELLES  
HOPITAL ERASME**



Brussels, April 2, 2009

ROUTE DE LENNIK 808 - B-1070 BRUXELLES

COMITE D'ETHIQUE  
Agrégation : N°OM021

Pr. Karim AMIGHI  
Galénic and Biopharmacy  
Service de Pharmacie Galénique et Biopharmacie - ULB  
Campus de la Plaine CP 207, Bld du Triomphe  
1050 Bruxelles

Secrétariat : Tél.: 32.2.555.37.07  
Fax: 32.2.555.46.20  
E-mail: comite.ethique@erasme.ulb.ac.be

Dear Pr. AMIGHI,

Please find further on the answer of the Ethics Committee concerning the below mentioned study.

### ETHICS COMMITTEE APPROVAL

We, undersigned,  
Chairman & Secretary of

Pr. A. HERCHUELZ & Mr. G. NISSET  
Ethics Committee Erasme Hospital  
808, route de Lennik  
B-1070 Brussels, Belgium  
N° of agreement by "Ordre des Médecins": OM021

confirm that the documents submitted for approval were initially examined during the meeting held on 24/03/2009 (dd/mm/yyyy).

After examination of the answers to the comments and of the new version of the information sheet and consent form received the 02/04/2009, the Ethics Committee gave its agreement on 02/04/2009 to the following documents:

- Protocol (**Our Ref.: P2009/072**) entitled: "*Evaluation in vivo de la pénétration cutanée de filtres UV contenus dans des produits de protection solaire.*" (Your Ref.: Version undefined)
- French Patient Information Sheet: Version 2, undated and French Informed Consent Form: Version 2, undated
- Dutch Patient Information Sheet: Undelivered and Dutch Informed Consent Form: Undelivered
- Investigator's Curriculum Vitae
- Certificate of Insurance: ETHIAS ASSURANCE; Policy Nr 45.127.563 covering period from March to July 2009.

The list of the names and qualifications of the members of the Ethics Committee present at the meeting is added in appendix.

This agreement is valid from **02/04/2009** till **12/2009**.

The Committee reminds the investigator of his personal responsibility for this project. We consider **your responsibility**, in accordance with the recommendations of ICH GCP, that annual trial status and end trial results will be transmitted to the Committee.

If Dutch speaking volunteers have to be recruited for this study, it is your responsibility to submit to the Ethics Committee a Dutch version of the information sheet and consent form.

We hereby confirm that this Ethics Committee is organized and operates according to ICH GCP and the applicable law and regulations.

  
Mr. G. NISSET  
Secretary

  
Pr. A. HERCHUELZ  
Chairman

CC : Dr. AMIGHI Karim, Institut de Pharmacie; Campus de la Plaine; Bld du Triomphe, accès 2 - CP 207  
- 1050 BRUXELLES -

INTERNET: <http://www.hopitalerasme.be/ethique.htm>

