



**HAL**  
open science

# Structure et physicochimie des tensioactifs, leurs impacts sur la toxicité cutanée et la fonction barrière

Emmanuelle Lemery

► **To cite this version:**

Emmanuelle Lemery. Structure et physicochimie des tensioactifs, leurs impacts sur la toxicité cutanée et la fonction barrière. Dermatologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10044 . tel-02382545

**HAL Id: tel-02382545**

**<https://theses.hal.science/tel-02382545>**

Submitted on 27 Nov 2019

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

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



Numéro d'ordre 44-2015

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1  
ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 23 mars 2015  
par

**Emmanuelle LEMERY**

---

**STRUCTURE ET PHYSICOCHIMIE DES  
TENSIOACTIFS, LEURS IMPACTS SUR LA  
TOXICITE CUTANEE ET LA FONCTION  
BARRIERE**

---

JURY : Mme Marie-Alexandrine BOLZINGER, Université de Lyon  
Mme Stéphanie BRIANCON, Université de Lyon  
Mr Yves CHEVALIER, Université de Lyon  
Mme Arlette BAILLET-GUFFROY, Université de Paris-Sud 11  
Mr Philippe HUMBERT, Université de Besançon  
Mme Amélie BOCHOT, Université de Paris-Sud 11  
Mr Thierry ODDOS, JJSBF

*(Directeur de thèse)*  
*(Co-directeur de thèse)*  
*(Président du jury)*  
*(Rapporteur)*  
*(Rapporteur)*  
*(Rapporteur)*  
*(Membre invité)*







**« Je suis bien dans ma peau, elle est juste à ma taille ! »**

*Anonyme*

**« Il n'y a pas de plus fin, de plus riche, de plus beau tissu que la peau d'une jolie  
femme. »**

*Anatole France*



## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Marie-Alexandrine Bolzinger ma directrice de thèse pour son soutien et ses précieux conseils. Au-delà de ses qualités scientifiques, qui ont fait progresser le travail, je n'oublierai pas toutes ces conversations où l'on a refait le monde tard dans la soirée qui ont rendues cette thèse très humaine et plus agréable.

Stéphanie Briançon, je vous remercie pour votre encadrement sans faille et votre capacité à tirer le meilleur de mes réflexions scientifiques.

Je remercie Yves Chevalier de m'avoir fait l'honneur de présider le jury, mais aussi pour son encadrement, et ses idées pertinentes pour faire avancer le projet.

Cette thèse n'aurait jamais vue le jour sans ce trio de choc.

Mes remerciements vont aussi à Thierry Oddos, pour m'avoir fait confiance et permis de faire ce travail, de m'avoir guidé sans jamais abandonner ce projet quelle que soit la situation.

D'autre part, je remercie Arlette Baillet-Guffrot, Philippe Humbert et Amélie Bochet d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse.

Bien évidemment, je remercie Hatem Fessi de m'avoir accueilli au sein du LAGEP.

Je remercie Aurore Rozière et Marek Haftek d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail au comité de suivi de thèse et de me conseiller pour l'avancée du projet.

Je remercie infiniment, Annie Gohier, mon soutien permanent au sein de Johnson&Johnson, avec de grandes qualités humaines. Tu ne m'as jamais laissé tomber et tu t'es toujours battue pour moi. Sans toi, cette thèse n'aurait pas pu aussi bien se passer et être aussi bien organisée.

Je voudrais remercier de tout mon cœur, Jocelyne Pelletier sans qui cette thèse n'aurait pas été aussi agréable. Je ne te remercierais jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as consacré énormément de ton temps (et je ne parle pas que de l'HPLC, même si on sait toutes les deux que les heures ont été bien longues !). Je ne me lasserai pas de nos conversations où tu as su me rassurer quel que soit mon problème, j'espère avoir su te rendre au moins le quart de tout le soutien que tu m'as donné, ma petite maman du labo.

Nous remercions toute l'équipe de Pierre Lantéri : Claire Bordes et Yohann Clément pour leur patience, leur temps, leur accueil chaleureux malgré les difficultés et leur aide précieuse pour analyser les données.

Je remercie pour tout le temps et la bonne humeur qu'il m'a accordé à chaque fois, Olivier Boyron, le roi de la spectroscopie infrarouge.

Merci également à Odile Damour et Elodie Métral pour m'avoir permis de me procurer sans difficulté des échantillons de peaux humaines essentiels pour l'avancée de ma thèse.

Hélène Wong et José Serrano, merci de tout coeur pour m'avoir montré la voie de la toxicologie in vitro, vous avez été présents au moindre souci et vous avez pris le temps de tout m'expliquer.

Une grande pensée va vers toutes mes amies et collègues de J&J, grâce à qui les retours dans l'entreprise étaient un véritable bonheur. Merci à Mélissa, Aurélia, Maude, Hortense, Leïla ma copine doctorante, Sylvie et Isabelle mes anciennes encadrantes et bien sûr ma moussaka, Anne-Laure, merci pour toute ton amitié.

Un immense merci à mes trois stagiaires, j'ai eu la chance d'avoir de véritables perles : Oriane, la spécialiste des ternaires, Charlotte et son tensiomètre à goutte et Augustine la reine des angles de contact.

Je voudrais remercier mes amis et collègues de l'université de Lyon qui ont apporté du soleil dans cette thèse :

Merci à Nadia, Jean-Pierre et Sébastien pour rendre la vie du labo beaucoup plus facile et agréable.

Dorothée, merci pour tes conseils d'ancienne pour la thèse comme pour les TP.

Faiza, Zouaoui, merci pour vos conseils et votre amitié.

Audrey J, merci pour tous ces bons moments, Skip the Use restera gravé dans ma mémoire !

Pauline, ma grande amie de ma première année de thèse, je pense que grâce à toi, j'ai démarré avec un soutien énorme et je ne te remercierai jamais assez pour ça.

Tharwa, Mme HPLC, merci pour tous ces bons moments pendant ma première année de thèse.

Raphaël et Eyad, les hommes de Rockefeller, toujours là pour m'aider et discuter, merci d'avoir été si présents, à Rock comme à l'extérieur pendant les soirées ou congrès ou soirées de congrès ! Et un merci aux deux hommes du Lagep Fabrice et Barth que j'ai eu plaisir à côtoyer.

Les petites « nouvelles » de Rock, Anissa, Alicia, Zoé et ma coloc de bureau Marion, merci de m'avoir supporté pour la dernière ligne droite !

Angèle, merci pour toutes ces petites conversations en mode planchette et battements de jambes à la piscine.

Gé, ah... Gé, merci pour tous ces moments, ces discussions autour d'une bière en terrasse, de vin et de fromage chez toi, d'un thé au labo ou simplement pendant le Run in Lyon sous la pluie ! La thèse se termine mais je sais que nos soirées ne sont pas prêtes de disparaître !

Enfin mes deux petites fées de cette thèse :

Charlotte, depuis le premier jour tu m'as supporté dans ton bureau et je suis tellement heureuse d'avoir fait cette thèse rien que pour t'avoir rencontré. J'ai gagné une amie, et je serais toujours là comme tu l'as été pendant ces trois ans, pour tout et n'importe quoi !

Delph, ma binomette, ma running girl, je pense que sans ton soutien et sans ton amitié, elle aurait été tellement plus difficile cette thèse ! Merci pour tous ces moments passés avec toi à parler de la thèse, et de nos vies autour de manip, de pâte fimo, d'un bon repas ou en courant quel que soit le temps. Et merci de l'honneur que tu m'as fait en me demandant d'être ta témouine !

Je voudrais aussi remercier mes amis de Lyon qui n'ont jamais vraiment compris sur quoi je travaillais mais qui m'ont rendu la vie lyonnaise plus belle. Les Ragga girls, Marion, Maellie, Marjojo et Sophia, merci pour ces belles soirées de danse. La team Radio Scoop, merci pour tous ces bons moments, en mode raclette, barbeuc, barbeuclette, concert, et quizz du Paddy's qui m'ont permis de souffler un peu. Mes voisines de choc Kro et Emi, merci pour m'avoir intégré dès le premier jour dans vos vies et de m'avoir fait rencontrer la team des gazelles ! Les « Sex and the city girls » Lorena et Céline, pour avoir été là dans un moment pas facile, qui est devenu beaucoup plus cool grâce à vous ! Un énorme merci à Bibi aussi ! Estelle, alors tellement merci pour tout, tout, tout bien cordialement, je ne sais pas quoi dire d'autre.

Et merci à toutes celles qui ont bien voulu me prêter leurs bras pour mes nombreux tests d'hydratation. La science et moi vous remercions d'avoir attendu 4h dans une salle à 19°C.

Merci à mes amis de presque toujours qui ont su m'écouter dans les moments pas faciles de cette thèse et qui ont su me remonter le moral. Les pharmaciens, Lolita, Clara, Pauline, Benou, Flo, Pierre, JB, Julie et Emi. Les clermontois, Mél, Kéké, G (spéciale dédicace pour le Mont-Blanc, qui m'a fait dire que si j'y étais arrivée, j'arriverais bien à terminer cette thèse), Chris, So, Max, Gui et Vince.

Enfin je tiens à remercier de tout mon cœur, ma famille qui me soutient depuis le début et grâce à qui j'arrive à avancer et à me surpasser. Merci d'être toujours là, à n'importe quel moment et d'essayer de me montrer toute la confiance que vous avez dans mes capacités, surtout quand je doute. Lioubliou.



## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** *Représentation schématique des principales étapes de la différenciation épidermique*
- Figure 2.** *Corps d'Odland vus en microscopie électronique*
- Figure 3.** *Structure et produits de la transformation de la profilaggrine*
- Figure 4.** *Réaction de transamidation catalysée par les transglutaminases*
- Figure 5.** *L'enveloppe cornée proposée par Steinert*
- Figure 6.** *Schéma d'un desmosome*
- Figure 7.** *Structure chimique des différents composés du sébum*
- Figure 8.** *Représentation schématique de la formation de l'enveloppe cornée et des corps lamellaires, lipases et lipides intercornéocytaires*
- Figure 9.** *Synthèse des lipides du ciment intercornéocytaires*
- Figure 10.** *Organisation des lipides selon les trois directions de l'espace*
- Figure 11.** *Schéma de l'agencement des lipides de l'espace intercellulaire*
- Figure 12.** *Arrangement des lipides en LPP*
- Figure 13.** *Organisation conformationnelle et latérale des lipides*
- Figure 14.** *Schéma de l'arrangement en empilement de monocouche*
- Figure 15.** *Schéma du modèle mosaïque de Forslind*
- Figure 16.** *Les différentes conformations possibles des céramides dans le modèle de la phase gel simple*
- Figure 17.** *Schéma du modèle de phase gel simple proposé par Norlén*
- Figure 18.** *Schéma du modèle de Schröter*
- Figure 19.** *Régulation de la barrière cutanée*
- Figure 20.** *Représentation des différents composants du SC*
- Figure 21.** *Schéma de mesure de la PIE par la méthode de chambre ouverte*
- Figure 22.** *Spectre infrarouge de peau humaine, réalisé in vivo et zones d'intérêt*
- Figure 23.** *Analyse d'un spectre infrarouge de la peau*
- Figure 24.** *Changement de conformation des lipides matriciels en fonction de la température sur un SC humain isolé*

- Figure 25.** *Spectre  $\delta CD2$  d'un mélange de DAGL en fonction de la température*
- Figure 26.** *Schéma explicatif des travaux de Moore et Mendelsohn*
- Figure 27.** *Méthode d'analyse des spectres par le calcul de FW*
- Figure 28.** *Chromatogramme HPLC-ELSD des lipides extraits par la méthode in vitro de Folch (chloroforme/méthanol) d'un SC isolé de sein*
- Figure 29.** *Tracé par un densitomètre d'un chromatogramme sur couche mince des lipides liés du SC humain.*
- Figure 30.** *Formation d'un angle de contact sur une surface solide*
- Figure 31.** *Graphique de détermination des composantes polaires et de dispersion de l'énergie de surface du solide*
- Figure 32.** *Coupe histologique d'un épiderme humain et du modèle SkinEthic™ RHE*
- Figure 33.** *Réaction chimique pour les Tests MTT et LDH*
- Figure 34.** *Puits contenant les inserts de multicouches de kératinocytes traitées par différentes émulsions et le réactif MTT*
- Figure 35.** *Schéma des différents types de tensioactifs*
- Figure 36.** *Comportement des molécules d'eau à l'interface*
- Figure 37.** *Isotherme de Gibbs*
- Figure 38.** *Morphologie des agrégats en fonction de la valeur du PAC*
- Figure 39.** *Organisations des tensioactifs en solution*
- Figure 40.** *Schéma d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile*
- Figure 41.** *Dermatite d'irritation de contact chez une serveuse de restaurant collectif liée au travail en milieu humide, plonge, port de gants trop courts laissant pénétrer les détergents*
- Figure 42.** *Schéma d'une protéine et sites d'action du tensioactif.*
- Figure 43.** *Mécanisme d'action des tensioactifs ioniques sur le dépliement de la structure protéique*
- Figure 44.** *Mécanisme d'action des tensioactifs non ioniques sur le dépliement de la structure protéique*
- Figure 45.** *Image numérique pour la mesure de la tension superficielle d'une huile.*
- Figure 46.** *Image numérique pour la mesure de la tension interfaciale d'une huile.*
- Figure 47.** *Protocole de mesure de la tension superficielle.*
- Figure 48.** *Protocole de mesure de la tension interfaciale*
- Figure 49.** *Etude cinétique de l'abaissement de la tension superficielle d'une solution de sucrose stéarate à  $0.1 \text{ mg.ml}^{-1}$*

**Figure 50.** *Tension superficielle de la solution en fonction du log de la concentration en TA (exemple de sucrose stearate)*

**Figure 51.** *Distribution de taille des globules d'huile dans un émulsion stabilisée par le Brij S100.*

**Figure 52.** *Distribution de taille des globules d'huile dans un émulsion stabilisée par l'Emulium delta.*

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1.** *Composition d'1cm<sup>2</sup> de peau*

**Tableau 2.** *Variation de la composition lipidique durant la différenciation épidermique et la cornification.*

**Tableau 3.** *Enzymes hydrolytiques de l'espace intercornéocytaire*

**Tableau 4.** *Structure des différentes classes de céramides existant dans le SC*

**Tableau 5.** *Composition chimique moyenne des NMF*

**Tableau 6.** *Zones d'intérêt du spectre infrarouge de la peau*

**Tableau 7.** *Composition des lipides liés du SC humain en pourcentage massique*

**Tableau 8.** *Caractéristiques morphologiques de l'épiderme et des modèles de peau reconstruite*

**Tableau 9.** *Bilan des tensioactifs et leurs applications en fonction de leur nature*

**Tableau 10.** *Tensions superficielles et interfaciales des trois huiles sélectionnées avant et après purification.*



# Table des matières

Remerciements	7
<b>Introduction générale</b>	<b>19</b>
<b><i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</i></b>	<b>21</b>
<b>Chapitre I. La peau, fonction barrière de l'organisme</b>	<b>23</b>
1. L'épiderme, acteur principal de la fonction barrière de la peau	24
1.1. Structure et physiologie de l'épiderme	24
1.2. Focus sur le stratum corneum	28
2. Les lipides du stratum corneum : rôle majeur dans la fonction barrière de la peau	34
2.1. Les lipides du sébum, composants majeurs du film hydrolipidique de surface de la peau	35
2.2. Les lipides intercornéocytaires	36
3. Les grandes fonctions de la peau	54
3.1. Le maintien de l'hydratation : les facteurs naturels d'hydratation (NMF)	54
3.2. L'organisation lipidique, quel lien avec la fonction barrière ?	56
4. Les différents signaux régulant la fonction barrière de la peau	58
4.1. Signaux ioniques	58
4.2. Signaux non ioniques	59
<b>Chapitre II. Techniques d'évaluation et d'observation de la peau</b>	<b>61</b>
1. Evaluation de l'hydratation de la peau (teneur en eau)	62
1.1. Exemples de méthodes diverses	62
1.2. Les méthodes électriques	63
2. L'évaluation de la fonction barrière	64
2.1. Mesures de la perte insensible en eau (PIE)	64
2.2. La calorimétrie différentielle à balayage (ou DSC)	66
2.3. La diffraction des rayons X	67
2.4. La spectroscopie infrarouge	67
2.5. La microscopie confocale Raman	81
2.6. La quantification des lipides cutanés	83
2.7. La pénétration cutanée	86
2.8. Evaluation des lipides de surface	86
3. Evaluation de la toxicité et de l'irritation cutanée	91
3.1. Rappel sur la physiopathologie de l'irritation et l'inflammation cutanée.	91
3.2. Les modèles et tests <i>in vivo</i>	95
3.3. Les tests chez l'homme	95
3.4. Les modèles de peau reconstruites	96
3.5. Les tests <i>in vitro</i>	99

3.6. Les tests in vivo _____	103
<b>Chapitre III. Les tensioactifs et la peau _____</b>	<b>105</b>
1. Généralités sur les tensioactifs _____	105
1.1. Définition _____	105
1.2. Classification _____	106
1.3. Propriétés physicochimiques des tensioactifs susceptibles de déclencher une DIC _____	110
1.4. Propriétés d'usage des molécules tensioactives, un lien avec leurs interactions avec les composants de la peau _____	116
2. L'effet des tensioactifs sur la peau _____	118
2.1. Signes cliniques _____	119
2.2. L'interaction des tensioactifs avec les protéines du stratum corneum _____	122
2.3. L'interaction des tensioactifs avec les lipides du stratum corneum _____	128
2.4. Les tensioactifs et l'épiderme viable : lien avec l'inflammation _____	131
2.5. Les tensioactifs comme protecteurs de la fonction barrière et comme promoteurs d'hydratation, des exceptions intéressantes _____	132
<b>Conclusion _____</b>	<b>133</b>
<b><i>PARTIE EXPERIMENTALE</i> _____</b>	<b>135</b>
<b>Chapitre I. Etudes physicochimiques des tensioactifs _____</b>	<b>139</b>
1. Sélection des tensioactifs pour l'étude _____	139
1.1. Les tensioactifs anioniques _____	139
1.2. Les tensioactifs cationiques _____	140
1.3. Les tensioactifs non ioniques _____	140
2. Choix du squelette pour la formulation de l'émulsion _____	142
2.1. Choix de la phase grasse _____	143
2.2. Choix de l'agent de texture _____	145
2.3. Base définitive et formulation _____	145
3. Caractérisations physicochimiques des tensioactifs en solution _____	146
3.1. Calcul du HLB _____	146
3.2. pH en solution et en émulsion _____	146
3.3. Tension superficielle et tension interfaciale _____	147
3.4. CMC, PAC et caractéristiques micellaires _____	149
3.5. Comportement du tensioactif en phase aqueuse _____	154
4. Caractérisations physicochimiques des tensioactifs en émulsion _____	154
4.1. Granulométrie _____	154
4.2. Viscosité et rhéologie _____	156
4.3. Comportement du tensioactif en émulsion _____	156
5. Conclusion _____	156
<b>Chapitre II. La toxicité cutanée des tensioactifs : relations structure/toxicité _____</b>	<b>159</b>
Résultats complémentaires _____	201
<b>Chapitre III. Les tensioactifs ont un effet à plusieurs niveau sur la barrière cutanée _____</b>	<b>209</b>

Chapitre IV. L'impact des tensioactifs sur la barrière cutanée, une évaluation à plusieurs niveaux, quel lien avec la toxicité cutanée ?	237
Discussion générale	269
Conclusions et perspectives	283
<b>ANNEXES</b>	<b>285</b>
Annexe 1. HLB des différents tensioactifs	287
Annexe 2. pH des solutions et émulsions	288
Annexe 3. Tensions superficielles et interfaciales	289
Annexe 4. CMC, PAC et caractéristiques micellaires.	290
Annexe 5. Granulométrie	291
Annexe 6. Viscosité	292
Annexe 7. Organisation des tensioactifs en phase aqueuse et en émulsion.	293
Annexe 8. Focus peau sèche : L'importance des lipides cutanés pour le maintien de l'hydratation des peaux sèches	294
<b>REFERENCES</b>	<b>299</b>



## Introduction générale

Dans son rituel de beauté et d'hygiène, l'homme utilise quotidiennement des produits tels que les savons, gels douche et shampoings mais également les crèmes permettant d'assurer l'hydratation, la protection et la réparation de la peau. Ces formulations ont en commun dans leur composition un ou des tensioactif ou émulsionnant. En effet, grâce à leurs propriétés physicochimiques de surface, les tensioactifs sont très utilisés pour la formulation de produits topiques pour stabiliser les dispersions, telles que les émulsions mais également pour leurs propriétés moussantes et détergentes dans les produits nettoyants. Ils peuvent également être utilisés comme promoteur d'absorption dans la peau (Ananthapadmanabhan et al. 2004; Williams and Barry 2012). Les tensioactifs ont des propriétés solubilisantes des corps gras, à ce titre ils permettent le nettoyage, mais peuvent également interagir avec les composants de la peau. Une des premières preuves évidentes de l'interaction des tensioactifs avec la peau est l'observation des signes cliniques suite à l'exposition prolongée ou chronique à des formules riches en tensioactifs. Ces molécules, maintenant connues pour engendrer des dermatites de contact d'irritation et des réactions inflammatoires, font l'objet d'un véritable problème de santé publique concernant les maladies professionnelles liées aux détergents (Crepy 2005; Larson et al. 2006).

La bonne santé de la peau repose le plus souvent sur la couche la plus superficielle de l'épiderme: le stratum corneum, assurant une fonction barrière, et protégeant contre les agressions extérieures mais également contre la perte insensible en eau afin de maintenir une bonne hydratation. Grâce aux récentes investigations sur les peaux normales et les peaux pathologiques, le rôle des lipides du stratum corneum dans la fonction barrière et la perméabilité de la peau a été mis en avant. De plus, certaines expériences sur la fonction barrière ont montré une relation très étroite entre la perturbation de la barrière et l'expression de marqueurs d'inflammation.

Les nombreuses investigations menées afin de mieux comprendre l'effet des tensioactifs sur la peau ont donc ciblé les lipides cutanés, que ce soit au niveau de leur organisation ou de leur extraction suite au contact avec les tensioactifs. Les protéines de la peau sont également une cible d'étude, les interactions avec les tensioactifs peuvent entraîner leur dénaturation, et engendrer une toxicité.

Cependant seuls quelques individus par famille de tensioactif (anionique, cationique et non ionique) ont été étudiés ; le sodium lauryl sulfate étant reconnu maintenant comme le test positif d'irritation cutanée. Ainsi des relations entre la structure, les propriétés physicochimiques des tensioactifs et leur toxicité cutanée ont été établies sur un faible nombre de molécules étudiées.

L'objectif de ce projet de recherche était d'une part d'approfondir les connaissances sur la physicochimie de certaines classes de tensioactifs peu étudiés et pourtant largement utilisés dans le milieu industriel puis d'autre part d'évaluer l'impact de la physicochimie du tensioactif sur sa toxicité cutanée et son effet sur la fonction barrière.

De nombreuses études physicochimiques ont été réalisées au préalable sur les tensioactifs sélectionnés pour l'étude afin de les caractériser. La toxicité cutanée a été évaluée à l'aide de techniques *in vitro* sur épiderme humain reconstruit. L'évaluation de la fonction barrière suite au traitement par les tensioactifs a été effectuée *ex vivo* sur explants de peau humaine à trois niveaux : i/en surface, grâce à la mesure de l'énergie de surface de la peau, ii/au niveau de la matrice lipidique par observation de l'organisation des lipides grâce à la spectroscopie infrarouge, et iii/le potentiel d'extraction des tensioactifs a également été évalué par dosage des lipides par chromatographie liquide haute performance avec détecteur à diffusion de lumière. L'impact du tensioactif sur la fonction barrière a été relié à sa toxicité cutanée.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique portant sur les thématiques d'intérêt pour cette étude : La peau, les éléments clefs de la fonction barrière, les techniques d'évaluation de la peau et de ses propriétés et enfin les caractéristiques physicochimiques des tensioactifs et leur action sur les différents composants de la peau. La deuxième partie sera dédiée aux résultats expérimentaux regroupés en quatre chapitres distincts correspondant aux objectifs précédemment exposés. Le premier chapitre traite des études physicochimiques réalisées sur l'ensemble des tensioactifs puis une étude sur le lien entre la physicochimie des tensioactifs et leur toxicité cutanée est présentée en deuxième partie. Le troisième chapitre présente une nouvelle étude sur l'effet des tensioactifs sur la barrière cutanée à plusieurs niveaux. Le lien entre l'effet des tensioactifs sur la barrière cutanée et leur toxicité est développé dans le quatrième chapitre.

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**



# Chapitre I. La peau, fonction barrière de l'organisme

La peau, également appelée système tégumentaire, recouvre tout le corps et représente l'organe le plus important du corps en taille et en poids.

La peau représente une masse de 3,5 kg sans le tissu adipeux sous-cutané pour une surface de 2 m<sup>2</sup> environ et une épaisseur moyenne chez l'adulte de 1,2mm (selon les zones anatomiques considérés, au niveau des paupières ou de la plante du pied, elle peut varier de 0,5 à 4 mm, elle diminue de 6% par décennie). Au niveau de sa constitution on compte 2000 milliards de cellules, 2 millions de pores. Les éléments que l'on peut retrouver dans 1cm<sup>2</sup> de peau figurent dans le Tableau 1.

Tableau 1. Composition d'1cm<sup>2</sup> de peau (d'après Peyrefitte and Camponovo 2008)

Composition d'1cm <sup>2</sup> de peau	
vaisseaux sanguins	70 cm
fibres nerveuses	50 cm
récepteurs sensoriels	230
glandes sébacées	15
glandes sudoripares	100 à 700 suivant les régions
densité microbienne résidante	1,7.10 <sup>3</sup> (membres supérieurs)
	4,3.10 <sup>7</sup> (périnée)

La structure cutanée est hétérogène, composée de plusieurs compartiments superposés : l'épiderme le plus externe et le derme, séparés par la jonction dermo-épidermique. L'hypoderme est le tissu sous-jacent du derme. La face superficielle de l'épiderme est criblée d'une multitude de petits orifices correspondants aux ostiums pilaires et aux pores sudoraux, ce sont les annexes cutanées. Les annexes regroupent les glandes cutanées et les phanères. Les glandes cutanées comprennent les glandes sudoripares eccrines, les glandes sudoripares apocrines et les glandes sébacées. Les phanères cutanés comportent les poils et les ongles. En règle générale, les glandes sébacées sont annexées aux poils, l'ensemble constituant les follicules pilo-sébacés. Les glandes sudoripares apocrines sont annexées à certains de ces follicules pilo-sébacés alors que les glandes sudoripares eccrines sont toujours indépendantes des poils. (Crickx 2005).

De manière succincte, le rôle principal de l'épiderme peut se résumer à un rôle de protection de l'organisme. Le derme, quant à lui, a un rôle « nourricier » au travers de nombreux vaisseaux sanguins qui le constituent et permettent la diffusion de nutriments vers l'épiderme.

Etant en contact avec le milieu extérieur, l'épiderme contrôle une des fonctions principales fonction de la peau c'est-à-dire le rôle de barrière physique contre les agressions extérieures, mais aussi un rôle de maintien de l'homéostasie du corps humain, composé de 70% d'eau, en évitant les déperditions hydriques.

## **1. L'épiderme, acteur principal de la fonction barrière de la peau**

L'épiderme est la couche la plus superficielle de la peau, d'une épaisseur allant de 1,5 mm au niveau des paumes à 0,04 mm au niveau des paupières. De par sa structure et en particulier grâce à sa couche la plus externe, le stratum corneum (SC), il instaure une véritable barrière physique, limitant la pénétration d'agents extérieurs et la perte hydrique, appelé perte insensible en eau.

### ***1.1. Structure et physiologie de l'épiderme***

L'épiderme est constitué à 80% de kératinocytes. Ceux-ci sont répartis en quatre couches, dans lesquelles les kératinocytes se différencient progressivement, de la couche la plus interne de l'épiderme jusqu'à la surface de la peau. Cette migration dure 28 jours (Figure 1).

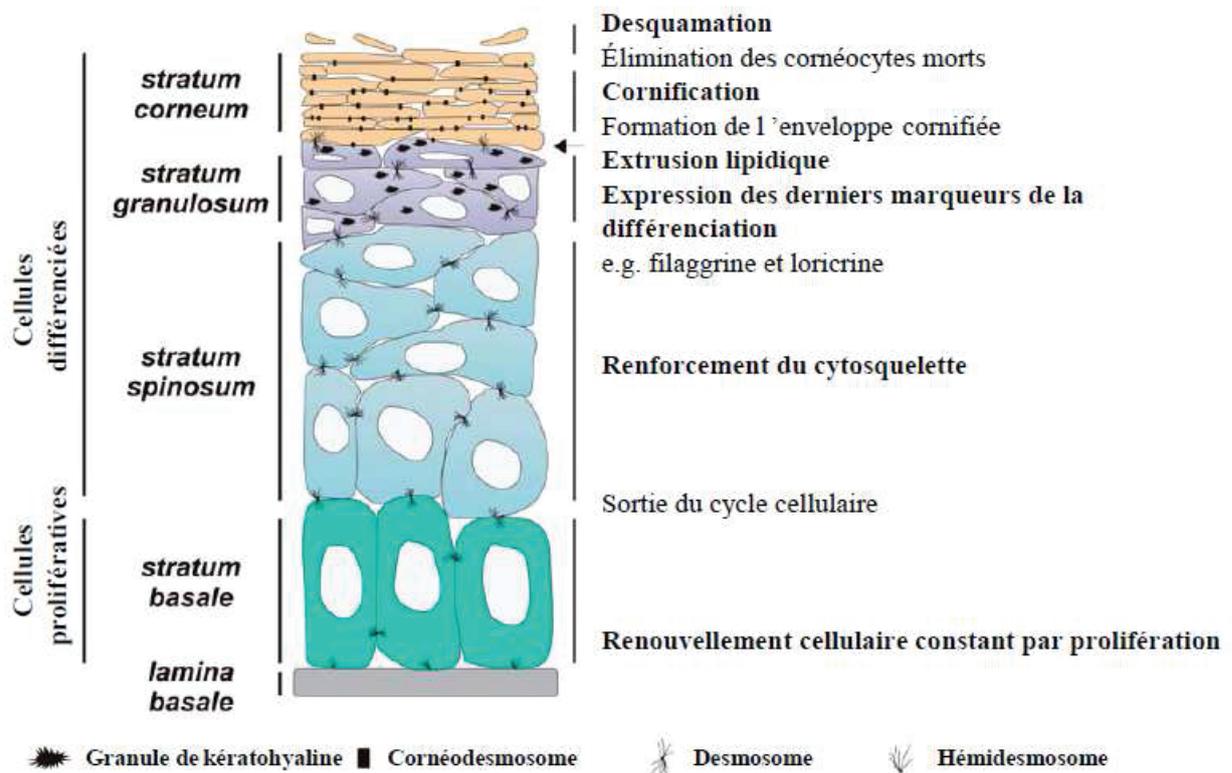


Figure 1. Représentation schématique des principales étapes de la différenciation épidermique.  
D'après (Denecker et al. 2008)

### 1.1.1. La couche basale ou stratum germinatum

Cette couche est la plus profonde de l'épiderme, elle est constituée d'une seule assise de kératinocytes implantés perpendiculairement et directement en contact avec la jonction dermo-épidermique (JDE). Ces cellules sont cubiques ou cylindriques avec un noyau volumineux basophile et leur rangée est interrompue régulièrement par la présence de mélanocytes. Elles sont soudées entre elles par les desmosomes et à la JDE par les héli-desmosomes. Il s'agit de la seule couche capable d'engendrer la néoformation des kératinocytes. Une cellule basale souche donne naissance à une cellule amplificatrice qui va se diviser en deux cellules filles. Une de ces cellules filles va migrer vers la couche supérieure où elle va commencer sa différenciation et l'autre, la cellule post-mitotique, va rester en position basale. Au niveau de la couche basale, la proportion de protéines (majoritairement des kératines) est de 30% (Crickx 2005).

### 1.1.2. La couche épineuse ou stratum spinosum

C'est à partir de cette couche que les kératinocytes rentrent dans un processus de différenciation irréversible de type apoptotique. Elle comprend 5 à 10 couches de cellules qui sont devenues polygonales. Les kératinocytes commencent leur différenciation en synthétisant notamment la kératine sous forme de tonofilaments. C'est le compactage des tonofilaments au niveau des membranes cellulaires qui forme les desmosomes et fixent les kératinocytes à 20 nm de distance les uns des autres. Cette grande cohésion du tissu forme le cytosquelette, responsable de la résistance mécanique des kératinocytes. Les desmosomes correspondent aux épines que l'on peut voir en observant les kératinocytes au microscope, expliquant le nom donné à cette couche (Peyrefitte and Camponovo 2008).

### 1.1.3. La couche granuleuse ou stratum granulosum

Cette couche, formée d'une à trois assises cellulaires est essentielle pour l'épiderme, car elle est le siège de transformations clefs qui vont permettre la fonction barrière du stratum corneum, la couche la plus superficielle. Progressivement les cellules s'aplatissent dans l'axe de la surface cutanée, leur noyau se fragmente, et deux types de granulations apparaissent dans le cytoplasme. Les granules de kératohyaline contiennent des protéines notamment la profilaggrine, l'involucrine et la loricine qui participeront à la formation de l'enveloppe cornée. Le deuxième type de granules présents est constitué des corps lamellaires, ou corps d'Odland (Figure 2). Ils présentent une alternance de lamelles sombres et claires correspondant aux lipides précurseurs du ciment intercellulaire de la couche cornée (phospholipides, glucosylcéramides, sphingomyéline et cholestérol). Ils contiennent également des enzymes incluant des hydrolases lipidiques, des  $\beta$ -cérébrosidases, des phospholipases A2 et aussi des peptides tels que la  $\beta$ -defensine et la cathelicidine (Feingold 2008). A l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée, le contenu des corps lamellaires est extrudé dans l'espace intercellulaire. Cette couche est la dernière de l'épiderme contenant des cellules vivantes. (Crickx 2005; Feingold 2007). Au niveau de la couche granuleuse supérieure, les kératinocytes vont subir des modifications irréversibles, avec digestion du noyau et disparition du cytoplasme pour former les cornéocytes.

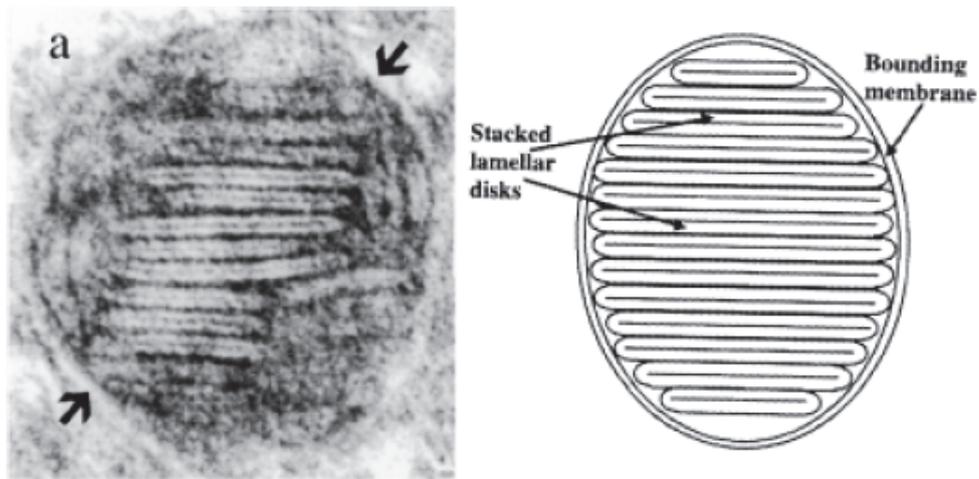


Figure 2. Corps d'Odland vus en microscopie électronique (d'après Madison 2003).

#### 1.1.4. Couche cornée ou stratum corneum (SC)

Le stratum corneum est la couche la plus superficielle de l'épiderme. Depuis les années 1950, il est établi que cette couche détermine la fonction barrière de la peau (Blank 1953). Une description détaillée des éléments composant le SC est donc nécessaire à la bonne compréhension de la fonction barrière de la peau.

Le SC est composée de 12 à 16 assises de cornéocytes organisées en trois sous couches, de la profondeur à la surface :

- La couche claire ou stratum lucidum. Elle n'existe qu'au niveau des paumes et des plantes, elle apparaît comme une fine couche translucide de deux ou trois rangées cellulaires juste au-dessus de la couche granuleuse.
- La couche compacte ou stratum compactum dans laquelle les cellules sont étroitement liées, formant une masse compacte assurant de manière efficace la fonction barrière hydrique de la peau.
- La couche desquamante ou stratum disjonctum. Au niveau de cette couche d'une épaisseur de moins de 5  $\mu\text{m}$ , les cellules perdent leur cohésion avec les cellules voisines et sont éliminées à la surface de la peau, c'est le phénomène de desquamation. (Crickx 2005)

## ***1.2. Focus sur le stratum corneum***

Le SC est une barrière compacte d'environ 20µm d'épaisseur, longtemps décrite comme un système de briques/mortier, similaire à un mur, les cornéocytes agissant comme des briques, entourées d'une couche lipidique symbolisée par le mortier (Elias 1983). Ce modèle d'origine a été affiné depuis, il est maintenant présenté comme une structure poly-protéinée, d'épaisseur variable, (les briques étant fortement interconnectées par les cornéodesmosomes) mais ces briques sont finalement plutôt des éponges de kératines contenant des facteurs naturels d'hydratation (ou Natural Moisturizing Factor, NMF). Elles sont dispersées dans une phase lipidique continue et très ordonnée (Rawlings 2010). Le SC contient environ 60% de kératine par rapport à son poids sec total.

### **1.2.1. Cornéocytes**

Le cornéocyte ne ressemble en rien à une cellule traditionnelle puisqu'il n'a ni noyau, ni organites cellulaires. Son milieu intérieur est essentiellement composé de kératine (85% des protéines totales) et de NMF. Les kératines appartiennent à la famille des filaments intermédiaires. Les kératines représentent plus de 50 protéines regroupées en deux familles. Ces deux familles sont synthétisées en même temps par la cellule : les kératines acides de type I (K9 à K28) et les kératines basiques de type II (K1 à K8 et K71 à K80). Ces 2 protéines en hélice  $\alpha$  vont s'associer pour former une structure en double hélice, très importante pour la bonne intégrité des kératines (Steinert 1993; Schweizer et al. 2006). Les doubles hélices vont s'agrèger pour former des microfibrilles, parallèles à la surface de la peau, renforçant les cornéocytes. Une protéine provenant des granules de kératohyaline, la filaggrine (acronyme pour « filament-aggregating »), va jouer un rôle important dans cette étape. Le précurseur de la filaggrine est le profilaggrine. C'est une protéine de 400 kilodaltons (kDa) contenant 10 à 12 répétitions en tandem du peptide de la filaggrine de 37 kDa, reliés par des ponts peptidiques hydrophobes de sept acides aminés (Rawlings and Harding 2004; Harding, Aho, and Bosko 2013). La profilaggrine est phosphorylée immédiatement après sa translocation dans le stratum granulosum de l'épiderme. A son stade mature, elle est insoluble et stockée dans les granules de kératohyaline des granulocytes. La partie N-terminale (Figure 3) est composée de deux domaines ; le A, contenant un motif S100-like, domaine de liaison du calcium et le B contenant une ou plusieurs séquences de localisation nucléaire. D'après leurs études, Harding et al ; suggèrent que la translocation du domaine B au sein du noyau des kératinocytes se produisant

durant la différenciation épidermique, emporte avec lui un fragment d'ADN, le définissant comme élément régulateur de la prolifération et de la différenciation épidermique.

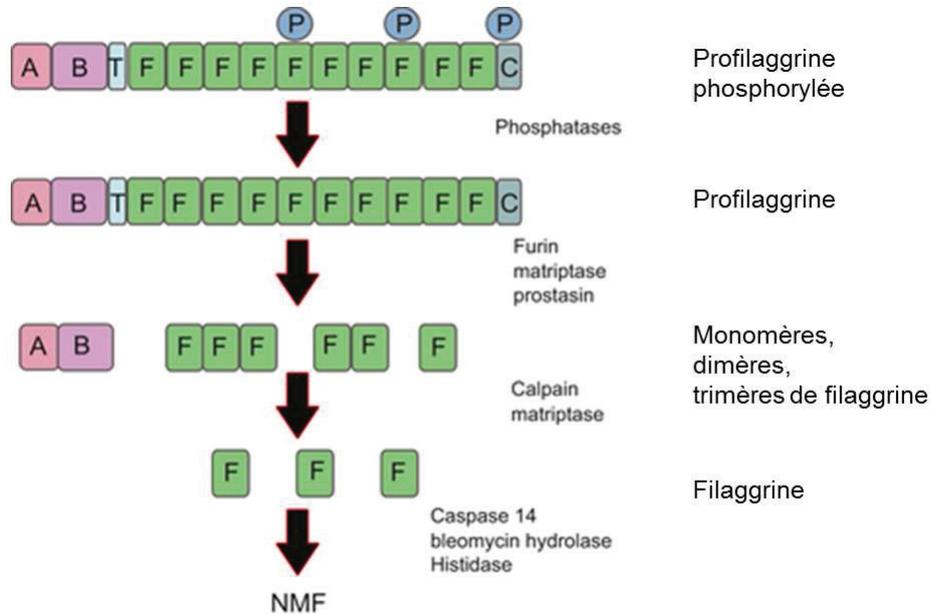


Figure 3. Structure et produits de la transformation de la profilaggrine. (d'après Harding, Aho, and Bosko 2013)

La fonction de la partie C-terminale (Figure 3) est encore méconnue, mais elle est nécessaire pour obtenir de la filaggrine à partir de profilaggrine. En effet, des mutations sur le gène de la filaggrine résultant en une profilaggrine tronquée en sa partie C-terminale, aboutit à la perte quasi-totale des monomères de filaggrine et donc à une absence en composants du NMF nécessaires l'hydratation des couches supérieures de la peau. A la transition couche granuleuse/couche cornée, la profilaggrine contenue dans les granules va être déphosphorylée et clivée en sous-unités fonctionnelles de filaggrine. Ces protéines, contenant des amino acides chargés positivement, vont participer à l'agrégation des doubles hélices de kératines. Dans le stratum compactum, les sous-unités de filaggrine vont être désiminées (transformation de résidus arginyl en résidus citrullyl) par une (ou plusieurs) peptidylarginine désiminases. Cette modification entraîne un changement de charge, la filaggrine devient acide et perd son affinité avec les kératines, il y a détachement des sous-unités de filaggrine. La protéolyse de la filaggrine apparaît dans une zone où les enzymes opérant sa dégradation sont fonctionnelles. Elle apparaît juste après que la barrière imperméable à l'eau a été formée dans le stratum compactum, dans cette zone le taux d'humidité est compris entre 70 et 95%. Au-dessus, la

filaggrine est stable, il n'y a pas de protéolyse, et en dessous, la peau est trop sèche, l'activité enzymatique est stoppée. La conversion de la filaggrine en NMF produit une grande pression osmotique dans les cornéocytes, de ce fait cette étape doit être retardée jusqu'à ce que les cornéocytes soient matures et leur enveloppe bien formée. La capsase 14 initie la protéolyse par modification post-translationnelle de la partie C-terminale, elle possède un caractère sensible au gradient d'eau au sein de la couche cornée pour la dégradation de la filaggrine. Elle est retrouvée dans la totalité de l'épiderme, mais sa forme activée ne l'est que dans le SG et le SC. La bléomycine hydrolase, une protéase à cystéine neutre de la famille des papaïnes est également impliquée dans la dégradation terminale. C'est une citrulline aminopeptidase majeure du SG/SC et elle travaille de concert avec la capsase 14 sur la filaggrine désiminée et permet l'obtention de citrulline à partir de petits peptides. Ces acides aminés libres, tels l'histidine et la glutamine vont subir une dégradation supplémentaire donnant naissance à de l'acide pyrrolidone carboxylique et de l'acide urocanique. (Dale, Resing, and Lonsdale-Eccles 1985; Dale et al. 1997; Rawlings and Matts 2005; Harding, Aho, and Bosko 2013).

### 1.2.2. Enveloppe cornée

Dans les couches internes de l'épiderme, les kératinocytes ont une membrane cellulaire classique formée d'une bicouche de phospholipides. Les dernières étapes de différenciation des kératinocytes en cornéocytes sont caractérisées entre autre par l'élaboration d'une paroi hautement résistante apposée à la face interne de la membrane plasmique : l'enveloppe cornée. Elle est constituée de précurseurs protéiques liés entre eux par des ponts disulfures et d'autres liens covalents, entourant les cornéocytes, et elle est associée à une monocouche de lipides d'environ 5 nm (Hirotsu et al. 1982; Swartzendruber et al. 1989). C'est une structure hautement insoluble, due à la présence de liens covalents isodipeptides N<sup>ε</sup>-(γ-glutamyl)-lysine formés entre des précurseurs protéiques par les transglutaminases (TGM). Ces enzymes catalysent la transamidation de résidus peptidyl glutamines en présence de calcium (Figure 4) et ont un rôle essentiel pour la fonction barrière.

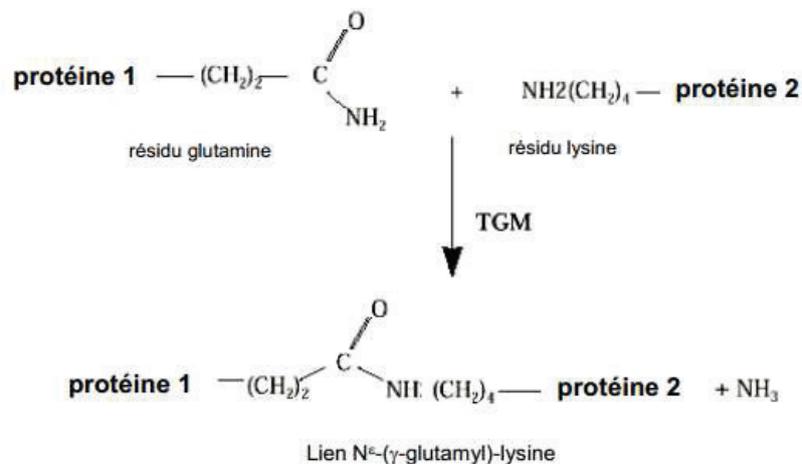


Figure 4. Réaction de transamidation catalysée par les transglutaminases, (d'après Schilling and Thum 2013).

La TGM1 est une protéine membranaire qui joue un rôle essentiel dans l'assemblage des composants de l'enveloppe cornée. Les souris dont le gène TGM1 a été invalidé meurent à la naissance suite à un défaut de barrière cutanée induit par des anomalies de formation de l'enveloppe cornée (Matsuki et al. 1998). Chez l'Homme, des mutations dans le même gène sont responsables d'une ichtyose sévère, l'ichtyose lamellaire de type 1 (Huber et al. 1995). Par ailleurs, la TGM1 est capable, *in vitro*, de participer à la formation de l'enveloppe lipidique en catalysant l'estérification des  $\omega$ -hydroxycéramides avec un précurseur de l'enveloppe, l'involucrine (Nemes et al. 1999).

Les TGM3 et 5 sont cytosoliques. La TGM3 permet d'oligomériser des précurseurs protéiques qui seront ensuite liés entre eux par la TGM1 membranaire.

- Initiation de la formation de l'enveloppe cornée :

L'étape d'initiation de la formation de l'enveloppe a lieu au niveau de la couche épineuse. Les deux premiers précurseurs protéiques sont l'envoplakine et la périplakine. Sous l'effet d'une augmentation de la concentration calcique, ces deux protéines vont s'hétérodimériser grâce à la TGM5 et s'accumuler au niveau de la face interne de la membrane plasmique. Elles sont immédiatement rejointes par une autre protéine, l'involucrine, fixée par la TGM 1 membranaire (DiColandrea et al. 2000; Kalinin, Kajava, and Steinert 2002; Steinert and Marekov 1999). Alors que la concentration calcique continue d'augmenter, la TGase 1 forme des liaisons entre l'envoplakine et l'involucrine. Il se forme alors une sorte d'échafaudage protéique

particulièrement résistant qui recouvre la face interne de la membrane plasmique et incorpore la plaque desmosomale.

- Etape de renforcement :

Lors d'une étape suivante, après que les corps lamellaires aient déversé leur contenu dans les espaces inter-kératinocytaires, à la transition couche granuleuse/couche cornée, les phospholipides de la membrane plasmique sont remplacés par des  $\omega$ -hydroxycéramides qui sont liés par la TGM1 à l'involucrine (Candi, Schmidt, and Melino 2005; Jackson et al. 1993). Parallèlement, de nouveaux précurseurs protéiques s'accumulent dans le cytoplasme des kératinocytes. La loricrine est le composant principal de l'enveloppe cornée (jusqu'à 80% de sa masse protéique). Elle est exprimée au niveau de la couche granuleuse (Steinert and Marekov 1997) et est liée à d'autres protéines, principalement aux SPRs (une famille de petites protéines riches en proline) grâce à l'action de la TGM3 cytosolique (Steinert, Kartasova, and Marekov 1998). Ces complexes sont ensuite transloqués à la périphérie des kératinocytes et incorporés à l'échafaudage protéique préexistant. D'abondantes liaisons peptidiques sont formées au niveau des desmosomes où de nombreux substrats des TGM sont présents. D'autres protéines sont finalement ajoutées à l'enveloppe cornée dont les kératines, la filaggrine, des protéines de la famille S100, la cornéodesmosine, et d'autres protéines. La Figure 5, propose un schéma de l'enveloppe cornée.

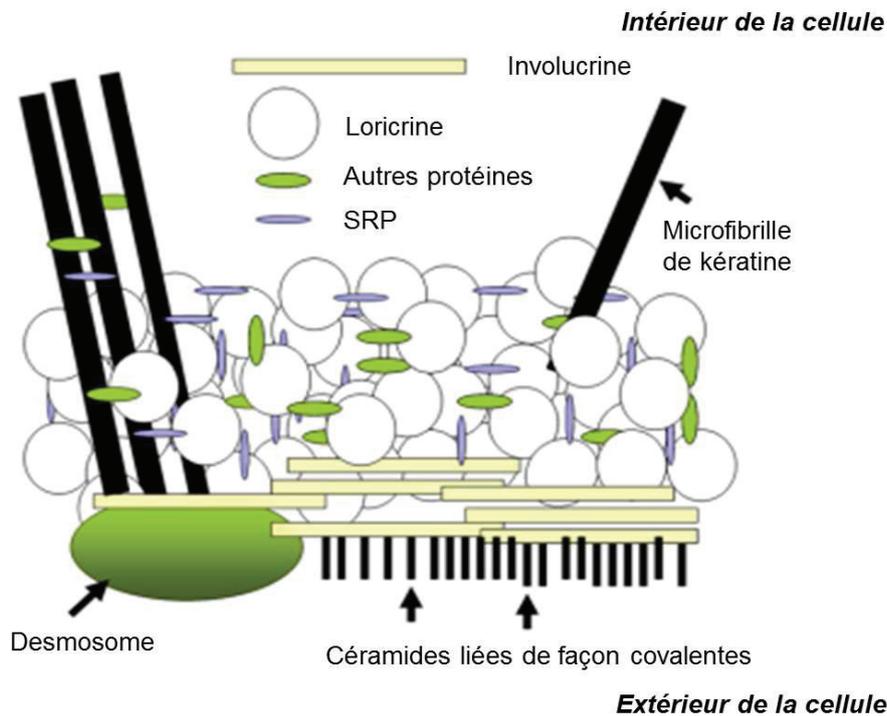


Figure 5. L'enveloppe cornée proposée par Steinert, (d'après Wickett and Visscher 2006)

### 1.2.3. Desmosomes

Les desmosomes sont des structures constituées par des protéines de liaisons transmembranaires, les cadhérines desmosomales et des protéines d'adhésion intracellulaires ou molécules des plaques : desmoplakines et envoplakines, permettant la liaison entre les cellules. Au niveau du SC ces jonctions sont modifiées par l'addition de cornéodesmosine, on parle alors de cornéodesmosomes. Cette protéine possède un potentiel adhésif très efficace et joue un rôle central dans la cohésion de la couche cornée. Au cours du processus de desquamation, cette protéine subit plusieurs hydrolyses qui l'inactivent (Jonca et al. 2002; Simon et al. 2001).

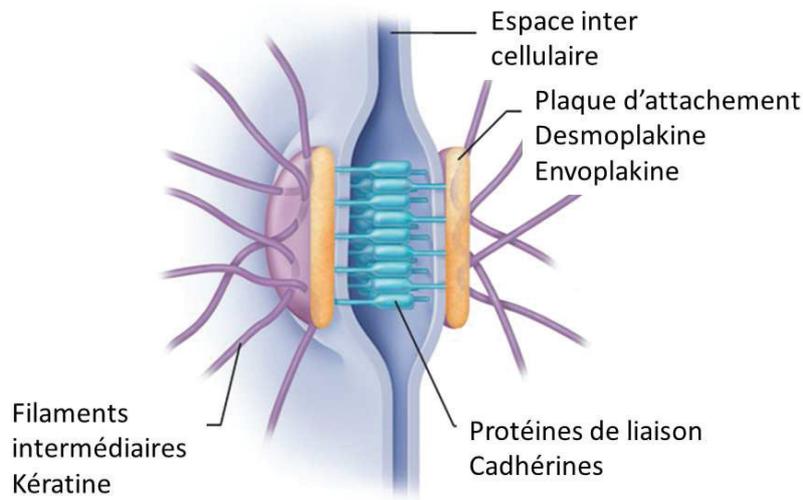


Figure 6. Schéma d'un desmosome d'après (Antranik 2011)

## 2. Les lipides du stratum corneum : rôle majeur dans la fonction barrière de la peau

Les lipides du *stratum corneum* ont deux principales origines. La majorité des lipides de surface de l'épiderme est d'origine sébacée. Du fait de l'activité holocrine des glandes sébacées, leur produit de sécrétion, le sébum, est libéré à la surface de la peau. Les lipides provenant des kératinocytes, représentent une fraction insignifiante de la totalité des lipides de surface extractibles car ils vont préférentiellement remplir les espaces entre les cornéocytes (Greene et al. 1970). Cependant, Sheu et al ont montré qu'il y avait un véritable mélange entre ces deux origines de lipides. Des fragments de structures lamellaires provenant des lipides intercornéocytaires se retrouvent dans le sébum de surface et certaines quantités de sébum se retrouvent entre les cornéocytes dans les couches les plus superficielles (Sheu et al. 1999). L'étude physicochimique du film lipidique de surface est importante pour la compréhension de la fonction de protection du SC.

## ***2.2. Les lipides du sébum, composants majeurs du film hydrolipidique de surface de la peau***

Le film hydrolipidique correspond au manteau acide (pH compris entre 4 et 5,5) qui recouvre la peau. C'est un mélange de sueur composée d'eau, de sels, de l'acide lactique, de substances issues du processus de cornification (acides aminés urée et acide pyrrolidone carboxylique), des cornéocytes desquamants, des peptides antimicrobiens synthétisés par les glandes sudoripares (défensines, dermicides) et enfin d'eau provenant des couches profondes et de sébum.

Le sébum est composé majoritairement de triglycérides (TG) de type oléique (45-50%) qui lui confèrent sa fluidité et qui participent également à l'hydratation de la peau. Les TG du sébum sont métabolisés en glycérol et acides gras libres (AGL) par des lipases. Une diminution du glycérol dans les zones où il y a une activité réduite des glandes sébacées, induit une diminution de l'hydratation de la peau (Fluhr et al. 2003; Choi et al. 2005). Il est également composé d'acides gras libres (10-25%) provenant de la décomposition des TG et participant à l'acidification du stratum corneum. Cet environnement acide est essentiel au bon fonctionnement des enzymes du SC (Feingold 2007). Des cires et des acides gras spécifiques des cellules sébacées tels que l'acide sapiénique et l'acide sébaléique ne sont produits par aucun autre type cellulaire (20-25%). Ils agissent comme une couche protectrice, car ils sont plus résistants à l'oxydation, l'hydrolyse ou la chaleur que les TG. De plus ils permettent une forte étanchéité à l'eau, lors d'hydratation excessive comme dans un bain. Le sébum est aussi composé de squalène (5-10%) qui est un précurseur du cholestérol. C'est aussi un lubrifiant naturel. On trouve enfin du cholestérol estérifié (<5%). La Figure 7 montre la structure chimique des différents composants du sébum.

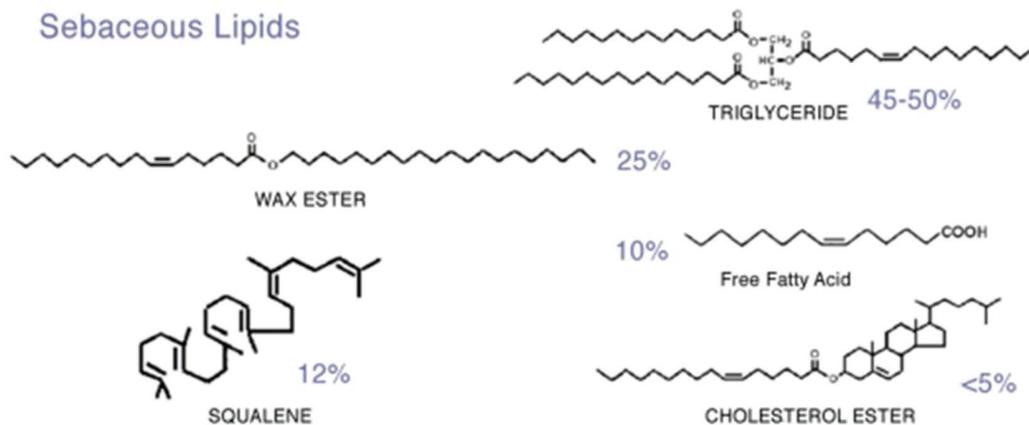


Figure 7. Structure chimiques des différents composés du sébum d'après (Pappas 2009).

### 2.3. Les lipides intercornéocytaires

Les lipides constituant la matrice extracellulaire du SC ont une composition unique et sont très différents des lipides qui constituent la plupart des membranes biologiques. Ils jouent un rôle fondamental dans la structure de l'épiderme et de ses fonctions. Les lipides intra-épidermiques sont composés des espèces suivantes : 45-50% de céramides (CER), 25% de cholestérol (CHOL) et 10 à 15% d'acides gras libres (AGL). Les quantités de TG, cholestérol sulfate et autres composants non polaires sont inférieures à 5% (Rawlings 2003). Cette composition lipidique varie du SG à la surface de la peau.

#### 2.3.2. Synthèse des lipides intercornéocytaires

La Figure 8 résume les différentes étapes de synthèse des lipides et protéines participant à la formation de l'enveloppe cornée et à la barrière cutanée.

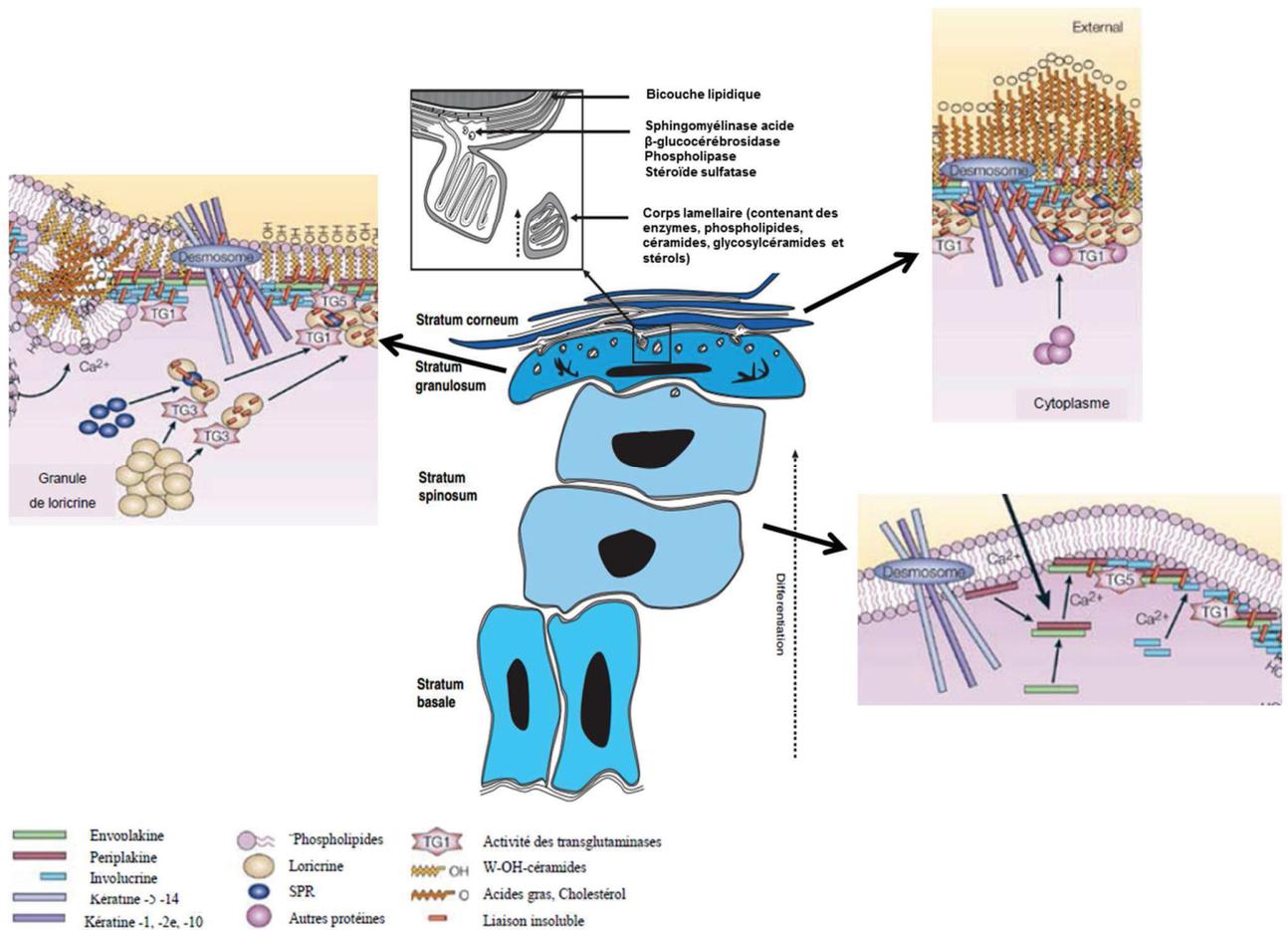


Figure 8. Représentation schématique de la formation de l'enveloppe cornée et des corps lamellaires, lipases et lipides intercornéocytaires d'après (Candi, Schmidt, and Melino 2005; Prosch, Brandner, and Jensen 2008)

C'est au niveau de l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée que les corps d'Odland migrent à la périphérie des kératinocytes, fusionnent avec la membrane plasmique et déversent leur contenu lipidique et enzymatique. Après la sécrétion dans l'espace intercellulaire, une partie des précurseurs lipidiques va participer à l'élaboration de l'enveloppe lipidique extracellulaire, nécessaire pour faire le lien entre le milieu intra et extra cellulaire. L'autre partie des précurseurs s'auto-organise en lamelles, alignées parallèlement aux membranes cellulaires des cornéocytes grâce à l'action d'enzymes, l'enveloppe lipidique des cornéocytes servant de support. Ces lipides lamellaires permettent de remplir les espaces intercornéocytaires, ils représentent 14% du poids sec du SC (Elias 1996).

Les lipides intercorneocytaires sont essentiels pour la fonction barrière. Ceci est mis en évidence dans une pathologie, nommée l'ichtyose arlequin, où de sévères mutations du transporteur ABCA12, nécessaire à la formation des corps lamellaires, existent. Elles ont pour conséquence la présence de corps lamellaires anormaux et donc d'une matrice lipidique extracellulaire anormale engendrant des troubles considérables de la perméabilité de la fonction barrière, souvent fatals pendant l'enfance (Hovnanian 2005; Akiyama et al. 2005).

La composition du ciment lipidique varie en fonction de la profondeur dans le SC (Tableau 2).

*Tableau 2. Variation de la composition lipidique durant la différenciation épidermique et la cornification. D'après (Elias 1983).*

<b>Fraction</b>	<b>Strata basale/spinosum (n=5)</b>	<b>Stratume granulosum (n=7)</b>	<b>Stratum corneum (n=4)</b>
<b>Lipides polaires</b>	44.5 ± 3.4	25.3 ± 2.6	4.9 ± 1.6
<b>Cholesterol sulfate</b>	2.6 ± 3.4	5.5 ± 1.3	1.5 ± 0.2
<b>Lipides neutres</b>	51.0 ± 4.5	56.5 ± 2.8	77.7 ± 5.6
<b>Stérois libres</b>	11.2 ± 1.7	11.5 ± 1.1	14.0 ± 1.1
<b>Acides gras libres</b>	7.0 ± 2.1	9.2 ± 1.5	19.3 ± 3.7
<b>Triglycérides</b>	12.4 ± 2.9	24.7 ± 4.0	25.2 ± 4.6
<b>Stérol/cires estérifiées</b>	5.3 ± 1.3	4.7 ± 0.7	5.4 ± 0.9
<b>Squalène</b>	4.9 ± 1.1	4.6 ± 1.0	4.8 ± 2.0
<b>n-Alkanes</b>	3.9 ± 0.3	3.8 ± 0.8	6.1 ± 2.6
<b>Sphingolipides</b>	7.3 ± 1.0	11.7 ± 2.7	18.1 ± 2.8
<b>Glucosylcéramides</b>	3.5 ± 0.3	5.3 ± 0.2	Trace
<b>Céramides</b>	3.8 ± 0.2	8.8 ± 0.3	18.1 ± 0.4
<b>Total</b>	99.1	101.1	99.3

En effet, il se produit une série de modifications des lipides précurseurs dues aux différentes enzymes présentes dans les corps lamellaires (Tableau 3 et Figure 9). Les phospholipases sont responsables de la conversion des phospholipides en AGL et glycérol (Mao-Qiang et al. 1995; Mao-Qiang et al. 1996). La  $\beta$ -glucocérébrosidase convertit les glucosylcéramides en céramides (Holleran, Ginns, et al. 1994; Holleran, Takagi, et al. 1994) et la sphingomyélinase acide convertit les sphingomyélines en céramides (Jensen et al. 1999; Schmuth et al. 2000).

Tableau 3. Enzymes hydrolytiques de l'espace intercornéocytaire. (d'après Haftek, 2002)

Enzymes	Conversion du substrat
<i>Hydrolases</i> lipase acide phospholipase A2 (PLA2) triacylglycérol lipase	Triglycérides et phospholipides   → AGL
<i>Sulfatases</i> Stéroïde sulfatase	Sulfate de cholestérol  → CHOL
<i>Glycosidases</i> B-glucocérébrosidase	Glucosylcéramides  → CER
<i>Céramidases</i> Sphingomyélinase acide	Sphingomyéline  → CER

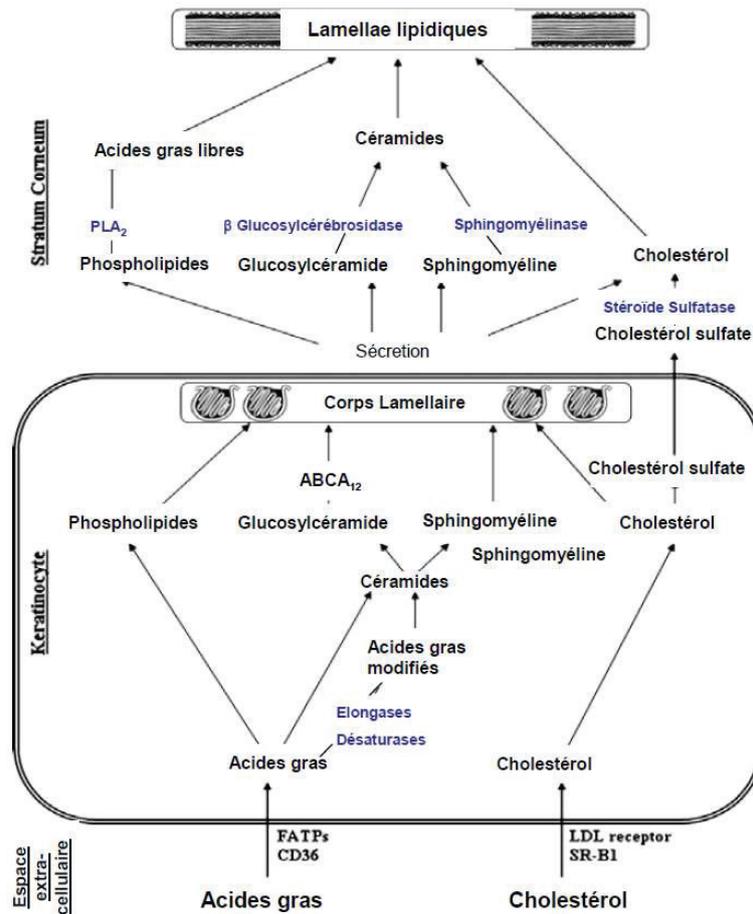


Figure 9. Synthèse des lipides du ciment intercornéocytaire. D'après (Feingold 2007). Les enzymes sont en bleu.

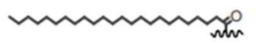
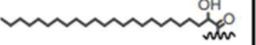
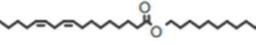
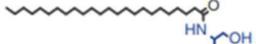
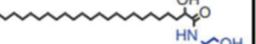
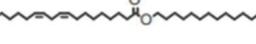
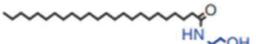
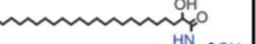
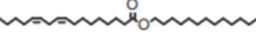
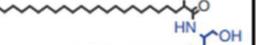
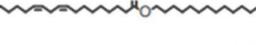
Ces enzymes sont primordiales pour le bon fonctionnement de la barrière cutanée. Leur rôle est mis en évidence par l'observation de certaines pathologies liées à leur absence ou leur inactivité. La maladie de Gaucher, causée par une déficience en  $\beta$ -glucocérébrosidase et la maladie de Niemann-Pick causée par une déficience de la sphingomyélinase acide, conduisent à une anomalie de la fonction barrière due à la non conversion des lipides précurseurs en céramides (Holleran, Ginns, et al. 1994; Schmuth et al. 2000). Mao-Qiang et al. ont montré qu'une inhibition de la PLA2 conduit également à une perturbation de la fonction barrière (Mao-Qiang et al. 1995; Mao-Qiang et al. 1996). Enfin le rôle de la stéroïde sulfatase a été mis en avant par l'étude de l'ichtyose liée à X. Cette pathologie est associée à une large quantité d'écailles sur la peau et l'on retrouve une quantité dix fois plus importante en cholestérol sulfate, car l'enzyme est non fonctionnelle dans cette maladie (Zettersten et al. 1998). De plus, Sato et al. ont démontré que le cholestérol sulfate inhibe des protéases telles que la trypsine, impliquée dans le processus de dissolution des desmosomes nécessaire pour le phénomène de desquamation, et en conséquence, il participe à la formation d'une structure écailleuse anormale à la surface de la peau (Sato et al. 1998).

### 2.3.3. Les céramides

Les céramides sont des lipides complexes appartenant à la classe des sphingolipides. Ils se présentent sous la forme d'une longue chaîne d'acide gras liée par une liaison amide à une base sphingoïde.

Dans le SC, on distingue depuis très récemment 12 classes de céramides (Smeden et al. 2014). La partie acide gras des céramides comprend en moyenne 16 à 30 atomes de carbones, sachant que les plus abondants ont 24 à 26 atomes de carbone (Bouwstra and Ponc 2006). Ces chaînes d'acides gras peuvent être non hydroxylées (N),  $\alpha$ -hydroxylées (A) ou  $\omega$ -hydroxylées (O) et estérifiées par un deuxième acide gras (typiquement un acide gras essentiel tel que l'acide linoléique) pour former des O-acylcéramides (EO). La base sphingoïde peut, quant à elle, être di- ou tri-hydroxylée ; elle est représentée par la sphingosine (S), la dihydrosphingosine (DS), la phytosphingosine (P) et la 6-hydroxysphingosine (H). Une céramide va donc résulter de la combinaison d'une de ces 3 bases d'acide gras avec une des 4 bases sphingoïdes, comme le montre le Tableau 4 ci-dessous (Masukawa et al. 2008).

Tableau 4. Structure des différentes classes de céramides existant dans le SC (d'après Smeden et al. 2014).

	Non-hydroxy fatty acid, [N]	$\alpha$ -hydroxy fatty acid, [A]	Esterified $\omega$ -hydroxy fatty acid, [EO]
Dihydrosphingosine, [dS]	 [NdS] (10)	 [AdS] (11)	 [EOdS]
Sphingosine, [S]	 [NS] (2)	 [AS] (5)	 [EOS] (1)
Phytosphingosine, [P]	 [NP] (3)	 [AP] (6)	 [EOP] (9)
6-hydroxy sphingosine, [H]	 [NH] (8)	 [AH] (7)	 [EOH] (4)

La Cer EOdS n'a été retrouvée que très récemment par Smeden et al. (Smeden et al. 2011).

Deux types de nomenclatures existent. L'ancienne nomenclature est basée sur la polarité des céramides en chromatographie sur couche mince, la céramide 1 étant la moins polaire. Une nouvelle nomenclature a été proposée par Motta en 1993, se basant sur leur structure chimique (Motta et al. 1993).

Selon les travaux d'Hamanaka et al. et d'Uchida et al., l'ensemble des classes de céramides aurait pour précurseur les glucosylcéramides à l'exception de la NS (CER 2) et de l'AS (CER 5) qui proviendraient majoritairement de la sphingomyéline (Hamanaka et al. 2002; Uchida et al. 2000).

Dans le stratum corneum, les acylcéramides Cer 1 (EOS), Cer 4 (EOH) et Cer 9 (EOP) ont une structure moléculaire très particulière avec une chaîne de 30 à 32 atomes de carbone due à l'acide linoléique qui est lié par une liaison ester à l'acide gras  $\omega$ -hydroxylé. Ces acylcéramides sont des transporteurs essentiels de l'acide linoléique dans le SC. Une déficience en acide gras essentiel entraîne une déficience de la fonction barrière. En effet cet acide gras de par sa structure va permettre aux acylcéramides de s'ancrer dans les couches lipidiques voisines réalisant ainsi de véritables rivetages moléculaires, responsables de la cohésion et de la consolidation du ciment lipidique. Les maladies entraînant un déficit en  $\omega$ -O-acylcéramides telles

que l'ichtyose arlequin sont responsables de troubles considérables de la fonction barrière (Mizutani et al. 2009).

De plus, une partie des glycosylcéramides  $\omega$ -hydroxylées reste au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes et subit une déglucosylation suivie d'une estérification. Au cours de cette dernière réaction les céramides se lient à l'involucrine, protéine de l'enveloppe cornée, et forment ainsi une enveloppe lipidique autour du cornéocyte. Cette enveloppe lipidique pourrait servir de base pour la formation des structures multilamellaires intercornéocytaires, et jouerait un rôle dans le maintien de ces structures en connectant les cornéocytes à la matrice lipidique multi lamellaire. Meguro et al. ont montré que ces céramides liées à l'enveloppe cornée étaient importants pour la formation de la matrice lipidique et l'efficacité de la fonction barrière (Meguro et al. 2000). D'après Wertz et al., ce sont des bases sphingosine et 6-hydroxysphingosine qui composent ces céramides de l'enveloppe (Wertz, Madison, and Downing 1989).

Suite à l'observation d'une diminution du taux de Cer (EOS) dans la peau sèche par Imokawa et al., Bouwstra et al. ont étudié le rôle clé de la Cer (EOS) et de la Cer (EOH) et plus particulièrement de la présence d'acide linoléique, dans l'organisation de la matrice lipidique. Il a été alors démontré l'importance de ces céramides dans la formation des phases à longue périodicité qui seront décrites ultérieurement (Imokawa et al. 1991; Bouwstra et al. 1998).

Les céramides à base sphingosine présentent en général une organisation cristalline orthorhombique qui permet une imbrication très dense des céramides (Rerek et al. 2001), comparativement aux bases phytosphingosine qui sont responsables d'une organisation hexagonale. Dans certaines pathologies de la peau affectant la barrière épidermique telles que le psoriasis ou la dermatite atopique, on constate une prédominance des céramides à base sphingosine au détriment de celles avec une base phytosphingosine (Mizutani et al. 2009). L'importance de l'organisation de la matrice lipidique sur la fonction barrière de la peau sera décrite ultérieurement.

De plus il a été montré qu'une perturbation de la barrière cutanée, stimulait la synthèse de sphingolipides. Cependant celle-ci est décalée dans le temps par rapport à la synthèse des autres lipides majeurs de la matrice intercornéocytaire à savoir le cholestérol et les acides gras libres. Ces observations ont permis de mettre en évidence le rôle clé de la synthèse des céramides épidermiques dans les dernières phases de réparation de la perméabilité de la barrière cutanée (Elias 1996; Feingold 2007).

#### 2.3.4. Le cholestérol

Le cholestérol est le stérol majeur de l'épiderme et a son importance dans la fonction barrière de la peau. La synthèse du cholestérol est un processus complexe dont l'une des enzymes clef est l'HMG-CoA réductase. L'importance de la synthèse du cholestérol dans la réparation de la fonction barrière est illustrée par des expériences chez les souris, où une application topique de l'inhibiteur de l'HMG-CoA réductase provoque un retard dans la réparation immédiate de la fonction barrière après sa perturbation par l'acétone. Cependant des résultats divergents ont été observés lors de l'ajout d'enzymes régulant les céramides, tel que la  $\beta$ -chloroalanine (BCA), inhibant la serine palmitoyl transférase, enzyme importante dans la synthèse des sphingolipides. En effet, le traitement unique soit par l'inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, soit par la BCA provoque respectivement un retard dans la réparation immédiate et retardée de la fonction barrière. Cependant le traitement simultané par ces deux inhibiteurs n'aggrave pas, d'une part, le retard dans la réparation immédiate et de plus stimule la réparation retardée. L'inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, en inhibant la réparation de la barrière, stimulerait la synthèse de sphingolipides (Mao-Qiang, Feingold, and Elias 1993).

Pour Laugel et al., le cholestérol semble s'intercaler entre les longues chaînes hydrocarbonées des céramides et des acides gras libres et favoriser à la fois la séparation des chaînes hydrocarbonées et le rapprochement des groupements polaires des lipides. Ainsi, il contribuerait indirectement à la formation d'interactions polaires telles que des liaisons hydrogènes et stabiliserait l'organisation des lipides au sein des bicouches lipidiques (Laugel, Yagoubi, and Baillet 2005). Selon Norlén, la barrière cutanée doit être aussi homogène que possible pour maintenir une bonne efficacité. Ceci ne peut être obtenu que par l'hétérogénéité de la composition lipidique du SC, faisant apparaître des zones de transitions de phases. Les lipides sont dans un arrangement cristallin flexible et modelable stabilisé par le cholestérol et rendu possible par l'hétérogénéité dans la distribution des longueurs des chaînes des céramides et acides gras (Norlén 2001). Pour Wertz, le cholestérol est capable aussi bien de fluidifier des domaines membranaires que de les rendre plus rigides. Dans le SC, il pourrait fournir un degré de fluidité à la matrice lipidique tout en la stabilisant, ce qui est nécessaire pour la flexibilité de la peau (Wertz 1999).

Le sulfate de cholestérol est également présent au niveau de la couche cornée et comme indiqué précédemment, son métabolisme à la surface cutanée a un rôle majeur dans la régulation de la desquamation. Le sulfate de cholestérol est considéré comme une véritable

« glue » des cellules de la couche cornée. Il améliore également la solubilité du cholestérol à l'intérieur des phases lamellaires d'après Bouwstra et al (Bouwstra et al. 2001).

### 2.3.5. Acides gras libres

La troisième classe lipidique la plus abondante est celle des acides gras libres. Leur longueur de chaîne varie de 16 à 36 atomes de carbones mais les plus abondants sont les acides gras saturés à longues chaînes (24, 26 et 28 carbones). Les acides gras semblent avoir un rôle important dans l'établissement de la fonction barrière de la peau. Ils s'intercalent totalement entre les lipides des phases lamellaires et grâce à leurs longues chaînes hydrocarbonées, ils rendent la structure plus dense. Grâce à leurs structures similaires aux céramides du SC, en tige ou de forme cylindrique, les AGL se mélangent préférentiellement à ceux-ci et très peu au cholestérol, formant des domaines très ordonnés (Wertz 1999; de Jager et al. 2004; Gooris and Bouwstra 2007).

Une perturbation dans la longueur des chaînes des acides gras a un impact sur la fluidité de la matrice lipidique. En effet, des acides gras libres à courtes chaînes perturbent la structure lamellaire des lipides de la peau, comme l'ont montré Groen et al (Groen et al. 2011). Ceci pourrait expliquer le fort potentiel des acides gras (en particulier l'acide oléique) comme promoteur d'absorption (Williams and Barry 2012).

De plus, les acides gras ont un rôle prépondérant concernant la barrière chimique de la peau. Ils contribuent à l'acidification du SC et permettent d'avoir un pH entre 4 et 5,5. Cet environnement acide est essentiel à l'activité de beaucoup d'enzymes du SC (Feingold 2007).

### 2.3.6. L'organisation lipidique

Les lipides de la matrice inter-cornéocytaire s'auto-organisent spontanément en multicouches et s'intercalent en un film continu, parallèlement aux parois cellulaires des cornéocytes, en prenant comme base l'enveloppe cornée (Haftik 2003). Cette organisation a été étudiée de façon approfondie dans la littérature à cause de son importance dans le bon fonctionnement de la fonction barrière.

Deux types d'organisation ont été décrits, une organisation lamellaire (axe z), et une organisation latérale (axes x,y). (Figure 10).

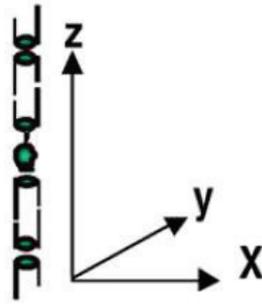


Figure 10. Organisation des lipides selon les trois directions de l'espace (d'après Bouwstra and Ponc 2006)

### L'organisation lamellaire

Les premières observations de la structure lamellaire des lipides matriciels ont été réalisées en 1987 par Madison et al. Ils ont utilisé la microscopie électronique à transmission avec une fixation des lipides au ruthenium tetroxide (bien qu'il soit extrêmement toxique pour les protéines structurales). Ils ont montré que les lipides s'arrangeaient dans un schéma répétitif de bandes transparentes aux électrons en une séquence de bandes larges/étroites/larges (Figure 11).

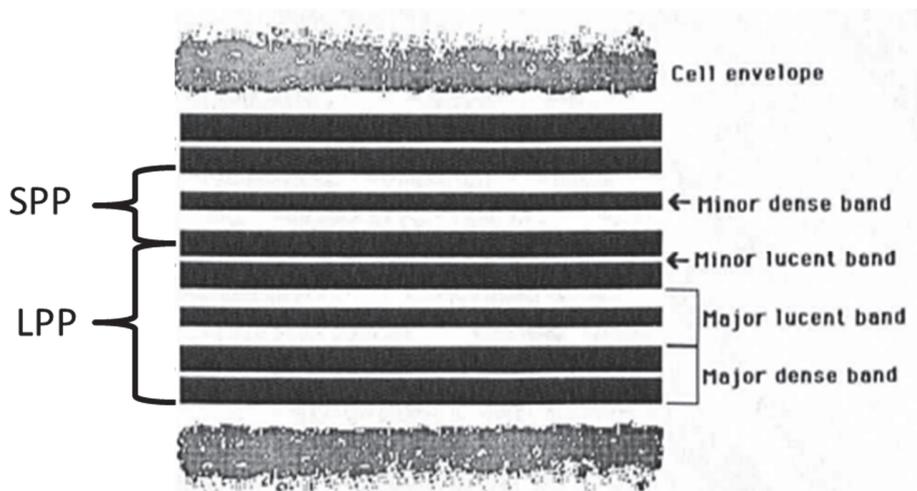


Figure 11. Schéma de l'agencement des lipides de l'espace intercellulaire (d'après Madison et al. 1987)

Avec la technique de diffraction des rayons X aux petits angles, cet agencement lamellaire a été précisé sur la peau de souris, puis de cochon et enfin humaine (White, Mirejovsky, and King 1988; Bouwstra et al. 1991; Bouwstra et al. 1995). Les couches lipidiques se superposent et

établissent un réseau fonctionnel où les lipides s'organisent selon un schéma répétitif. Ils se positionnent selon deux phases lamellaires cristallines qui se différencient par leur période. On distingue la phase présentant une courte période d'environ 6 nm (Short Periodicity Phase, SPP) et une deuxième phase présentant une longue période d'environ 13 nm (Long Periodicity Phase, LPP). La LPP correspond à la succession d'une bande large, étroite, puis large observée au microscope électronique. Dans cette structure les bandes larges correspondent à des zones où les lipides s'organisent dans des domaines cristallins ordonnés tandis que la bande étroite contient des lipides en phase fluide (Bouwstra and Ponec 2006), (Figure 12). La SPP correspond à une seule bicouche lipidique.

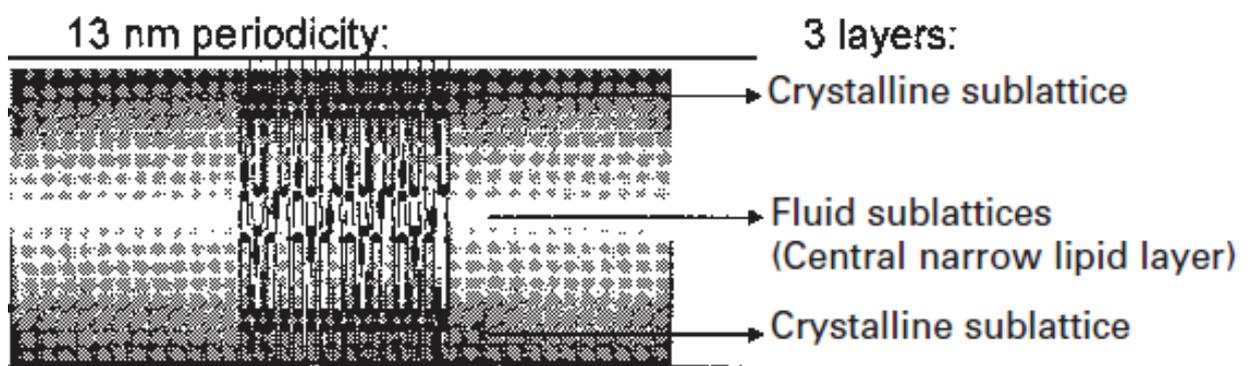


Figure 12. Arrangement des lipides en LPP (d'après Bouwstra et al. 2000)

### L'organisation latérale

Grâce à différentes méthodes comme la diffraction des rayons X aux grands angles (WAXD) ou la spectroscopie infrarouge, l'agencement latéral des lipides a pu être mis en évidence.

Les lipides cutanés peuvent s'organiser selon trois phases (Figure 13) :

- orthorhombique (OR). La totalité des chaînes aliphatiques adoptent une conformation *trans* et est organisée en une structure cristalline rectangulaire. Les molécules sont très rapprochées et forment une structure assez dense rendant les phases lamellaires très faiblement perméables à l'eau.
- hexagonale (HEX). Les conformations *trans* des chaînes aliphatiques adoptent une inclinaison tout en conservant une structure cristalline ordonnée assez dense mais légèrement moins compacte que l'OR.

- cristalline liquide (LIQ), Les chaînes présentent un haut degré d'isomérisation gauche et ont perdu leur organisation latérale, cette structure est beaucoup moins dense et hautement perméable.

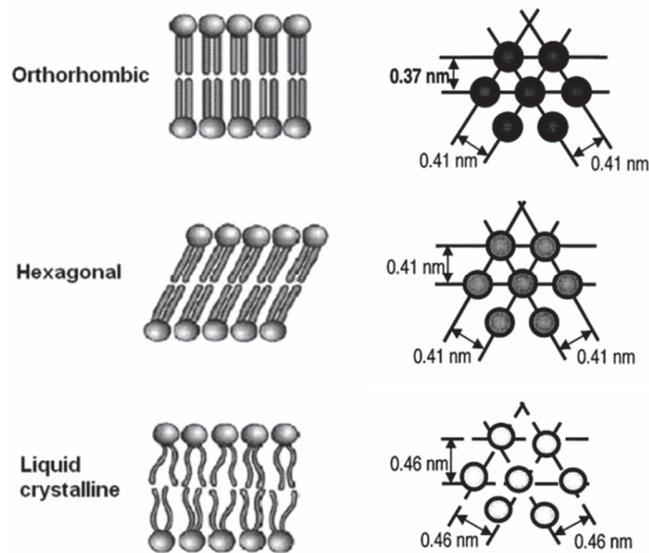


Figure 13. Organisation conformationnelle et latérale des lipides (d'après Pilgram et al. 1999; Rodríguez et al. 2009)

Pilgram et al. ont montré, grâce à une technique de diffraction des électrons que les lipides de la couche cornée sont majoritairement organisés selon la phase orthorhombique, excepté dans les couches supérieures où l'on voit apparaître des phases hexagonales (Pilgram et al. 1999). Ceci est en accord avec les observations de Bouwstra et al par la diffraction des rayons X aux grands angles (WAXD). Rappelons que Sheu et al. ont montré que certaines quantités de sébum se retrouvent entre les cornéocytes dans les couches les plus superficielles (Sheu et al. 1999). Bouwstra et al expliquent alors la formation de phases hexagonales en surface par l'impact des lipides des glandes sébacées sur les lipides intercornéocytaires. Ils agissent soit en formant eux-mêmes des phases hexagonales, soit en augmentant la mobilité des chaînes alkyles des lipides matriciels, favorisant ainsi le passage de la phase OR à la phase HEX. On parle alors de fluidification des lipides dans les couches les plus superficielles de la couche cornée. Norlén suggère également la présence d'eau au niveau des têtes polaires des lipides constituant les phases hexagonales (Norlén 2001).

D'après Boncheva et al, ainsi que Bouwstra et al, les lipides peuvent également se présenter sous une phase liquide fluide (LIQ). Cette hypothèse serait en accord avec le modèle LPP et sa séquence bandes large/étroite/large (Boncheva, Damien, and Normand 2008; Bouwstra et al. 2002). Selon Bouwstra et al, cette phase fluide serait indispensable à la formation de LPP.

### **Les différents modèles d'organisation supramoléculaire de la matrice lipidique**

Au cours de ces études concernant l'agencement des lipides matriciels, différents modèles d'organisation ont été proposés pour expliquer au mieux les observations expérimentales, en particuliers l'alternance de bandes claires et sombres.

#### *Le modèle d'empilement de monocouche ou « stacked monolayer model »*

C'est en 1989 que Swartzendruber propose un modèle qui décrit l'arrangement moléculaire des lipides en LPP pour la première fois. Ce modèle décrit un empilement de monocouches où les lipides ont un arrangement lamellaire. Les céramides sont organisées dans un plan avec des interdigitations entre les chaînes alkyles ayant une conformation étirée et dépliée. Le fragment linoléique de la Cer EOS, n'est pas localisé dans la bande étroite mais est réparti aléatoirement dans les deux bandes larges adjacentes aux deux côtés de la bande étroite. De plus, le cholestérol est dans le même plan que les céramides, réparti entre les différentes couches. L'arrangement proposé, est schématisé dans la Figure 14 (Swartzendruber et al. 1989).

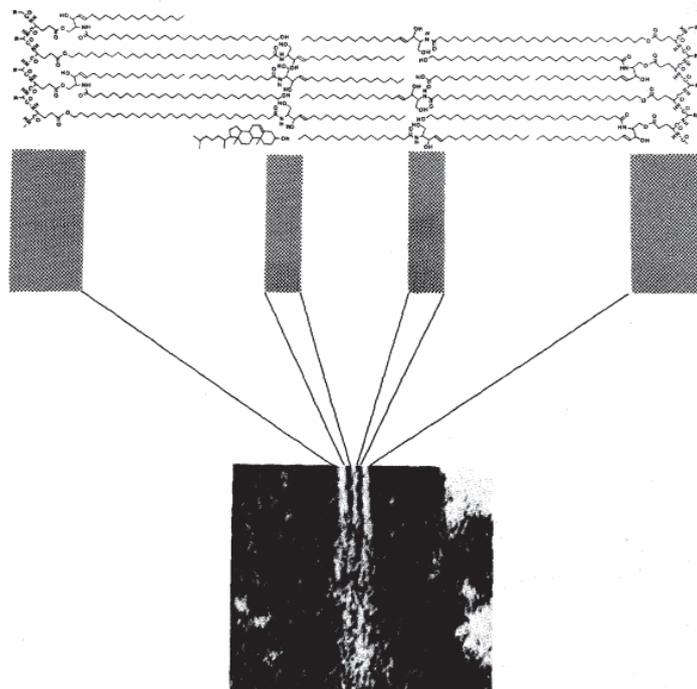


Figure 14. Schéma de l'arrangement en empilement de monocouche, (d'après Swartzendruber et al. 1989).

*Le modèle du domaine mosaïque ou « domain mosaic model »*

En 1994, pour la première fois, Forslind propose un modèle en tenant compte de la présence de phases liquides dans le SC. Il décrit ce modèle comme un système multilamellaire à deux phases : un domaine lamellaire cristallin très ordonné et condensé sous forme OR ou HEX discontinue, entouré par une phase cristalline continue. La diffusion des substances hydrophiles et hydrophobes est permise grâce au caractère fluide de la zone continue (Forslind 1994). Ce modèle est schématisé dans la Figure 15.

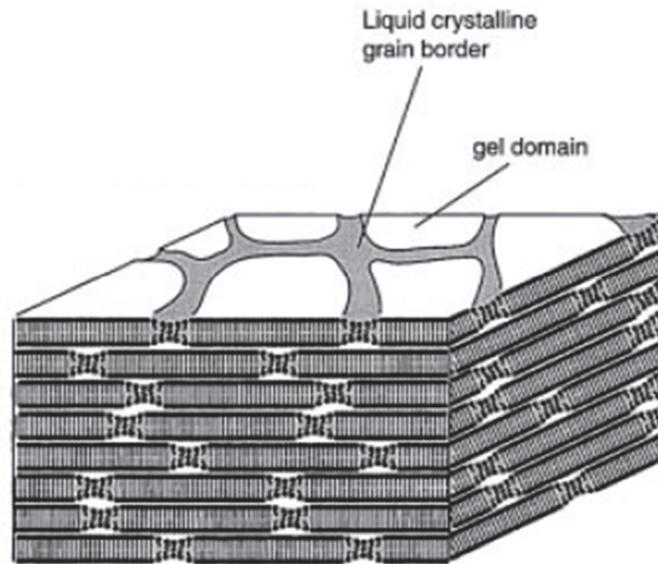


Figure 15. Schéma du modèle mosaïque de Forslind (d'après Norlén 2001)

#### *Le modèle sandwich ou « sandwich model »*

Ce modèle, proposé par Bouwstra et al., est en accord avec le motif de la LPP (bande large/étroite/large). Les deux couches larges de la LPP ont une structure cristalline solide. Elles sont séparées d'une fine couche centrale de lipides en phase liquide, formée principalement par les longues chaînes des céramides EOS, comportant un acide linoléique, par la Cer AS et par le cholestérol. Concernant les bandes larges, la cristallinité augmente progressivement suite à la présence de longues chaînes hydrocarbonées, saturées et peu mobiles. Seule une petite fraction de lipides forme la phase fluide, on peut penser que la couche fluide n'est pas continue mais qu'elle contient des domaines fluides distribués. Les substances pour pénétrer dans le SC, doivent traverser la région cristalline et diffuser à travers la région lipidique moins compacte, ce système permet de maintenir la fonction barrière de la peau (Bouwstra et al. 2000).

#### *Le modèle de la phase gel simple ou « single gel phase model »*

Norlén explique que pour être une barrière efficace, le principal objectif de la matrice lipidique est d'être la plus condensée possible, par conséquent, les transitions d'état physique, les différences de perméabilité entre deux phases, la séparation de phases sont des événements à éviter. La matrice doit être la plus homogène possible, ce qui ne peut être permis que par

l'hétérogénéité de sa composition lipidique. La matrice serait alors une phase gel lamellaire unique, sans frontières ni séparation de phases. Au sein d'une même phase se trouvent mélangées les différentes structures : OR, HEX et LIQ ; avec des transitions HEX-OR simultanées sans perturbations de la structure gel. Contrairement au modèle précédent, les céramides adoptent deux conformations particulières en « épingle » ou déployée. Les chaînes hydrocarbonées des lipides forment des liaisons entre elles, présentent une faible mobilité et procurent une organisation dense (Figure 16). La perméabilité à l'eau et aux petites molécules est donc basse (Norlén 2001). Le modèle de Norlén est schématisé Figure 17.

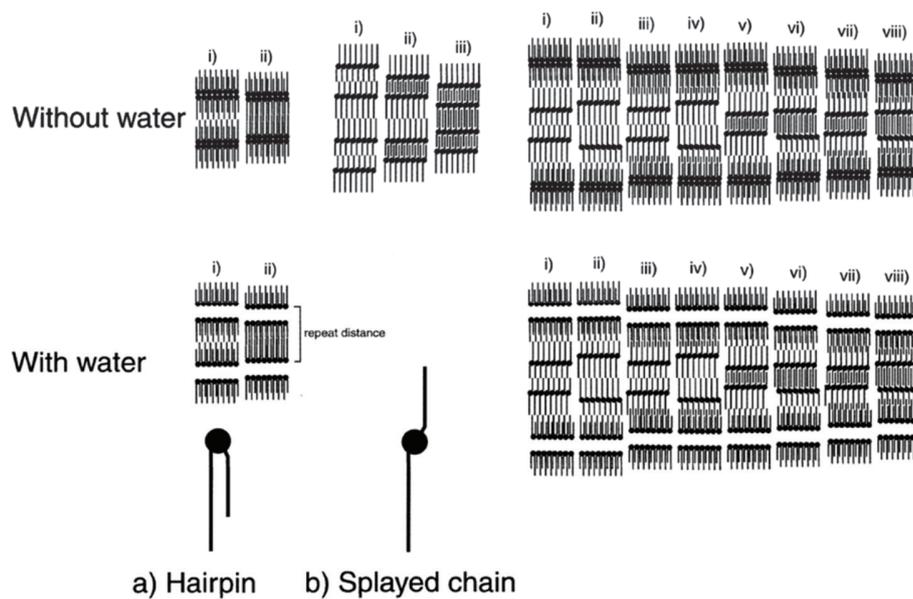


Figure 16. Les différentes conformations possibles des céramides dans le modèle de la phase gel simple (d'après Norlén 2001)

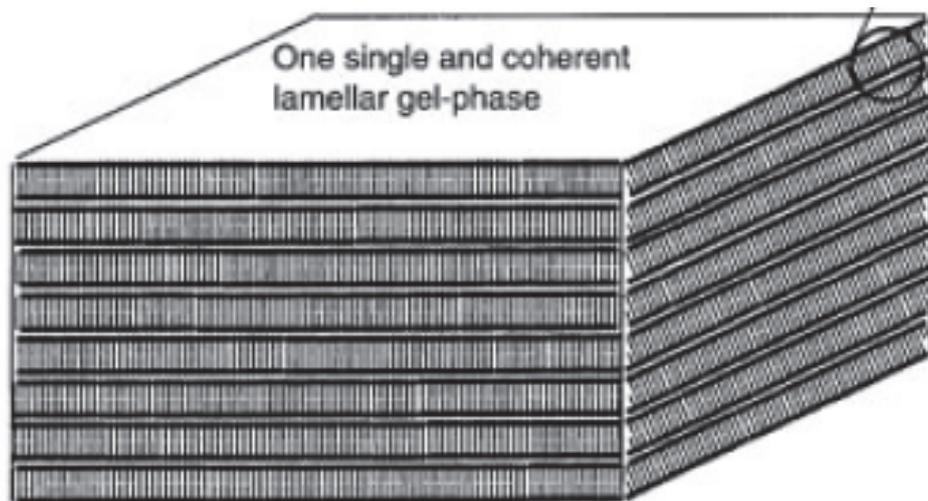


Figure 17. Schéma du modèle de phase gel simple proposé par Norlén (Norlén 2001)

*Le modèle en bicouche asymétrique ou « asymmetric bilayer model »*

McIntosh a quant à lui présenté un modèle en bandes (double bicouche) se répétant avec une période de 13 nm. Le point essentiel de ce modèle est la distribution asymétrique du cholestérol et la largeur identique des deux bandes (McIntosh 2003).

*Le modèle de Schröter et al. 2009*

Plus récemment cette équipe a proposé un modèle basé sur des expériences par diffusion de neutrons. Il consiste en unités lamellaires de même largeur, composées d'un mélange de céramides en conformation étendue et pliée et de cholestérol distribué de façon homogène. Toutes les bandes sont traversées par des chaînes d'acide gras des Cer EOS. (Figure 18).

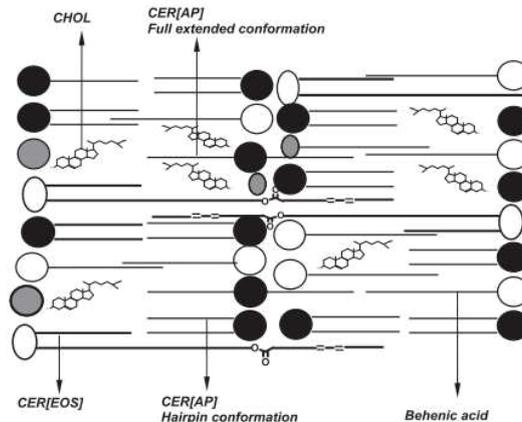


Figure 18. Schéma du modèle de Schröter (d'après Schröter et al. 2009)

Tous ces exemples de modèles montrent que l'arrangement moléculaire des lipides du SC continue de faire débat au sein de la communauté scientifique et reste très étudié. Le dernier modèle en date est proposé par Iwai et al. et propose un système d'empilement de bicouches lamellaires composées de céramides en conformation totalement étendue avec des molécules de cholestérol, associées à des fragments de céramides de base sphingoïde (Iwai et al. 2012).

### L'influence des différentes classes lipidiques sur leur organisation

La structure générale dense et compacte du ciment intercornéocytaire est en partie due à la présence de fortes interactions moléculaires. Il existe des interactions non polaires entre les longues chaînes hydrocarbonées des céramides et des acides gras libres, et des interactions polaires entre les groupements fonctionnels comme les nombreuses liaisons hydrogène au niveau des têtes polaires des céramides (Laugel, Yagoubi, and Baillet 2005).

Chaque classe lipidique contribue à l'organisation de la matrice extracellulaire. Plusieurs études ont montré que le cholestérol et les céramides ont un rôle important dans la formation des deux phases LPP et SPP (de Jager et al. 2004; Gooris and Bouwstra 2007; Bouwstra et al. 2001). Kessner et al et Bouwstra et al s'accordent sur le fait qu'une céramide en particulier semble être indispensable à la formation de la LPP. Il s'agit de la Cer 1 (EOS) qui, grâce à sa longue chaîne d'acide linoléique, est capable de se positionner à l'intérieur d'une phase cristalline et d'aller s'encaster dans une phase voisine, liquide (Kessner et al. 2008; Bouwstra and Ponc 2006). Les acides gras libres jouent également un rôle dans l'organisation latérale des lipides. Ils

favorisent le passage de la phase HEX à la phase OR en augmentant le compactage latéral grâce à leurs longues chaînes. Gooris et al soutiennent que les trois classes lipidiques sont nécessaires à la formation de LPP (de Jager et al. 2004; Gooris and Bouwstra 2007; Bouwstra et al. 2001).

La distribution variée des chaînes hydrocarbonées des céramides et acides gras libres permet un meilleur mélange des lipides lors de la formation de la matrice extracellulaire et également une solubilisation du cholestérol à l'intérieur des phases lamellaires. La stabilité du mélange entre les lipides et donc des phases organisées a été récemment étudiée par Oguri et al. Ils ont montré que la longueur des chaînes alkyles des AGL était primordiale pour une bonne stabilité. Elle est optimale lorsque les chaînes sont longues, proches de celles des céramides (C24) et diminue fortement si les chaînes sont plus courtes (C16) (Oguri et al. 2014). Les acides gras semblent être les principaux acteurs dans l'amélioration de la solubilisation du cholestérol (de Jager et al. 2004; Kessner et al. 2008). Bien que Gooris et al aient montré que certains lipides formaient des domaines à part, comme une quantité mineure d'acides gras libres ainsi que le cholestérol retrouvés sous forme de phases cristallines séparées, l'ensemble n'affecte pas l'organisation lamellaire de la matrice (Gooris and Bouwstra 2007; Joke A. Bouwstra and Ponec 2006).

### **3. Les grandes fonctions de la peau**

#### ***3.1. Le maintien de l'hydratation : les facteurs naturels d'hydratation (NMF)***

Dans des conditions normales, le *stratum corneum* est composé de 15 à 20% d'eau. Les NMF sont des éléments indispensables dans le maintien de l'hydratation de la couche cornée, permettant la rétention d'eau. On les retrouve dans les cornéocytes mais également à la surface de l'épiderme, dans le film hydrolipidique. Ils représentent 20 à 30% du poids sec du SC. Ils ont pour origine la sueur, contenant notamment de l'acide lactique, du sel, des acides aminés et de l'urée, le sébum. Ils proviennent du mécanisme de cornification. En effet, une des principales sources de NMF est la dégradation de la filaggrine, issue de la cornification (Bonté 2011).

Plusieurs éléments composent les NMF tels que les acides aminés, des oses, des ions. La composition chimique moyenne des NMF figure dans le Tableau 5.

Tableau 5. Composition chimique moyenne des NMF (d'après Rawlings and Harding 2004)

<b>Molécules</b>	<b>Composition (%)</b>
Acides aminés libre	40
Acide pyrrolidone carboxylique	12
Lactate	12
Sucres	8.5
Urée	7
Chlorure	6
Sodium	5
Potassium	4
Acide urique, ammoniacque, glucosamine et créatine	1.5
Calcium	1.5
Magnesium	1.5
Phosphate	0.5
Citrate et formate	0.5

Le SC renferme aussi d'autres composants hydratants tels que l'acide hyaluronique et le glycérol.

L'acide hyaluronique est synthétisé par les kératinocytes de la couche basale jusqu'au SC (Sakai et al. 2000). Il provient de la polymérisation d'oses et sa structure particulière lui confère un caractère hydrophile très marqué. Cette molécule est en effet capable d'absorber 1000 fois son poids en eau.

Le glycérol provient, quant à lui, de l'hydrolyse des triglycérides du sébum et de la conversion des phospholipides en acides gras à l'interface SG/SC (Bouwstra et al. 2007). Il est capable d'absorber son poids en eau pendant trois jours. Par ailleurs, le glycérol interagit avec les structures lipidiques et protéiques en favorisant l'établissement de liaisons hydrogènes. Il permet une expansion intra et intercellulaire des cornéocytes, améliorant les propriétés barrières de la peau (Fluhr, Darlenski, and Surber 2008).

Ces NMF et autres composants hydratants, sont les facteurs principaux de l'hydratation cutanée. En effet, l'hypothèse expliquant la capacité des structures lipidiques à absorber une grande quantité d'eau (Imokawa and Hattori 1985) a été réfutée par Cornwell en 1994, qui a étudié l'effet de l'hydratation sur les lipides intercellulaires du stratum corneum par diffraction

des rayons X aux grands angles. L'hydratation n'a selon lui aucun effet sur la structure lipidique. La quantité d'eau présente dans la matrice lipidique est bien inférieure à celle présente dans les cornéocytes, sièges de la localisation du NMF (Cornwell et al. 1994). Il a été également observé que sur une peau présentant une sécheresse provoquée par des détergents ou par tape-stripping (méthode permettant de retirer de façon séquentielle les couches les plus superficielles de la peau, très utilisée dans l'évaluation de la fonction barrière), la quantité totale des céramides ne changeait pas contrairement à la conductance de la peau (représentatif de son hydratation et à la quantité des acides aminés qui elles diminuaient (Denda et al. 1992). De plus, récemment Berthaud et Boncheva ont montré qu'il y avait un lien entre la perte insensible en eau (PIE) et l'organisation lipidique (intégrité de la barrière) mais qu'il n'y avait pas de lien entre l'intégrité et la cohésion de la barrière, elle liée au degré d'hydratation du SC (Berthaud and Boncheva 2011). L'ensemble de ces études montrent que l'hydratation cutanée est régie en priorité par les NMF et les autres composants hydratants, la barrière lipidique n'arrivant qu'en second plan.

### ***3.2. L'organisation lipidique, quel lien avec la fonction barrière ?***

#### **3.2.1. Lipides de surface**

La séborrhée participe à la lutte contre la déshydratation de la couche cornée et aux qualités de confort et de toucher de l'épiderme (Pappas 2009).

Cependant Abrams et al. nient la contribution du sébum dans la fonction imperméable de la barrière en montrant que l'extraction du sébum par l'acétone n'affecte pas la fonction barrière contrairement à l'extraction de céramides, cholestérol et d'acides gras libres (AGL) constitutifs des lipides intercornéocytaires par des mélanges de solvants comme les mélanges chloroforme/méthanol (Abrams et al. 1993). Le sébum aurait plutôt une action hydrofuge due au squalène qu'il contient (Stewart and Downing 1991). Pourtant récemment, Gorcea et al. ont montré via des expériences sur le visage couplant des mesures de PIE et de spectroscopie infrarouge après des tape stripping, que le sébum avait un rôle bénéfique sur la fonction barrière et particulièrement sur sa réparation, permettant de limiter la perte en eau (Gorcea et al. 2013). D'autres fonctions lui ont été attribuées, comme une action antioxydante due à sa forte concentration en  $\alpha$ -tocophérol et à la propriété du squalène de piéger les radicaux peroxydes (Chiba et al. 1999; Thiele, Weber, and Packer 1999). Metze et al ont aussi suggéré que les

glandes sébacées sécrétaient de l'immunoglobuline A, jouant un rôle important contre l'invasion de virus (Metze et al. 1989).

### 3.2.2. Lipides intercornéocytaires

La phase OR, qui est la phase la plus dense, est considérée par la plupart des auteurs comme un point clef de l'efficacité de la fonction barrière. Elle a donc été beaucoup étudiée.

Boncheva et al en 2010, décident de mener *in vivo*, sur 70 volontaires, une expérience pour évaluer la relation entre l'organisation HEX ou OR du SC et la perte insensible en eau (PIE), mesure caractéristique dans de nombreux articles de l'efficacité de la fonction barrière. Pour cela, ils ont fait des analyses par spectroscopie infrarouge à différentes profondeurs du SC *via* un tape stripping séquentiel. La phase OR, est présente à toutes les profondeurs du SC. Par opposition au modèle de gel phase décrit par Norlén (§ 3.2.3), les phases LIQ et HEX sont également présentes. La valeur maximale d'un paramètre évaluant l'importance de la phase OR, est observée dans une zone où la PIE est la plus faible. Une corrélation entre la PIE et la phase OR est démontrée via cette expérience (Damien and Boncheva 2010).

Cependant, Groen et al. en 2011, n'ont pas eu la même conclusion concernant l'importance de la phase OR sur la fonction barrière en étudiant un autre paramètre : la perméabilité à l'acide benzoïque.

Ils ont, pour réaliser cette expérience, utilisé des modèles de SC humain, appelés les substituts de SC (SCS) qui miment parfaitement le SC humain aussi bien sur l'organisation lamellaire (LPP et SPP) que sur l'agencement latéral des chaînes lipidiques (OR, HEX et LIQ). Un des SCS a été modifié dans sa composition pour ne présenter que des phases HEX grâce à un mélange avec des AGL à courtes chaînes. Suite à des mesures de diffraction aux rayons X, de diffusion et de spectroscopie infrarouge, ils ont pu poser plusieurs conclusions. Après avoir montré que les perméabilités du SC et du SCS étaient similaires, ils ont observé que la perméabilité de l'acide benzoïque était également linéaire en fonction de la température, même s'il y avait transition de phase OR/HEX des lipides du SCS entre 30°C et 40°C (Groen et al. 2011).

Potts et Francoeur en 1990 avaient mesuré la perméabilité de l'eau à travers le SC de porc en fonction de la température, elle était linéaire de 10°C à 90°C, sachant que le SC de porc ne présente pas de transition de phase OR-HEX car il ne possède pas d'AGL à longues chaînes comme ceux présent chez l'homme (Potts and Francoeur 1990).

Le flux d'acide benzoïque n'est pas affecté par le changement d'agencement. Boelsma et al, ont également montré que la phase HEX ne favorise pas ni ne freine le flux de nicotinate de méthyle (Esther Boelsma et al. 2000).

Cependant le flux d'acide benzoïque est 4 fois supérieur chez le SCS à AGL courts, qui est en phase HEX, mais qui ne présente pas de LPP. La structure lamellaire semble être déterminante pour la fonction barrière selon cette étude (Groen et al. 2011).

Cette étude ne condamne pas l'étude de Boncheva, car il y a des différences de perméabilité entre l'eau et l'acide benzoïque, des différences entre la perméabilité de l'intérieur vers l'extérieur et de l'extérieur vers l'intérieur. Enfin, Chilcott et al ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre la PIE et la diffusion de substances. Il reste à déterminer quel paramètre est le plus représentatif de la fonction barrière du SC (Chilcott et al. 2002).

## **4. Les différents signaux régulant la fonction barrière de la peau**

### ***4.1. Signaux ioniques***

Dans l'épiderme, il existe un gradient de calcium, croissant de la profondeur jusqu'à la surface. Les plus fortes concentrations en calcium extracellulaire se trouvent dans la partie entourant le stratum granulosum (Menon and Elias 1991). Il a été montré, que la PIE était un signal pour la régulation de la barrière (Grubauer, Elias, and Feingold 1989). Ainsi l'augmentation du mouvement d'eau lors d'une altération de la barrière cutanée, va transporter le calcium à la surface de la peau, induisant une diminution de la concentration en calcium autour des cellules du SG. Cette diminution stimulerait la sécrétion de corps lamellaires préformés à l'interface entre couche granuleuse et couche cornée, ce qui permettrait l'apport des composants requis pour la restauration. De plus, une étude a démontré que la diminution du taux de calcium pouvait directement réguler l'exocytose des corps lamellaires indépendamment de la rupture de la barrière épidermique (Choi et al. 2003). Le même phénomène se produit avec le potassium., Il convient de souligner que le calcium et le potassium semblent avoir une synergie d'effet concernant l'inhibition de la réparation de la barrière cutanée (Elias 1996).

## 4.2. Signaux non ioniques

Les kératinocytes vont générer d'autres signaux. La cytokine IL-1 $\alpha$  est présente dans le SC à de très fortes concentrations à l'état basal. Lors d'une perturbation de la barrière cutanée, une augmentation de la synthèse de cette cytokine mais également de l'IL6 ou du TNF $\alpha$  a lieu. De plus, il y a une libération de ces médiateurs par les cellules granuleuses et cornées. Des études sur des souris déficientes en IL1, IL-6 et TNF $\alpha$  ont montré un retard dans la réparation de la barrière cutanée, prouvant le rôle de ces cytokines dans la régulation de la fonction barrière (Man et al. 1999; Wang et al. 2003).

De plus, après une altération de la fonction barrière, le pH du SC augmente. Cela a pour conséquence de modifier l'activité de certaines enzymes. Parmi elles, la sérine protéase voit son activité catalytique augmenter dans le SC. Cette enzyme a un effet négatif sur la reconstruction de la barrière (Hachem et al. 2006).

Sachant que les kératinocytes expriment beaucoup de récepteurs présents au niveau des neurones, des expériences réalisées avec des agonistes ou des antagonistes de ces récepteurs ont montré des effets sur la réparation de la barrière cutanée. L'oxyde nitrique (NO), en particulier a été étudié par Ikeyama et al. En effet il a été montré dans différentes études que le NO a une action cytotatique et cytotoxique sur la peau. Taniuchi et al. (2001) ont indiqué que le NO pourrait être impliqué dans la formation d'érythèmes chez les patients souffrant de dermatites atopiques (Taniuchi et al. 2001). Pour les peaux psoriasiques, présentant un dysfonctionnement de la barrière cutanée et une hyperplasie épidermique, le NO est généré à de hauts taux par les kératinocytes (Giustizieri et al. 2002). Ikeyama et al. ont d'abord démontré une augmentation de NO après altération de la barrière. L'application topique d'un traitement contenant un donneur de NO retarde la réparation de la fonction barrière. Le monoxyde d'azote tout comme la sérine protéase a un effet négatif sur la réparation de la barrière cutanée (Ikeyama, Fuziwara, and Denda 2007).

Un schéma récapitulatif des principaux axes de régulation de la fonction barrière est présenté Figure 19.

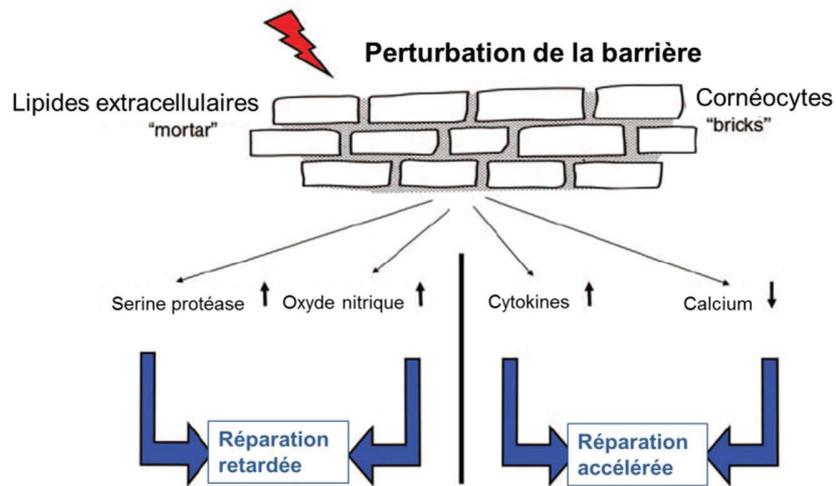


Figure 19. Régulation de la barrière cutanée (d'après Feingold, Schmuth, and Elias 2007).

Suite à l'étude des différents composants de la barrière cutanée, le modèle de briques et de mortier pour représenter le SC peut être affiné (Figure 20).

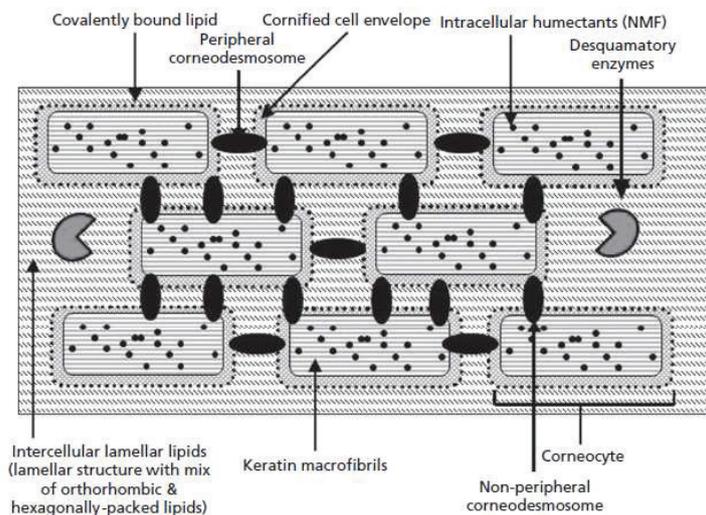


Figure 20. Représentation des différents composants du SC (d'après Rawlings 2010).

## Chapitre II. Techniques d'évaluation et d'observation de la peau

De nombreuses techniques ont été mises en place afin :

- D'améliorer la compréhension de la structure de la peau, expliquant ses fonctions de barrière,
- D'évaluer l'effet d'un produit ou d'une pathologie sur la fonction barrière de la peau,
- D'évaluer la toxicité cutanée d'un produit.

La bio-ingénierie cutanée s'intéresse particulièrement à tout ce qui se mesure sur la peau. Elle implique des domaines variés comme la tribologie (étude des surfaces), l'électronique, l'optique, la physicochimie, les ultrasons...

Les mesures *in vitro* sont les plus fréquemment utilisées, elles permettent de faire varier les paramètres d'investigations sur une grande amplitude et sont aussi utilisées pour une approche fondamentale des mécanismes cutanés. Les mesures *in vivo* représentent théoriquement une situation idéale, mais des difficultés propres à l'expérimentation humaine (éthique, réglementation, variabilité interindividuelle, caractère invasif...) font qu'elles sont moins utilisées. Cependant depuis les années 1980, un nombre important de méthodes dites non invasives a été développé de façon à réaliser des mesures objectives des propriétés de la peau (Rawlings et al. 2008; Leveque 1983).

Aujourd'hui la peau peut être étudiée selon des points de vue complémentaires : des techniques d'imagerie, pour un point de vue visuel qualitatif, et des techniques instrumentales permettant d'obtenir des données chiffrées et quantifiables.

Concernant les techniques d'imagerie, de nouvelles méthodes sont apparues, toutes ayant en commun une meilleure performance concernant la résolution d'image ou la profondeur d'exploration, et une dénaturation minimum de la peau. Parmi ces méthodes novatrices, la spectrométrie de masse par électrospray-ionisation (ESI-MS) couplée à l'observation directe par microscopie électronique de cryo-transmission (cryo-TEM) peut être utilisée pour l'étude de céramides intactes à longues chaînes (Norlén 2003). Cette technique repose sur la vitrification du tissu contrairement à la microscopie électronique classique qui nécessite une déshydratation complète de l'échantillon. La tomographie par cohérence optique permet des observations proches de celles obtenues par biopsie sans être invasive ou destructive, concernant la

structure de la peau, voire le diagnostic de maladies cutanées (Gladkova et al. 2000; Welzel 2001).

La microscopie biphotonique, grâce à des marqueurs fluorescents permet quant à elle des observations très fines de la structure de la peau (répartition des différentes cellules, structure polygonale des cornéocytes, taille des noyaux). Cette méthode reste invasive et est réalisée uniquement chez l'animal à l'heure actuelle (Tsai et al. 2009; Bender et al. 2008; Carrer, Vermehren, and Bagatolli 2008; Hanson et al. 2002).

Les méthodes d'évaluation de la peau peuvent se classer en différentes catégories :

- Les méthodes visuelles : relief, forme, couleur
- Les méthodes mesurant les propriétés physiques de la peau : (paramètres mécaniques, électriques, optiques et thermiques...)
- Les méthodes d'imagerie médicale appliquées à la peau : (IRM, ultrasons, microscopie confocale...)
- Les méthodes spectroscopiques (Visible, IR, proche IR, Raman, RMN...)

Bien que chacune des méthodes apporte des renseignements importants concernant l'évaluation de la peau, nous nous concentrerons ici sur les méthodes les plus utilisées et en particulier sur celles choisies pour ce projet de recherche.

## **1. Evaluation de l'hydratation de la peau (teneur en eau)**

### ***1.1. Exemples de méthodes diverses***

Le contenu en eau du SC a un rôle important dans la perméabilité de la barrière, ses propriétés mécaniques ainsi que dans la régulation des enzymes impliquées dans le processus de desquamation (Rawlings and Matts 2005). Pour l'évaluation de l'hydratation, de nombreuses méthodes *in vivo* existent: des méthodes électriques, les plus utilisées, thermiques, mécaniques (fermeté et souplesse (Cutometer®, Torquemeter®)), d'imagerie (IRM), spectroscopique, incluant la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infrarouge et Raman.

La RMN permet par exemple, de mesurer la quantité totale d'eau présente dans l'épiderme en utilisant des champs magnétiques pour évaluer la résonance de l'hydrogène. Comme elle est considérée comme l'une des rares méthodes capables d'une mesure directe de l'eau dans

l'épiderme, elle constitue une méthode de référence. Cependant elle nécessite un appareillage lourd, limitant les mesures aux avant-bras (Querleux et al. 1994; Sotoodian and Maibach 2012).

Les laboratoires DermScan à Villeurbanne, ont développé l'Hydrascan® qui repose sur la mesure de transfert thermique transitoire (TTT). L'appareil transfère une pulsation thermique constante à l'épiderme grâce à une sonde. La température de la peau est mesurée simultanément. Les changements de température sont proportionnels à la quantité d'eau dans la peau. Des chercheurs ont comparé les méthodes de TTT, RMN et de cornéométrie. Le TTT semble plus précis que la cornéométrie (Girard, Beraud, and Sirvent 2000). Cependant la cornéométrie, de par sa simplicité de mesure, reste très utilisée pour l'évaluation de l'hydratation de la peau.

## *1.2. Les méthodes électriques*

Le passage du courant électrique à travers la peau est fonction de l'hydratation de cette couche, cela a été montré pour la première fois par Rosendal et al. en 1945 (Rosendal 1945). Ces méthodes sont donc basées sur les principes de conductivité diélectrique de la peau.

Les propriétés électriques de la peau sont liées au contenu en eau du stratum corneum et sont classées selon le potentiel électrique ou la résistance au flux du courant électrique. Cette résistance est mesurée en appliquant une tension entre deux sites cutanés voisins. Cette valeur peut s'exprimer en résistance, en conductance ou en impédance (ohms à fréquence fixe).

L'impédance totale de la peau  $Z$  quand la peau est soumise à un courant alternatif de fréquence  $F$  dépend de la contribution de la résistance  $R$  et de la capacitance  $C$  selon la relation suivante.

$$Z = \left( R^2 + \frac{1}{2\pi FC^2} \right)^{1/2}$$

La capacitance représente le pouvoir d'accumuler des charges électriques, tandis que l'impédance représente l'opposition électrique de la peau au courant électrique appliqué (Berardesca and European Group for Efficacy Measurements on Cosmetics and Other Topical Products (EEMCO) 1997).

### 1.2.1. Mesure de la capacitance

L'appareil commercialisé pour cette mesure est le Cornéomètre (Corneometer Courage Khazaka). Il utilise un capteur de type condensateur qui opère à basse fréquence (40-75Hz). Plus la capacitance augmente plus le SC est hydraté. Les mesures sont prises jusqu'à une profondeur de 60 à 100  $\mu\text{m}$ , soit le SC et les couches supérieures de l'épiderme. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire. On estime que des valeurs inférieures à 30 UA correspondent à une peau très sèche, de 30 à 40 UA, une peau sèche et supérieures à 40 UA, une peau normale. Les mesures sont très sensibles à l'application de produits topiques. (Heinrich et al. 2003; Berardesca and Borroni 1995).

### 1.2.2. Mesure de l'impédance et de la conductance

Le Nova Derm Phase Meter DPM 9003 est utilisé pour les mesures d'impédance. Il utilise des fréquences de 1MHz et mesure l'hydratation dans la partie supérieure du SC. Pour une peau sèche les valeurs seront de 90 à 100 unités DPM et entre 110 et 350 pour une peau hydratée. Cet instrument n'est pas discriminant pour les peaux sèches, si la peau est très sèche la valeur sera de 0.

Le Skicon®-200 mesure la conductance à hautes fréquences (3,5 Hz). Il mesure jusqu'à une profondeur de 20 $\mu\text{m}$ , soit les couches superficielles du SC. Pour une peau très sèche les valeurs seront de 10 à 15  $\mu\text{S}$  et de 500  $\mu\text{S}$  pour une peau bien hydratée. Il a également une sensibilité réduite pour les peaux sèches (Lambers and Pronk 2002).

## 2. L'évaluation de la fonction barrière

### 2.1. Mesures de la perte insensible en eau (PIE)

La diffusion de l'eau depuis les couches profondes de l'épiderme jusqu'à la surface de la peau est un phénomène insensible (différent de la sudation) limité par la couche cornée. La barrière épidermique est donc impliquée dans la PIE, ces mesures apportent des informations sur l'état de la barrière cutanée. La validité de la mesure de la PIE comme reflet de la fonction barrière a été prouvée par des méthodes gravimétriques *ex vivo*. Une faible PIE est généralement

caractéristique d'une fonction barrière intacte *in vivo* (Fluhr, Feingold, and Elias 2006). Cette technique sert à observer les anomalies des peaux pathologiques (dermatite atopique, psoriasis...) et l'effet d'une perturbation de la barrière expérimentale (détergents, solvants, tape stripping...) (Endo et al. 2007; Chamlin et al. 2002).

Il existe plusieurs méthodes :

- La méthode de la chambre fermée: utilisant un Vapomètre (Delphin VapoMeter). cette technique présente l'inconvénient de ne pas permettre de mesures continues dans le temps, car elle va bloquer l'évaporation normale de la peau en saturant l'air de la chambre. Les mesures sont donc faites sur une courte période (Nuutinen et al. 2003; De Paepe et al. 2005). On mesure l'intégrité de la fonction barrière à un instant  $t$ .
- La méthode de la chambre ventilée: la chambre contient un gaz contenant une quantité d'eau mesurée et ce gaz va être mis en contact avec à la peau. L'hygromètre à l'intérieur du capteur mesure la quantité d'eau captée par le gaz à la surface de la peau. La ventilation permet une mesure continue de la PIE, cependant l'évaporation d'eau peut augmenter si le gaz transporteur devient sec et conduit à des résultats faussés (Sotodian and Maibach 2012).
- La méthode de la chambre ouverte: c'est la méthode la plus courante. Deux appareils existent le Tewameter® de Courage + Khazaka et l'Evaporimeter® de ServoMed. Ces appareils utilisent le principe de la mesure du gradient de vapeur d'eau s'établissant dans une couche de 10 mm d'épaisseur au-dessus de la surface cutanée. Une sonde appliquée sur la peau délimite une chambre ouverte à l'air ambiant. A l'intérieur de cette chambre sont placés, en position verticale, l'un au-dessus de l'autre, deux détecteurs sensibles à l'humidité. Cette méthode est basée sur la loi de diffusion de Fick indiquant la quantité d'eau transportée pour une surface définie et un temps donné. On obtient donc une valeur de flux en  $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ . Un schéma explicatif de la mesure de la PIE est donné Figure 21.

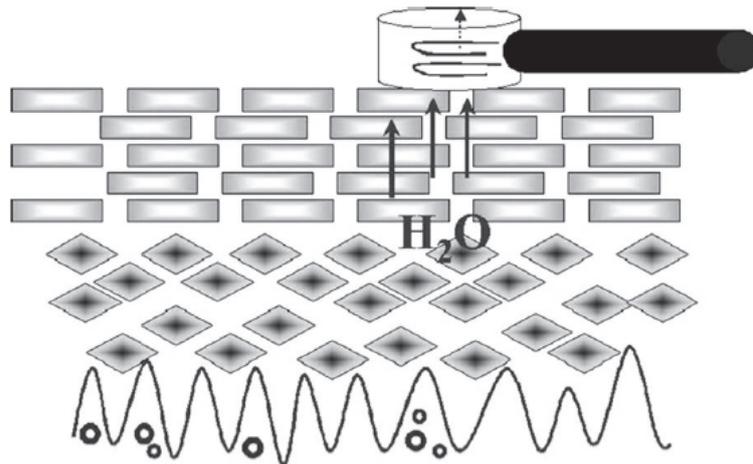


Figure 21. Schéma de mesure de la PIE par la méthode de chambre ouverte (d'après Darlenski et al. 2009).

Toutes ces méthodes et en particulier la dernière, sont sensibles aux variations de l'air ambiant et à l'humidité relative de l'atmosphère. Ces mesures doivent donc être réalisées en atmosphère contrôlée.

Il faut noter qu'il est préférable d'utiliser les mesures de PIE *in vivo*, car plusieurs études ont montré qu'*in vitro* ou *ex vivo*, les mesures de PIE ne reflétaient pas l'état de la fonction barrière de la peau. Netzlaff et al. ont montré les limites de la PIE sur des épidermes séparés du derme par la chaleur. Lorsque des dommages importants étaient appliqués sur l'épiderme tel qu'une quinzaine de tape strippings successifs, la PIE était modifiée, mais elle ne l'était pas pour des altérations moindres tel que 7 tapes stripping successifs ou la création de trous au travers de la peau à l'aide d'une aiguille. Ces dernières altérations ont eu pourtant comme effet d'augmenter la pénétration d'acide flufenamique dans la peau, montrant bien leur effet sur la barrière cutanée. (Netzlaff et al. 2006).

## 2.2. La calorimétrie différentielle à balayage (ou DSC)

Cette technique permet d'observer les transitions de phase des lipides cutanés en fonction de la température. Ainsi il y a accès à une meilleure compréhension du rôle des lipides dans l'agencement de la matrice extracellulaire (Golden et al. 1986; Plasencia, Norlén, and Bagatolli 2007). Cependant cette technique ne peut être employée que sur mélange de lipides synthétiques ou après extraction des lipides par un solvant.

### ***2.3. La diffraction des rayons X***

La diffraction des rayons X est une technique puissante pour étudier l'organisation des lipides dans le SC. Le principe de la technique consiste à envoyer un faisceau de rayons X sur l'échantillon étudié et un détecteur balaye l'échantillon pour mesurer l'intensité des rayons X diffractés selon des angles différents. Quand l'échantillon contient des protéines ou des lipides qui sont organisés en structure répétitives, l'intensité des rayons diffusés sur un plan de diffraction est caractérisée par une série de pics. La diffraction des rayons X aux petits angles (SAXD), permet d'obtenir des informations sur l'organisation lamellaire des lipides matriciels, décrivant les différentes périodes de phase (LPP, SPP). La diffraction des rayons X aux grands angles quant à elle permet d'obtenir des informations sur l'agencement latéral des lipides au sein des structures lamellaires (OR, HEX, LIQ). En modulant la température, la nature des lipides ou leur concentration sur des échantillons reconstitués, cette technique permet d'approfondir les connaissances sur les mécanismes expliquant l'organisation des lipides de la matrice intercornéocytaire (Bouwstra et al. 1991; Hatta et al. 2006; Garson et al. 1991; Bouwstra and Ponc 2006).

### ***2.4. La spectroscopie infrarouge***

La spectroscopie infrarouge est une technique de choix pour l'analyse structurale de la peau. Elle a été utilisée pour ce projet de recherche, ainsi une description plus détaillée de cette méthode est réalisée.

#### **2.4.1. Historique et évolution des techniques**

Depuis les 40 dernières années, la spectroscopie FTIR (Fourier Transform InfraRed) s'est répandue pour l'analyse des tissus biologiques. Les analyses de molécules biologiques et de recherche sur les membranes par cette technique, ont fait l'objet de nombreuses revues dans la littérature. (D. C. Lee and Chapman 1986).

Ceci s'explique, entre autre, par le fait que la spectroscopie IR permet d'avoir un accès direct aux informations sur la structure moléculaire (contrairement à la spectroscopie à fluorescence où la présence d'un fluorophore est nécessaire) (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006).

Initialement, le problème majeur de cette technique sur des composants biologiques était la forte absorption résultant de la présence d'eau masquant ainsi des bandes d'intérêt, telles que les

bandes correspondant aux vibrations des liaisons CH des chaînes alkyles des lipides du SC, décrites ultérieurement. Ceci rendait difficile l'analyse d'échantillons à l'état naturel (utilisation de forte concentration, de faible épaisseur d'échantillon, de solvants deutérés). Ce problème a été en partie résolu par la possibilité de soustraire le bruit de fond d'absorption de l'eau (Cameron, Casal and Mantsch 1979; Chapman et al. 1980).

Cependant la spectroscopie IR, demande toujours la préparation de l'échantillon, qui doit être de faible épaisseur. Les préparations de peau sont donc placées dans des fenêtres de fluorure de calcium ( $\text{CaF}_2$ ) (Merle and Baillet-Guffroy 2009), de chlorure d'argent ( $\text{AgCl}$ ) (Gorcea et al. 2012), bromure d'argent ( $\text{AgBr}$ ) (Groen et al. 2011) ou encore de séléniure de zinc ( $\text{ZnSe}$ ) (Caussin et al. 2008). Ces supports, transparents en infrarouge, maintiennent l'échantillon de faible épaisseur en position verticale pour permettre au faisceau infrarouge de le traverser.

L'arrivée de l'ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance) a permis de s'affranchir de l'épaisseur de l'échantillon. La totalité du SC peut être placée, horizontalement, directement sur le cristal. Le spectre va être acquis sur les 2  $\mu\text{m}$  de la surface de l'échantillon. En l'absence de préparation préalable, les dommages pouvant être infligés à l'échantillon sont minimisés (Puttnam, 1972). De plus, grâce à cette technique, une caractérisation sur toute la profondeur du SC peut être réalisée si les mesures sont combinées avec une méthode de tape-stripping séquentielle (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006).

#### 2.4.2. Les points d'intérêt du spectre infrarouge, pour l'analyse du SC

De nombreux descripteurs de conformation ont été mis en avant lors d'études sur l'analyse structurale du SC.

La spectroscopie infrarouge permet d'avoir en effet des informations sur l'ordre de conformation des chaînes au niveau intramoléculaire (fluidité), ainsi que sur l'agencement latéral des chaînes au niveau intermoléculaire et au niveau des parties polaires.

Précédemment, on a vu que les lipides pouvaient s'organiser en phase orthorhombique, hexagonale et cristalline liquide ou fluide (de la plus ordonnée à la moins ordonnée).

Des zones sur le spectre sont caractéristiques de ces phases et permettent de les identifier (Moore and Mendelsohn 1999; Mendelsohn, Flach, and Moore 2006; Gorcea et al. 2012; Boncheva, Damien, and Normand 2008; Merle and Baillet-Guffroy 2009).

Il existe plusieurs modes de vibration :

Pour les groupements CH<sub>2</sub> (chaines alkyles des lipides) : Stretching/élongation ( $\nu$ ), Scissoring/cisaillement ( $\delta$ ), rocking/balancement ( $\rho$ ), wagging/agitation ( $\rho\omega$ )

Pour les têtes polaires :  $\nu$  C=O/NH (amide I),  $\nu$  CN/NH (amide II),  $\nu$  C=O (acide).

Ci-dessous, le spectre infrarouge d'un épiderme humain réalisé *in vivo* figure les différentes zones d'intérêt ainsi que le type d'informations qu'elles permettent d'obtenir (Figure 22).

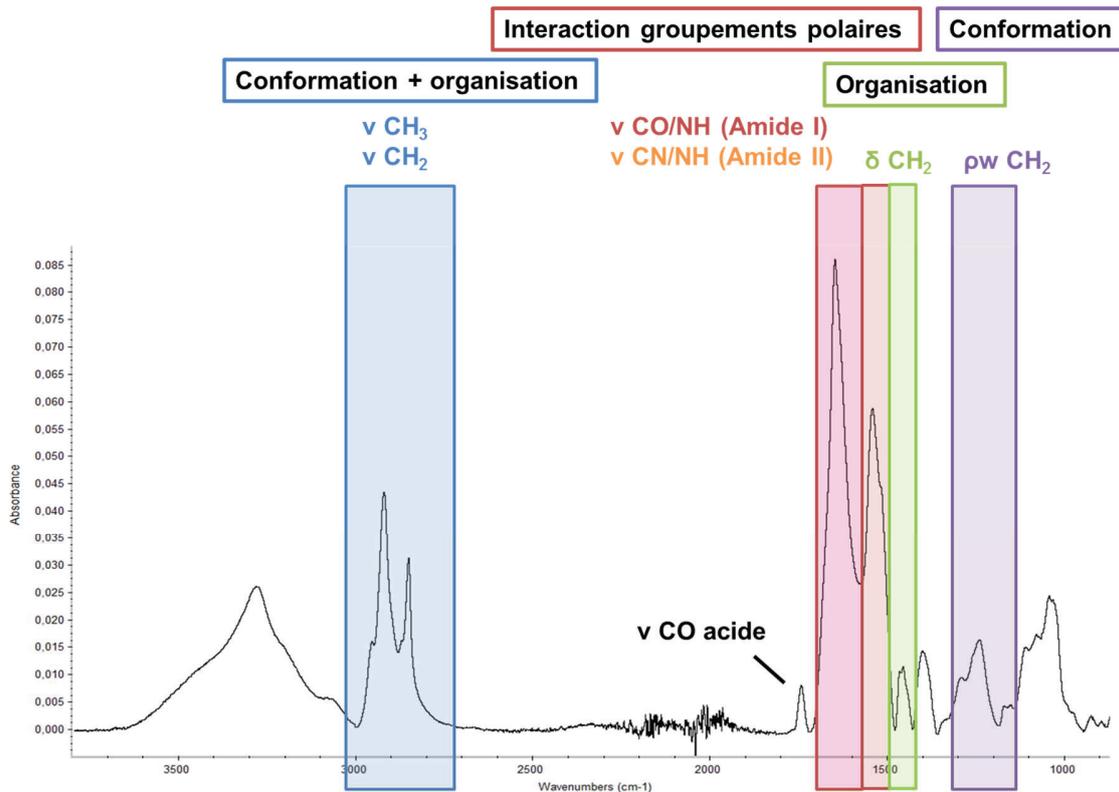


Figure 22. Spectre infrarouge de peau humaine, réalisé *in vivo* et zones d'intérêt.

Pour étudier le rôle de chaque famille de lipides séparément, les chercheurs font appel à des molécules deutérées (ex : DAGL, des acides gras deutérés) qui ont des zones de vibrations à des fréquences décalées par rapport aux molécules non deutérées. Le Tableau 6 répertorie les différentes zones d'intérêt du spectre infrarouge de la peau.

Tableau 6. Zones d'intérêt du spectre infrarouge de la peau (d'après Mendelsohn, Flach, and Moore 2006; Moore and Mendelsohn 1999)

Mode de vibration	Fréquence (cm <sup>-1</sup> )	Interprétation
v symmetric CH <sub>2</sub>	2846-2849 OR 2850 HEX 2853 LIQ	Sensible à l'agencement latéral des chaînes et à l'ordre de conformation
v asymmetric CH <sub>2</sub>	2915-2924	Sensible à l'agencement latéral des chaînes
v symmetric CD <sub>2</sub>	2088-2097	Sensible à l'agencement latéral des chaînes et à l'ordre de conformation
v asymmetric CD <sub>2</sub>	2193-2198	Sensible à l'agencement latéral des chaînes
δ CH <sub>2</sub>	1462, 1473	Ces deux bandes révèlent la présence d'une phase OR
δ CH <sub>2</sub>	1468	Cette bande unique représente une phase HEX
δ CD <sub>2</sub>	1086, 1094	Ces deux bandes révèlent la présence d'une phase OR des chaînes deutérées
δ CD <sub>2</sub>	1089	Cette bande unique représente une phase HEX des chaînes deutérées
ρ CH <sub>2</sub>	720, 730	Ces deux bandes révèlent la présence d'une phase OR
ρ CH <sub>2</sub>	720 seule	Cette bande unique représentant une phase HEX
ρw CH <sub>2</sub>	1180-1350	La présence de 8 bandes est caractéristique d'une phase OR
v C=O/NH (amide I)	1610-1690	Sensible à la force des liaisons hydrogène (Interaction gpts polaires)
v CN/NH (amide II)	1510-1560	Sensible à la force des liaisons hydrogène (Interaction gpts polaires)
v C=O (acide)	1690-1710	Sensible à la force des liaisons hydrogène (Intéraction gpts polaires)

De manière plus précise, le schéma suivant donne pour exemple deux zones d'intérêt du spectre ( $\nu$  CH<sub>2</sub> et  $\delta$  CH<sub>2</sub>) permettant d'avoir accès aux informations sur la conformation intramoléculaire des lipides et leur organisation intermoléculaire. Il montre l'analyse de ces zones d'intérêt (Figure 23).

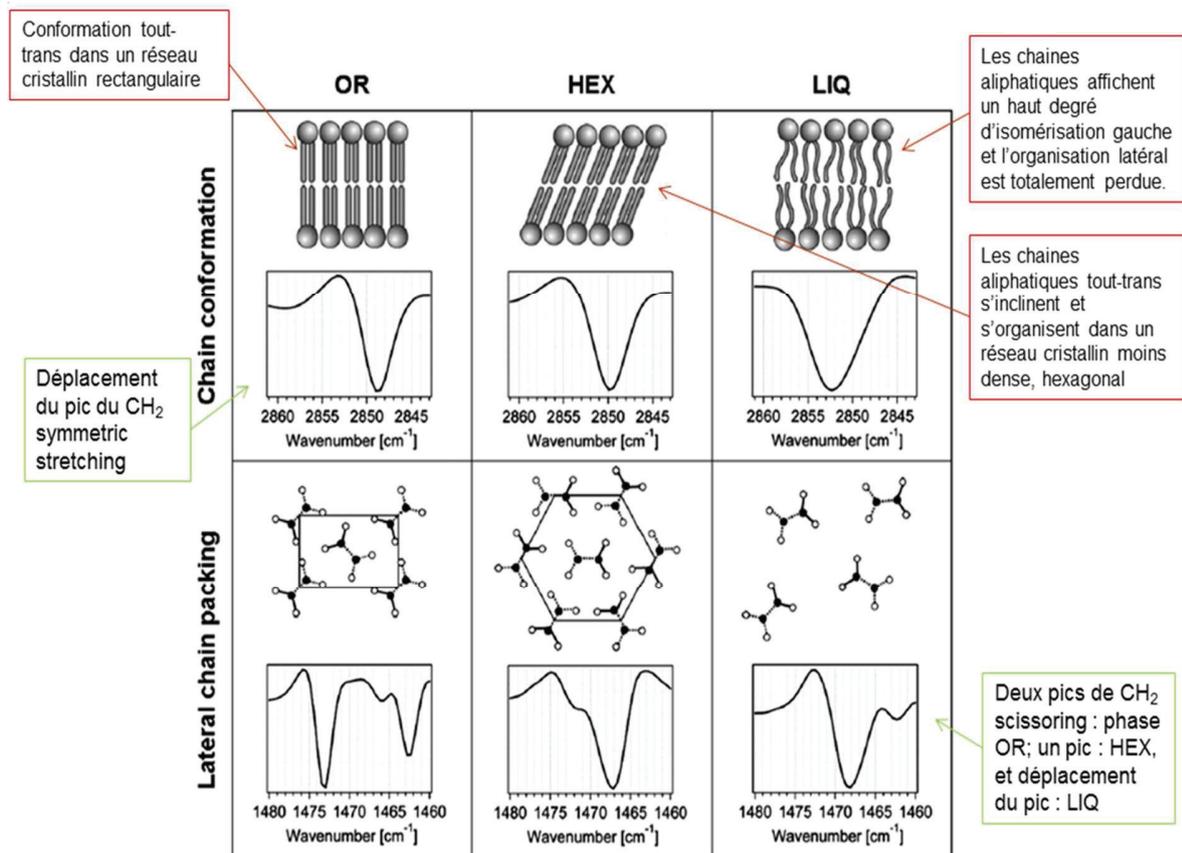
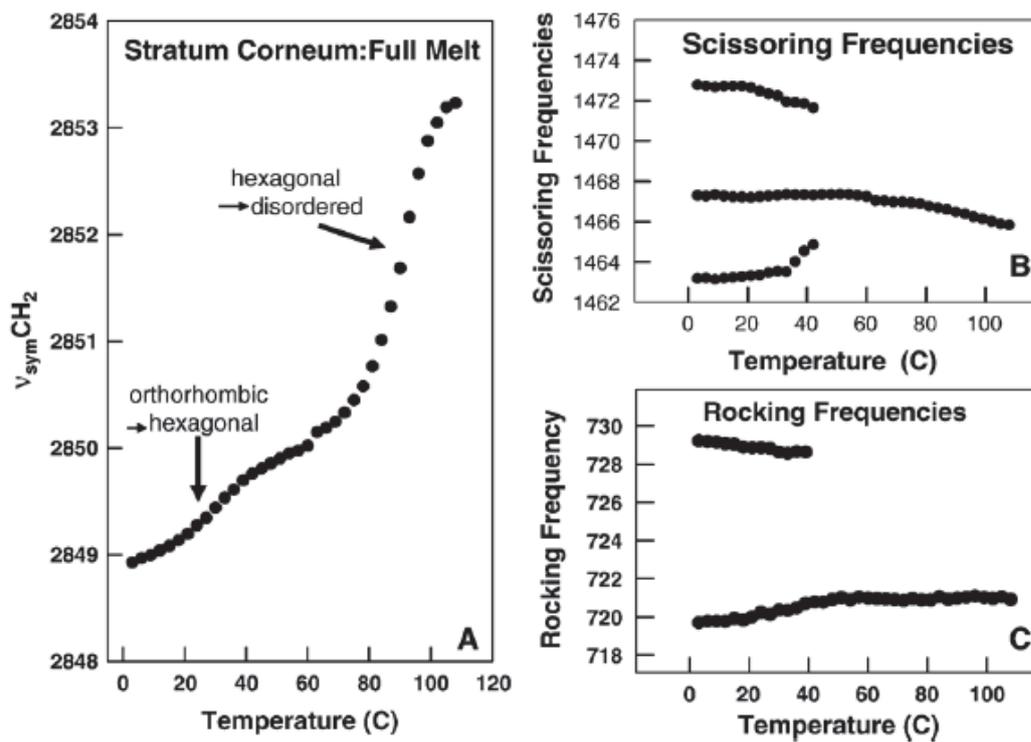


Figure 23. Analyse d'un spectre infrarouge de la peau (d'après Boncheva, Damien, and Normand 2008)

Le déplacement du pic de CH<sub>2</sub> stretching ( $\nu$  CH<sub>2</sub>) et la présence d'un ou deux pics de CH<sub>2</sub> scissoring ( $\delta$  CH<sub>2</sub>) sont les deux paramètres les plus étudiés dans la littérature. Voici quelques exemples illustrés de spectres et d'analyses spectrales infrarouges de la peau (Figures 24 et 25). La Figure 24 montre les positions de ces pics en fonction de la température à laquelle est conditionné le SC humain isolé. Dans le graphe A, deux épaulements sont observés, montrant deux shifts du pic  $\nu$  CH<sub>2</sub>, correspondant à deux transitions de phases : OR/HEX entre 20°-40°C puis HEX/LIQ vers 80°C. L'observation de la position et de la présence des pics de ( $\delta$  CH<sub>2</sub>) et

de ( $\rho$  CH<sub>2</sub>) permet de préciser cette température de transition de phase OR/HEX qui se manifeste pour le ( $\delta$  CH<sub>2</sub>) lors de la disparition des deux bandes à 1462 cm<sup>-1</sup> et 1473 cm<sup>-1</sup> pour ne laisser plus qu'une bande centrale à 1468 cm<sup>-1</sup> ou pour le ( $\rho$  CH<sub>2</sub>), la disparition de la bande à 730 cm<sup>-1</sup>, ne laissant que celle à 720 cm<sup>-1</sup>. Cette température se précise alors à 40°C environ.



Figure

Figure 24. Changement de conformation des lipides matriciels en fonction de la température sur un SC humain isolé (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006)

La Figure 25 montre une autre façon d'observer la transition de phase OR/HEX au niveau de la zone de scissoring des CH<sub>2</sub> ( $\delta$  CH<sub>2</sub>). En effet la superposition des différents spectres d'un mélange de DAGL acquis à températures croissantes rend compte de la température, ici 66°C, à laquelle on observe la disparition des deux pics de scissoring et l'apparition du pic central.

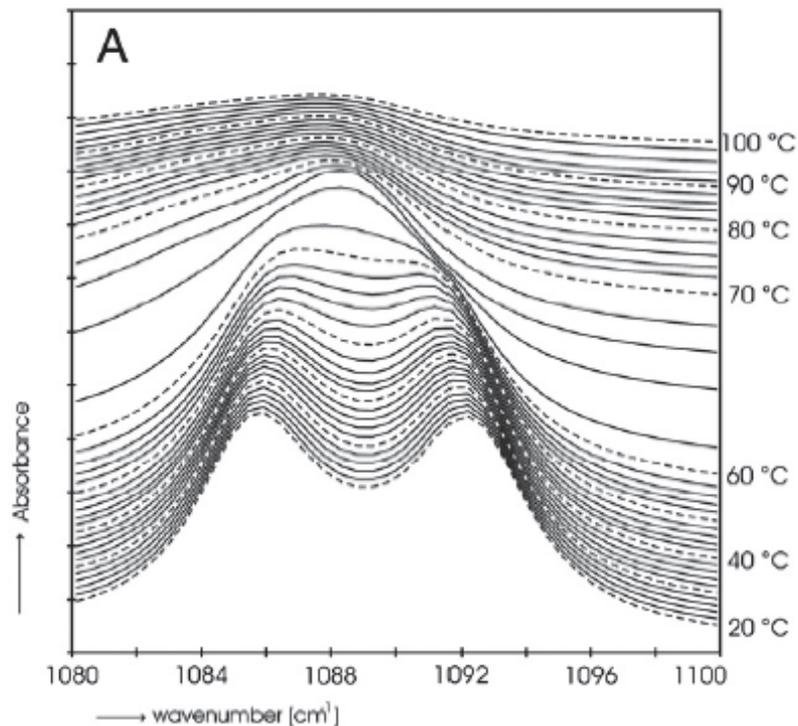


Figure 25. Spectre  $\delta CD2$  d'un mélange de DAGL en fonction de la température (Groen et al. 2011)

### 2.4.3. Applications de la spectroscopie infrarouge pour l'étude des lipides cutanés

La spectroscopie infrarouge est utilisée pour évaluer l'agencement des lipides, les différentes phases organisées qu'ils peuvent former et les interactions entre les chaînes alkyles et entre les têtes polaires. Ces évaluations peuvent se faire sur des mélanges de lipides bien définis, permettant de mieux comprendre le comportement de chaque classe de lipides au sein de la matrice ou sur des SC humains ou animaux. Ces observations vont permettre d'étudier la matrice lipidique à son état basal et également l'influence de paramètres extérieurs sur celle-ci.

#### Validité d'un modèle in vitro à mettre en premier

Pour réaliser des études sur le SC, plusieurs choix de modèles existent. Pour des travaux en spectroscopie FTIR, des mélanges AGL-CER-CHOL sont principalement utilisés, bien que certaines expériences se basent du SC humain isolé. Pour les travaux avec l'ATR-FTIR,

travailler sur un véritable échantillon de peau est plus aisé, ainsi des évaluations ont été faites sur la peau humaine *in vivo* (Damien and Boncheva 2009), et *in vitro* sur du SC isolé humain ou porcine (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006; Caussin et al. 2008). Cependant lorsque l'effet d'un déficit en composant ou de l'ajout d'une molécule à différentes concentrations veut être étudié (Merle and Baillet-Guffroy 2009; Caussin, Gooris, and Bouwstra 2008), les mélanges sont plus adaptés.

De ce fait des études sur la validité d'un modèle synthétique par rapport au SC humain ont été réalisées.

Caussin et Bouwstra en 2008 ont montré que le SC isolé de porc diffère de celui d'origine humaine par le fait qu'il ne présente pas de phase OR à température ambiante (Caussin et al. 2008). Cependant, l'organisation du mélange équimolaire CER-CHOL-AGL avec des céramides de porc ou des céramides humains est très similaire. Seules les températures de transition de phase diffèrent. La transition OR-HEX est située entre 22°C et 32°C pour le SC porcine, 24°C et 34 °C pour le SC humain, la température de transition HEX-LIQ est de 52°C pour le modèle contenant des céramides de porc et de 62°C pour celui contenant des céramides humaines.

Ces différences mineures peuvent s'expliquer par les différences de composition en céramides entre le porc et l'homme qui sont :

- La présence de trois acylcéramides (Cer 1 (EOS), Cer 4 (EOH) et Cer 9 (EOP)) chez l'homme contre un (Cer 1 (EOS)) chez le porc. Ce groupement a une grande influence sur la formation de LPP mais peu sur la formation d'OR.
- Structure de la tête polaire : il y a une majorité de base phytosphingosine chez l'homme et de base sphingosine chez le porc. Les céramides à base sphingosine ont le plus petit nombre de groupements hydroxyles au niveau de la tête polaire, ces différences dans l'architecture de la tête peuvent affecter l'organisation latérale ainsi que la formation de liaisons hydrogènes entre les têtes polaires. Cependant, Rerek et al, ont montré que la phase HEX est davantage présente en présence de base phytosphingosine et que la phase OR prédomine en présence de base sphingosine. Il convient de souligner que ces expériences ont été réalisées en l'absence d'AGL et de CHOL (Rerek et al. 2001).
- La différence de longueur de chaîne : plus longues chez l'homme, elles peuvent avoir des liaisons de Van der Waals plus fortes, et permettent la formation de phase OR, alors que les céramides avec des AGL à chaînes courtes, favorisent plutôt la formation de phase HEX.

Le comportement des mélanges à base de céramides humains (HCER) ou porcins (PCER), est légèrement différent de celui de la peau hydratée qui a une température de transition OR-HEX supérieure (30°C). Cela n'explique cependant pas pourquoi il y a une différence d'agencement latéral entre les mélanges à base de PCER et le SC porcin isolé. Cela peut-être dû à la différence de la composition en AGL entre le mélange PCER-CHOL-AGL et ceux présents dans le SC de porc. De plus certaines classes de lipides présentes dans le SC de porc n'ont pas été incluses dans les mélanges PCER-CHOL-AGL tels que des esters de cholestérol. Les mélanges préparés avec l'ensemble des lipides du porc ne forment d'ailleurs pas de LPP et sont majoritairement en phase HEX.

Les CER de porc, plus faciles à obtenir que les CER humains, sont donc tout à fait adaptés pour former des modèles de SC humain tant que les AGL qui leur sont ajoutés sont aussi ceux que l'on retrouve chez l'homme.

### **Organisation des différents composants de la matrice :**

La spectroscopie infrarouge a permis de mieux comprendre l'agencement des différentes classes de lipides présents dans la matrice.

Gorcea et al. ont étudié la répartition et l'organisation des céramides et des AGL en se basant sur des mélanges de céramides non hydroxylées, acides gras deutérés (acide stéarique) et cholestérol (Gorcea et al. 2012).

L'utilisation d'acides gras deutérés permet l'observation simultanée de l'organisation des céramides et des acides gras car les bandes de stretching ou de scissoring apparaissent à des longueurs d'ondes décalées (voir Tableau 5).

Les expériences ont été réalisées à partir de mélange CER-DAGL-CHOL, équimolaire (1 :1 :1) pour le modèle du SC normal, et (0,5 :1 :1) pour le modèle déficient. Ces mélanges ont été soumis à une augmentation de température de 19°C à 85°C et des spectres ont été acquis à chaque palier de 3°C. Les déplacements des bandes du  $\nu\text{CH}_2$  pour les céramides et du  $\nu\text{CD}_2$  pour les AGL ont été analysés pour avoir des informations sur la conformation intra-moléculaire des chaînes et leur fluidité. L'agencement inter-moléculaire des céramides et des AGL a été évalué suite à l'observation d'une ou deux bandes de scissoring.

Pour le modèle normal entre 0°C-50°C, les DAGL et les CER sont en phase OR, La transition de phase OR-HEX se fait à 55°C pour les DAGL du mélange et à 60°C pour les CER.

Les températures de transitions de phases séparées entre les DAGL et les CER au sein du mélange montrent que dans le modèle normal, il existe des domaines séparés de CER et d'AGL. Cependant les températures de transition de phase des DAGL et des CER au sein du mélange sont plus basses que celles des CER et DAGL purs, ce qui montre que la séparation entre AGL et CER est incomplète, il existe quelques mélanges.

Pour le modèle déficient en CER, une seule température de transition de phase est observée, entre 58 et 60°C. Les CER et les AGL sont répartis et mélangés de façon homogène, lorsque les chaînes des AGL se relaxent, elles entraînent celles des CER, miscibles dans l'excès d'AGL.

Les chaînes de CER sont distribuées dans des petits clusters dans la membrane ou mélangées avec des phases riches en cholestérol. Quand les domaines d'AGL se fluidifient, les autres phases se mélangent à cette dernière.

Sur ce même principe d'autres études sur les céramides et les AGL ont été menées.

Moore en 1999, a voulu comprendre les interactions moléculaires dans les régions polaires des CER et des AGL, en effet ces liaisons hydrogènes intermoléculaires sont très importantes pour la cohésion et l'intégrité de la barrière (Moore and Mendelsohn 1999).

Grâce à la spectroscopie IR, on peut déduire des spectres la présence d'interactions entre les têtes polaires et les chaînes lipophiles via les  $\nu$  Amide I, Amide II et Acide et les  $\nu$  et  $\rho\text{CH}_2$  (CER) et les  $\nu$  et  $\delta\text{CD}_2$  (AGL).

Deux types de CER ont été testés, les CER AS et NS qui font partie des céramides majoritairement présentes dans le SC. L'AGL, un acide hexadecanoïque deutéré, reste inchangé. Des mélanges équimolaires CER, AGL, CHOL ont été étudiés. Suivant les CER des comportements différents ont été observés, la nature de la CER influe donc sur le comportement de la matrice. L'agencement ordonné des chaînes de CER5 ou CER AS, s'effondre, comme le montre le shift de la bande du  $\nu\text{CH}_2$  (CER) et la transition des deux pics de  $\rho\text{CH}_2$  (CER) en un pic quand la température de transition des chaînes d'AGL (shift du  $\nu$  et  $\delta\text{CD}_2$  (AGL)) est atteinte. Au contraire, les chaînes de CER2 ou CER NS restent ordonnées après l'effondrement des chaînes d'AGL. D'autre part, les liaisons hydrogènes entre les têtes polaires de CER5 sont indépendantes de l'organisation des chaînes apolaires, alors que pour CER2, lorsqu'il y a désorganisation des chaînes, les liaisons hydrogènes s'en trouvent affaiblies. La Figure 26 ci-dessous résume les observations de ces travaux.

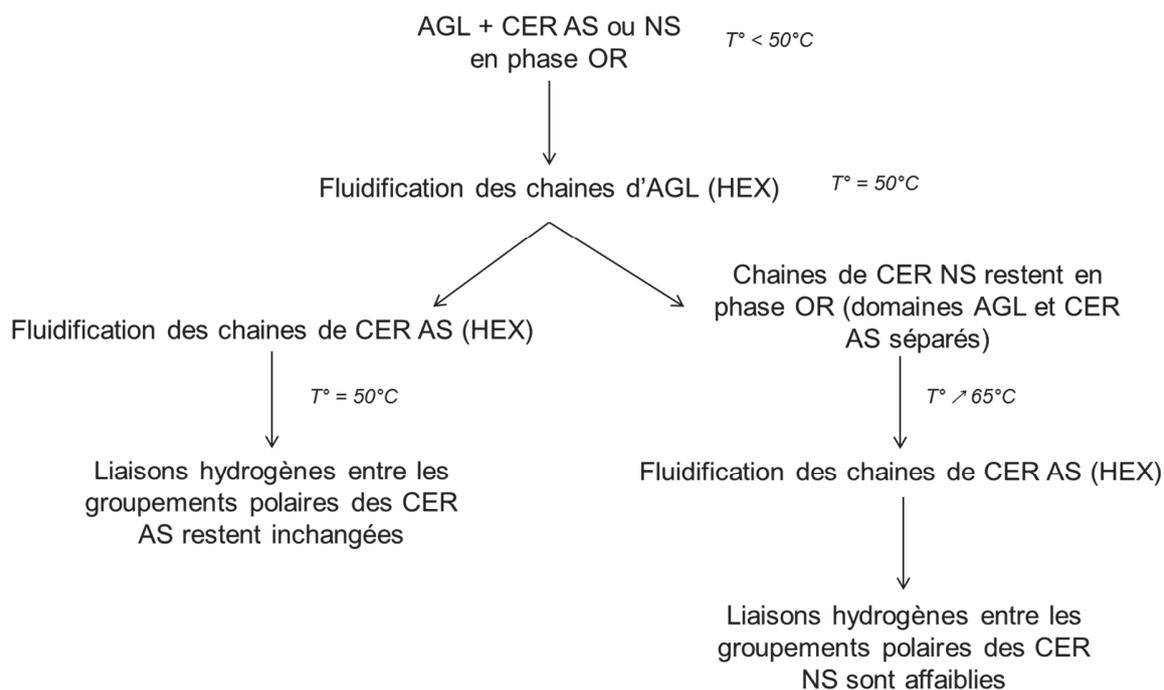


Figure 26. Schéma explicatif des travaux de Moore et Mendelsohn (d'après Moore and Mendelsohn 1999)

Les interactions entre les têtes polaires, moins étudiées que le comportement des chaînes alkyles des composés du SC, sont donc importantes à observer pour la compréhension de l'organisation moléculaire des AGL et des CER au sein des modèles de SC.

Corbe et al. ont mené des études similaires sur des mélanges de différentes céramides (AS, NA, NP ou AP)/AGL (acide palmitique) à différents ratio et des mélanges CER/kératine pour mimer l'environnement du SC. Ils ont en premier lieu montré que sur des mélanges purs de céramides, celles-ci n'avaient pas toutes la même stabilité conformationnelle face à une augmentation de la température. Ils ont établi un classement des céramides en fonction de leur stabilité conformationnelle qui est le suivant CER NP>AP>NS>AS. De plus, de par sa structure, la kératine a tendance à contracter des interactions directes avec les groupements polaires des céramides. Ils ont montré que la présence de kératine induisait une augmentation de la température de transition de phase OR/HEX, indiquant une stabilisation de l'organisation des CER à base phytosphingosine, et une diminution de cette température et donc une déstabilisation de l'organisation des céramides à base sphingosine. L'acide palmitique, dû à sa longue chaîne alkyle peut s'intégrer plus facilement au sein de la structure lamellaire des céramides, en comparaison à la kératine. Il a une influence directe sur les interactions non

polaires des chaînes alkyles. Il va diminuer la température de transition de phase OR/HEX et donc déstabiliser l'organisation des CER NS, alors qu'il a l'effet inverse sur les CER AP et AS. Les auteurs n'apportent cependant pas d'explications à ses différentes observations (Corbe et al. 2007).

### **Etudes de perturbations physiques ou chimiques sur le SC (UV, promoteur d'absorption, hydratant)**

Grâce à la spectroscopie IR, l'effet de certains agents physiques ou chimiques sur l'agencement et l'organisation lamellaire de la matrice du SC et donc sur la fonction barrière peut être évalué.

Caussin, Bouwstra et al en 2008, étudient l'effet des molécules hydratantes lipophiles non occlusives tels que des dérivés isostéarates (Caussin, Gooris, and Bouwstra 2008). Ils montrent au préalable, comme dans d'autres études (Gorcea et al. 2012; Moore and Mendelsohn 1999) que les AGL et les CER forment des domaines séparés mais que les domaines des AGL sont localisés dans des lamelles où le CHOL et les CER peuvent être présents.

Deux dérivés isostéarate, l'isostéarate d'isostéaryl et l'isostéarate d'isopropyl, appliqués à une concentration de 20% sur un mélange CER, AGL, CHOL, semblent augmenter la stabilité de la phase OR des lipides, qui reste en partie présente jusqu'à 60°C contrairement au mélange CER, AGL, CHOL seul où, à 22-30°C, la phase OR disparaît laissant place uniquement à une phase HEX. Ces deux dérivés, en majorité, existent dans des domaines séparés qui sont à l'état désordonnés. Cependant une partie se retrouve dans les mêmes couches que CER et AGL et participe à la phase OR.

Le troisième ester testé ayant une tête hydrophile a une incorporation plus difficile dans le SC et ses effets sont beaucoup moins marqués à 20%. Les auteurs concluent que ces hydratants interagissent avec les lipides de la matrice, et peuvent avoir un pouvoir extracteur. Cependant, une extraction de CHOL ou d'AGL ne conduirait pas à un renforcement de la phase OR. Caussin et Bouwstra en 2008 ont également étudié l'effet du glycérol, humectant largement employé en cosmétique et en pharmacie comme agent humectant, il attire l'eau et augmente ainsi la teneur en eau de la peau. Cependant suite aux études de diffraction au rayons X et IR, l'équipe a montré que le glycérol n'influe que très faiblement sur la phase OR, mais il inhibe la formation de LPP ce qui affecte gravement la fonction barrière de la peau (Caussin et al. 2008).

Merle et Baillet-Guffroy en 2009, s'intéressent quant à eux à l'effet des UVA, des UVB et de l'éthanol (EtOH, promoteur d'absorption) sur le SC (Merle and Baillet-Guffroy 2009). Ils utilisent pour cela des mélanges AGL-CER-CHOL, avec 3 catégories de CER (III, IIIa et IIIb, les deux dernières présentant des insaturations) et de l'acide nervonique comme AGL (version monoinsaturée de l'acide lignocérique, l'AGL le plus abondant dans le SC).

La présence de doubles liaisons joue un rôle important dans l'impact qu'ont les agents extérieurs sur le SC. En effet l'EtOH pur, ne présente pas d'interaction avec la CER III mais provoque une diminution de la force des liaisons hydrogènes entre les groupements polaires des CER IIIa et b. Un résultat similaire est obtenu concernant l'effet des UVA. La double liaison fait que l'espace entre les carbones est plus important et l'insertion de EtOH est de ce fait plus aisée). Ces modifications restent cependant partielles, la phase OR n'est pas perturbée.

Les UVA et B ont un peu le même effet sur les molécules insaturées, à savoir une déstabilisation des chaînes (pour les AGL) mais la phase OR est conservée. Les UVA favoriseraient l'hydrogénation des doubles liaisons, les UVB créeraient de nouvelles entités oxydées qui perturberaient l'agencement. Les UVB touchent également les CER et même la CER III, insensible pourtant aux UVA et à la température, en diminuant la force des liaisons hydrogènes.

Sur des études *ex vivo*, réalisés par les mêmes auteurs sur des explants de peau humains, l'EtOH pur favorise la phase HEX (ce qui n'a pas été observé *in vitro*), il diminue également l'épaisseur du SC et forme des pores. C'est donc bien un promoteur d'absorption qui favorise la fluidification des lipides de la matrice, leur extraction et la création de pores. Les UVB quant à eux vont provoquer une transition de phase de OR à HEX. Dans leur conformation HEX les chaînes apolaires des lipides ont une organisation moins dense et moins serrée. L'espace entre deux lipides est augmenté. Cette fluidité est responsable de l'augmentation de l'épaisseur du SC.

La spectroscopie IR est un outil de choix pour analyser la structure du SC de façon précise. C'est pourquoi de nouvelles méthodes d'analyse des spectres, ont été mises au point. En effet les méthodes se basant sur la position des pics de stretching et les mesures de leur décalage dépendent de la sensibilité de l'appareil et des traitements appliqués aux spectres. C'est pour cela que Boncheva et son équipe ont proposé une nouvelle méthode d'analyse des spectres infrarouges dans le cadre de l'étude de l'organisation des lipides su SC.

## Les nouvelles méthodes d'analyse du SC basées sur l'ATR-FTIR

Boncheva et al en 2008 ont mis au point une nouvelle méthode d'analyse des spectres IR (Boncheva, Damien, and Normand 2008).

Ils se sont basés sur les modes de vibration scissoring ( $\delta$ ) et rocking ( $\rho$ ) qui ont pour particularité de présenter deux bandes lorsqu'il y a présence d'une phase OR et une seule lorsqu'il y a une phase HEX. Cette méthode se base sur la dérivée seconde des spectres. Les largeurs des bandes à 50% (FW-50) et 15% (FW-15) de la hauteur des pics de scissoring sont mesurée (Figure 23).

Avant de s'intéresser aux pics, un traitement des données est nécessaire avec entre autre la correction de la contribution spectrale de la vapeur d'eau, la dérivé seconde est calculée, une correction de la ligne de base est effectuée.

Ils ont d'abord validé la méthode avec le n-tricosane qui possède un comportement caractéristique de changement de phases en fonction de la température. Il présente 4 phases OR/FCO (face centré orthorhombique)/HEX et LIQ.

28-39°C : OR , deux bandes, FW-50 = 12  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu\text{CH}_2$  sym : 2848,3  $\text{cm}^{-1}$

40-44°C : FCO, deux bandes, FW-50 = 6  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu\text{CH}_2$  sym : 2849,4  $\text{cm}^{-1}$

44-51°C : HEX-LIQ, une bande, FW-50 = 2,5  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu\text{CH}_2$  sym : 2851,8  $\text{cm}^{-1}$

Les résultats sont similaires à ceux trouvés en regardant l'évolution de la position du pic  $\nu\text{CH}_2$  symétrique.

Cette méthode présente des avantages, l'incertitude est moindre que celle présente avec la méthode de la détermination de la position des pics, l'ampleur des valeurs des largeurs de bandes est supérieure à celle de l'écart entre les bandes, et à celle du décalage du pic  $\text{CH}_2$  stretching.

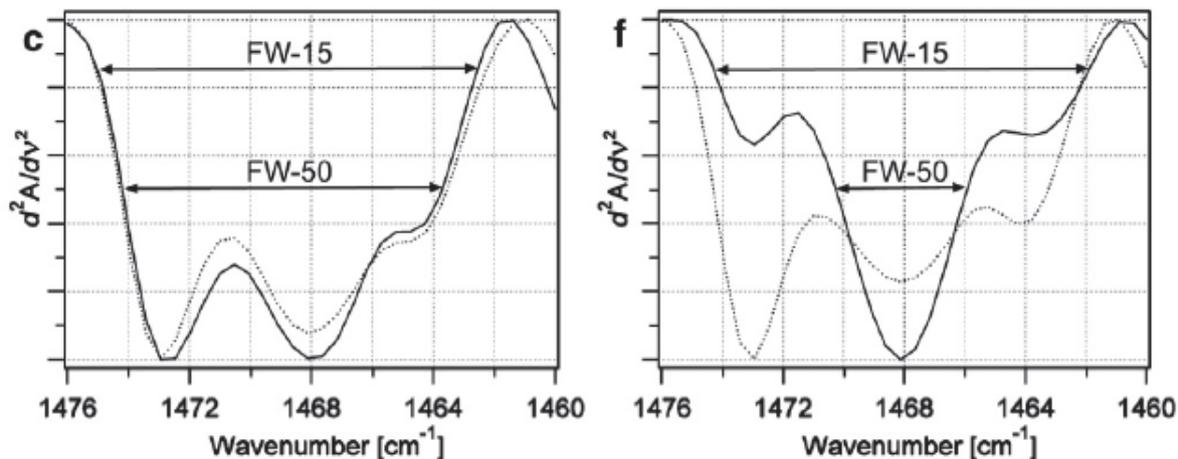


Figure 27. Méthode d'analyse des spectres par le calcul de FW (d'après Boncheva, Damien, and Normand 2008).

## 2.5. La microscopie confocale Raman

La spectroscopie Raman couplée à la microscopie confocale est une technique avec un potentiel considérable pour l'étude des tissus biologiques, non invasive *in vitro* ou *in vivo*. Elle peut être utilisée pour étudier la physiologie de la peau et des potentielles conditions pathologiques, obtenir également des données concernant la composition moléculaire et la structure de la peau, comme par exemple le contenu en eau, l'hydratation, les changements dans la fonction barrière (Förster et al. 2011).

De façon similaire à l'infrarouge, elle peut également donner des informations sur l'état de vibration et sur l'état rotationnel des molécules et des cristaux. L'activité vibratoire dans le spectre Raman n'est pas un changement du moment dipolaire comme pour l'IR mais un changement de polarisabilité de la molécule. Il est donc possible d'obtenir des informations spectrales pour des molécules avec un C=C (impossible avec IR).

### 2.5.1. Les avantages de la microscopie confocale Raman

C'est une méthode non invasive. L'échantillon mesuré *in vitro* peut servir à d'autres tests et on peut faire des mesures *in vivo*. Le couplage spectroscopie Raman/microscopie confocale, offre des possibilités de screening axiaux dans l'échantillon *in vitro* ou *in vivo*. Les étapes du screening peuvent être combinées avec une mise au point automatique pour permettre des

mesures faites automatiquement. Il n'y a pas non plus besoin de préparation préalable de l'échantillon.

### 2.5.2. Les limites de la microscopie confocale Raman

Le prix élevé de l'équipement nécessaire est un premier inconvénient. Le problème technique majeur réside dans le fort taux de fluorescence du tissu, qui chevauche les bandes du Raman (Wartewig and Neubert 2005). Cela peut être corrigé grâce à des algorithmes d'ajustement utilisés pendant l'interprétation du spectre ou en plaçant la longueur d'onde du laser dans le Proche IR (>800 nm). Mais si les intensités d'excitation sont trop fortes, cela peut décomposer thermiquement l'échantillon. La grande difficulté vient aussi du fait qu'*in vitro* ou *in vivo* les mouvements de la peau, des échantillons, les battements du cœur affectent la mise en place du zéro (point focal laser) (Chrit et al. 2005).

### 2.5.3. Les applications de la microscopie confocale Raman

Cette technique permet le suivi d'une substance dans la peau et d'évaluer les effets de promoteurs d'absorption (ex : le rétinol (Failloux et al. 2004), les filtres UV (Beyere, Yarasi, and Loppnow 2003), le DMSO (Caspers et al. 2002)...).

La microscopie confocale Raman (MCR) permet également d'avoir plus d'informations sur la physiologie cutanée comme par exemple, son contenu en eau. Contrairement aux autres méthodes indirectes présentées précédemment (PIE, cornéométrie), avec la MCR, il est possible de mesurer l'augmentation graduelle de la concentration en eau avec la profondeur. Après une calibration nécessaire (Caspers et al. 2001; Caspers et al. 2000), la fiabilité de cette méthode a été démontrée suite à une comparaison MCR et titration de l'eau par Karl Fisher dans des échantillons de peau de porc (Wu and Polefka 2008). Grâce à cette application, la MCR permet d'évaluer l'efficacité de produit hydratants de manière plus précise que la cornéométrie (Crowther et al. 2008).

Enfin tout comme l'infrarouge, la MCR permet la détermination de l'ordre des chaînes alkyles lipidiques (Gaber and Peticolas 1977).

La spectroscopie infrarouge, plus facile d'utilisation était plus développée pour l'investigation de la peau. Cependant, due à la forte absorption des radiations en IR moyen et en IR lointain par l'eau, la profondeur de pénétration des radiations et donc de l'analyse pour un tissu

naturellement hydraté comme la peau se limite à quelques micromètres. La spectroscopie IR *in vivo* ne sera utilisée que pour l'analyse des couches les plus superficielles de la peau. La spectroscopie Raman présente l'avantage de ne pas être très sensible à la présence d'eau et permet une investigation à des profondeurs de plusieurs centaines de micromètres, ce qui peut être utile pour le suivi de la pénétration de molécules dans la peau.

Pour les couches les plus superficielles de la peau, et l'étude de l'organisation des lipides du SC, ces deux techniques donnent accès aux mêmes types de spectres et d'informations. Seule la position des bandes (IR) ou raies (Raman) d'intérêt est quelque peu décalée (ex :  $\delta$  CH<sub>2</sub> = 1468 cm<sup>-1</sup> (IR) et 1438 cm<sup>-1</sup> (Raman)). De plus la spectroscopie Raman donne accès à des données sur la vibration des liaisons types C=C, contrairement à la spectroscopie IR. Suivant les applications l'une ou l'autre de ces techniques sera choisie.

## ***2.6. La quantification des lipides cutanés***

L'utilisation de la chromatographie a été privilégiée pour la quantification des lipides cutanés. Comme les céramides sont dépourvues de chromophore, les premiers axes de recherche ont été de greffer une molécule soit absorbant dans les UV (Iwamori, Costello, and Moser 1979) soit fluorescente (Previati et al. 1996) pour pouvoir utiliser la chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée à un détecteur UV ou un détecteur à fluorescence. La technique d'HPLC a été choisie pour sa rapidité, sa reproductibilité, sa sensibilité et sa haute résolution (Cremesti and Fischl 2000).

L'arrivée de détecteur à diffusion de lumière (Evaporative Light Scattering Detector ELSD) a permis la détection des céramides en analyse directe, sans avoir recours à une modification de la molécule au préalable (Christie 1985). L'ELSD sépare les particules non volatiles d'un éluant volatile. La quantification vient du fait que la réponse (la quantité de lumière diffusée) est fonction de la masse de la particule, cependant cette réponse est en général non linéaire et dépend des paramètres d'analyses de la machine (température, pression) préalablement choisis (Mcnabb et al. 1999). C'est pour ces raisons que l'ELSD est devenue la méthode la plus utilisée pour la détection des lipides par HPLC (Gaudin et al. 1999; Graeve and Janssen 2009). Norlén et al. ont développé une méthode permettant de séparer les différentes classes de lipides présentes dans le SC et ont pu estimer sa composition (15% d'ester de cholestérol, 16% d'AGL saturés à longues chaînes, 32% de cholestérol, 37% de céramide), un exemple de spectre est

représenté Figure 28 (Norlén et al. 1998). Il faut noter que la chromatographie gazeuse est souvent plus performante pour les AGL (Fisk et al. 2014).

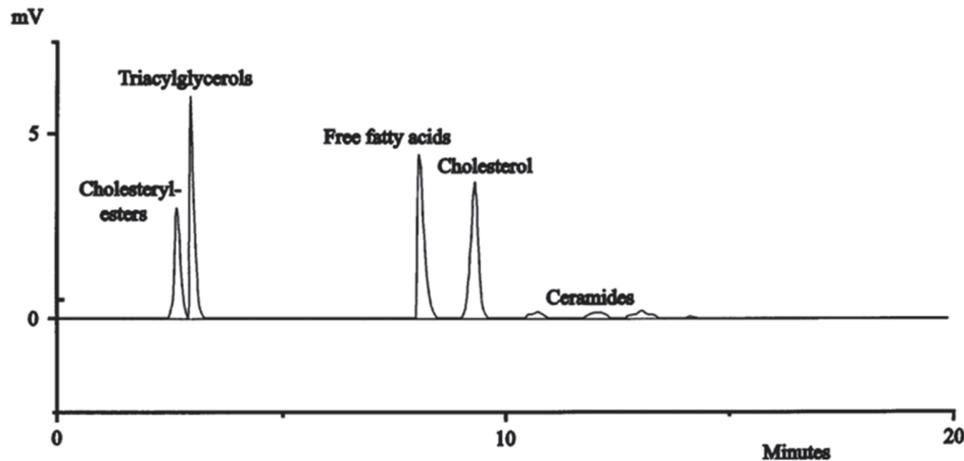


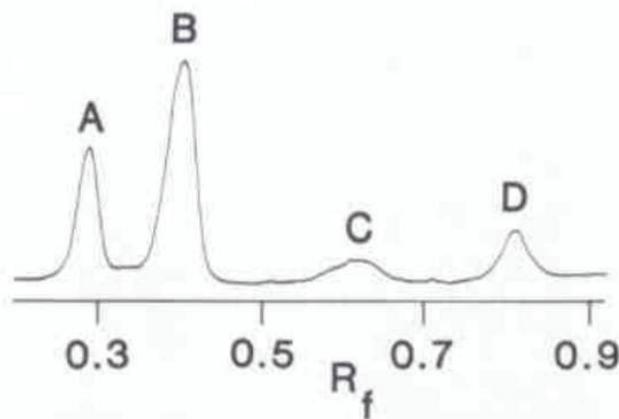
Figure 28. Chromatogramme HPLC-ELSD des lipides extraits par la méthode *in vitro* de Folch (chloroforme/méthanol) d'un SC isolé de sein (d'après Norlén et al. 1998)

La spectrométrie de masse est également un outil puissant pour la détermination des molécules (Hinder et al. 2011). Elle est basée sur le ratio masse/charge. Des méthodes d'ionisation par électronébuliseur couplées à la spectrométrie de masse ont permis la séparation et la quantification des céramides (Gu et al. 1997). Il en est de même pour la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Mano et al. 1997).

Pour avoir accès à l'analyse de ces lipides, des techniques d'extraction doivent préalablement être réalisées.

Après avoir isolé l'épiderme, en le séparant du derme, par la chaleur ou après avoir isolé le SC par différentes méthodes comme le tape-stripping, la colle cyanoacrylate ou la trypsination, l'extraction des lipides est le plus souvent réalisée avec des mélanges Chloroforme/Méthanol. Bligh et Dyer ont développé une procédure pour des tissus contenant 80% d'eau et 1% de lipides. 100g de l'échantillon est mixé dans un mélange de 100 mL de chloroforme et 200 mL de méthanol pendant 2 minutes puis 100 mL de chloroforme sont ajoutés, après 30 secondes de mélange, 100 mL d'eau distillée sont ajoutés. Après filtration, et séparation des phases, la phase contenant le chloroforme est récupérée, contenant les lipides. Suivant la proportion d'eau contenu dans l'échantillon de tissu l'important est de respecter un ratio chloroforme, méthanol, eau avant et après la dilution de 1 :2 :0.8 et 2 :2 :1.8 pour une extraction optimale. Wertz et al.

se sont inspirés de cette méthode pour l'extraction des lipides liés et non liés du SC de cochon. Les couches de SC sont baignées dans 3 solutions séparées de chloroforme/méthanol (2 :1, 1 :1 et 1 :2, v/v) pendant 2h pour chaque bain, le SC étant récupéré par filtration. Puis la séquence est répétée avec un temps de contact d'1h pour extraire les lipides non polaires et les céramides. Enfin, afin d'extraire les dernière trace de lipides polaires, le SC est laissé dans le méthanol pur durant la nuit. Les extraits sont combinés et séchés puis repris avec du chloroforme/méthanol pour l'analyse. Pour les lipides liés, le SC est ensuite plongé pendant 1h dans une solution 1M de NaOH dans 90% de méthanol puis cette solution est acidifiée à pH 4 avec 2M d'HCl et mélangé avec du chloroforme. Le chloroforme est récupéré. Cette technique a permis de mettre en évidence la présence de 14,7% de lipides non liés en poids sec du SC et 2,1% de lipides liés (majoritairement de l' $\omega$ -hydroxyacylsphingosine). Ils ont étudié la composition des lipides liés au SC humain après leur technique d'extraction par chromatographie sur couche mince et ont obtenu un tracé fait par un densitomètre représenté en Figure 29 Ils ont ainsi pu exprimer en pourcentages massique la composition des lipides (Tableau...) (Bligh and Dyer 1959; Wertz, Madison, and Downing 1989).



*Figure 29 Tracé par un densitomètre d'un chromatogramme sur couche mince des lipides liés du SC humain. A : Cer-B ( $\omega$ -hydroxyacide-céramide) ; B : Cer-A ( $\omega$ -hydroxyacide amide lié à une base sphingosine de 30 à 34 carbone) ; C :  $\omega$ -hydroxyacides ; D : AG ; R<sub>f</sub> (facteur de rétention) (d'après Wertz, Madison, and Downing 1989)*

Tableau 7. Composition des lipides liés du SC humain en pourcentage massique, (d'après Wertz, Madison, and Downing 1989)

Source	% lipides liés	CER-A	CER-B	$\omega$ -hydroxy-acide	Acide gras
Dos	1.1	49.8	27.1	11.2	11.9
Dos	1.5	54.5	21.5	11.6	12.4
Jambe	1.2	55.3	25.6	7.8	11.8
Jambe	2.0	53.3	25.0	6.8	14.7
Moyenne	1.5	53.3	24.8	9.4	12.7
Ecart-type	0.4	2.1	2.1	2.1	1.2

## 2.7. La pénétration cutanée

Au-delà de son intérêt pour évaluer l'efficacité ou la toxicité de certains produits, la pénétration cutanée est un bon reflet de la fonction barrière de la peau. Si celle-ci est altérée, la pénétration de toute molécule se trouvera modifiée (Levin and Maibach 2005). La méthode la plus utilisée pour apprécier la pénétration cutanée est la méthode de diffusion en cellules de Franz (Franz 1975). Ces méthodes sont standardisées grâce aux directives de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques, où sont détaillées les recommandations sur le protocole à suivre pour des études *in vitro* d'absorption percutanée (OECD, 2004).

## 2.8. Evaluation des lipides de surface

### 2.8.1. La sébumétrie

Même si leur rôle n'est pas encore tout à fait élucidé, nous avons précédemment souligné l'importance des lipides de surface dans la fonction barrière de la peau. Deux paramètres sont importants pour l'évaluation des lipides : le niveau courant de sébum présent sur la peau et le flux de sébum (ou cinétique de réapparition du sébum).

Deux appareils existent pour quantifier le sébum de la peau. Le sébutape® (CuDerm Corporation) et le Sébumètre® (Courage et Khazaka) sont des appareils basés sur le changement de couleur d'un film lors de l'absorption des lipides sur celui-ci. Le sébutape mesure ce changement par chromamétrie en réflexion, densitométrie, analyse d'images et le

Sébumètre mesure le degré de transparence du film par photométrie. Le Sébutape apporte en plus des informations sur le nombre de follicules excréteurs et la quantité de sébum excrétée par follicule et le flux sébacé (Lambers and Pronk 2002).

### 2.8.2. La méthode des angles de contact

Plusieurs chercheurs ont reporté des mesures d'angles de contact sur la peau humaine, montrant que la variation de ces angles était en relation avec une modification des lipides de surface (Rosenberg, Williams, and Cohen 1973; Ginn, Noyes, and Jungermann 1968; Rosenberg and Cohen 2012).

Les propriétés de surface de la peau (énergie de surface, polarité) sont utiles pour voir l'influence de composés chimiques sur les lipides de la peau, et l'état basal de la surface cutanée.

La technique des angles de contact consiste à déterminer l'énergie de surface du solide à étudier. L'énergie de surface ou tension de surface est l'énergie nécessaire pour accroître la surface de l'interface de 1 m<sup>2</sup>. Cette grandeur est donnée en N/m ou en J/m<sup>2</sup>. Elle est notée  $\sigma_s$  ou  $\gamma$  et sa valeur peut être modifiée par différents traitements.

L'angle de contact caractérise l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. Il est déterminé en mesurant l'angle formé entre une goutte de liquide et une surface solide. En utilisant plusieurs liquides de référence différents, la mesure de l'angle permet de calculer l'énergie de surface du solide.

Il est de plus possible de déduire le caractère hydrophile ou lipophile d'une surface car la mesure d'angle de contact permet aussi la discrimination de la nature apolaire ou polaire des interactions à l'interface liquide-solide.

### Détermination de l'énergie de surface

Trois paramètres régissent la forme d'une goutte à la surface d'un solide (Figure 30) :

- La tension interfaciale solide-liquide :  $\gamma_{SL}$
- La tension interfaciale solide-vapeur :  $\gamma_{SV}$  ou  $\gamma_S$
- La tension interfaciale liquide-vapeur :  $\gamma_{LV}$  ou  $\gamma_L$

L'équation de Young relie ces trois paramètres, avec  $\theta$  l'angle de contact.

$$\gamma_s = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos(\theta)$$

Équation 1: équation de Young

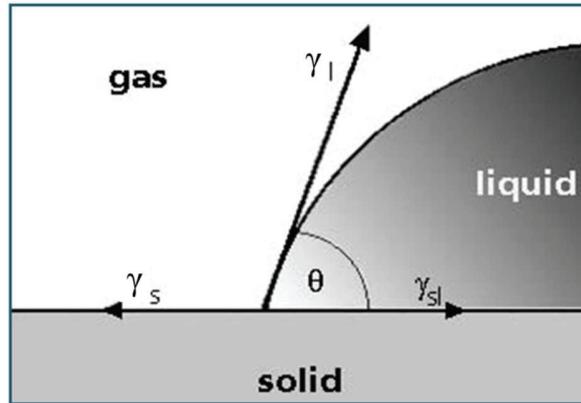


Figure 30. Formation d'un angle de contact sur une surface solide d'après Young

Cependant, seuls la tension interfaciale liquide-vapeur  $\gamma_L$  et l'angle de contact  $\theta$  sont mesurables. Il est donc nécessaire d'avoir une relation supplémentaire pour estimer l'énergie de surface du solide  $\gamma_s$ . Afin de résoudre cette équation, différents modèles ont donc été proposés (modèles de Owens, Wendt, Rabel et Kaelble (OWRK), de Fowkes, de Oss and Good, de Wu, de Zisman, de Schultz, ou de l'équation d'état).

Dans ce projet de recherche, l'énergie de surface a été déterminée par la méthode de Owens, Wendt, Rabel et Kaelble (OWRK) car celle-ci permet en plus de déterminer la polarité de la surface (Owens and Wendt 1969; Kaelble 1970). Dans ce modèle, les énergies de surface des liquides et du solide sont décomposées en deux composantes : l'une dite dispersive  $\sigma^d$  et l'autre dite polaire  $\gamma^p$ .

$$\gamma_L = \gamma_L^d + \gamma_L^p$$

Équation 2: décomposition de l'énergie de surface du liquide

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$$

Équation 3: décomposition de l'énergie de surface du solide

La tension interfaciale solide-liquide est donc écrite de la manière suivante :

$$\gamma_{s-l} = \gamma_s + \gamma_l - 2\sqrt{\gamma_s^d \sigma_l^d} - 2\sqrt{\gamma_s^p \sigma_l^p}$$

Équation 4: décomposition de la tension interfaciale solide-liquide selon modèle OWRK

La relation liant l'angle de contact aux composantes de dispersion et polaire de l'énergie de surface est obtenue en combinant l'équation 4 avec l'équation 1 de Young :

$$\gamma_L (1 + \cos(\theta)) = 2\sqrt{\gamma_L^d \cdot \gamma_s^d} + 2\sqrt{\gamma_L^p \cdot \gamma_s^p}$$

Équation 5: équation reliant l'angle de contact aux composantes

Il est ainsi possible de calculer les composantes polaires et de dispersion de l'énergie de surface du solide en mesurant les angles de contact de divers liquides dont les composantes polaires et dispersives sont connues et en effectuant une régression linéaire) (Figure 31).

L'équation transposée est la suivante :

$$\frac{(1 + \cos \theta)\gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}} + \sqrt{\gamma_s^d}$$

$\underbrace{\hspace{1.5cm}}_y = \underbrace{\hspace{0.5cm}}_m \underbrace{\hspace{1.5cm}}_x + \underbrace{\hspace{0.5cm}}_b$

Équation 6: équation de la régression linéaire

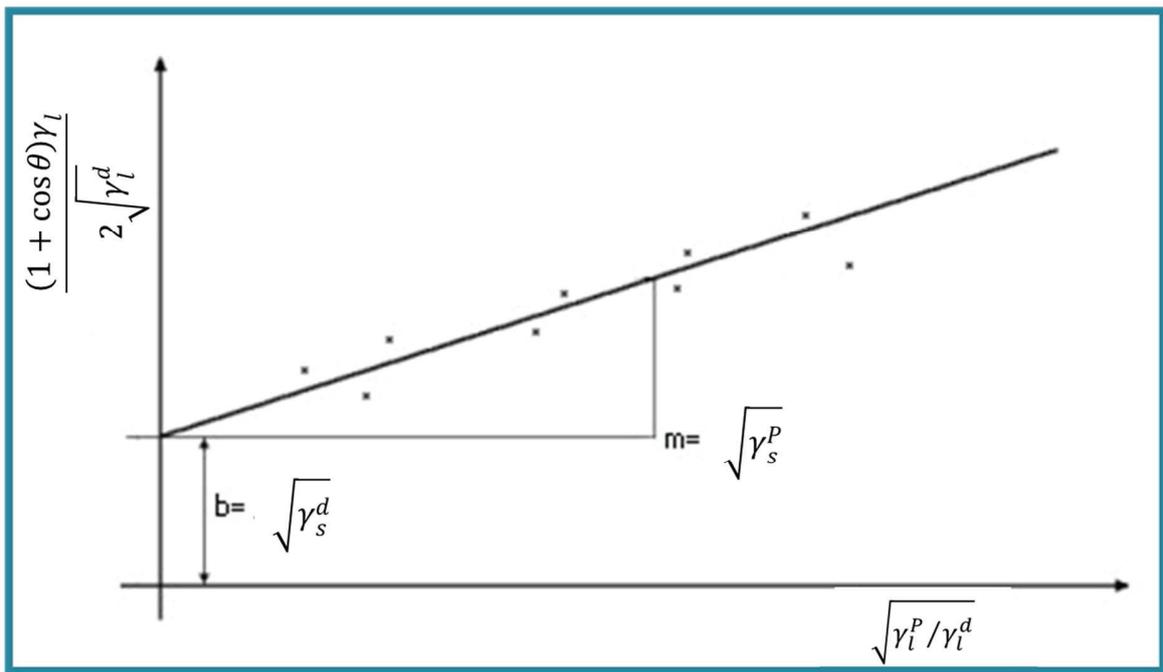


Figure 31. Graphique de détermination des composantes polaires et de dispersion de l'énergie de surface du solide (d'après Owens and Wendt 1969; Kaelble 1970)

La composante de dispersion  $\sigma_s^D$  est le donc le carré de l'ordonnée à l'origine de la droite ( $b^2$ ), la composante polaire  $\sigma_s^P$  est le carré de la pente de la droite ( $m^2$ ).

Sachant que l'énergie de surface du solide est la somme de ces composantes (équation 3), il est ainsi possible de déterminer l'énergie de surface ou tension interfaciale de surface du solide.

### **Méthode de la goutte posée : principe**

La méthode de la goutte posée est une méthode optique de détermination d'angle de contact.

Cette méthode permet de déterminer l'affinité de la surface avec le liquide. Plus la surface étudiée a d'affinité avec le liquide, plus l'angle de contact est faible car la goutte s'étale à la surface. Moins la surface a d'affinité avec le liquide, plus l'angle de contact est élevé car le liquide minimise au maximum sa surface de contact avec le support. Ainsi en mesurant l'angle formé par l'eau sur la surface, il est possible de déterminer l'hydrophobie (grand angle) ou l'hydrophilie (petit angle) de la surface.

La peau est une surface solide, recouverte d'un film hydrolipidique. D'après Mavon, le statut physicochimique de la surface de la peau peut apporter des informations sur la composition et le comportement du ciment lipidique. De plus, l'absorption percutanée est un phénomène de diffusion dépendant de la zone de contact entre la surface de la peau et la molécule pénétrante, ce qui est relié à la mouillabilité de la peau. Ainsi étudier l'énergie libre de surface de la peau peut apporter des informations sur l'effet d'une molécule sur la peau comme son action sur la composition lipidique de la surface cutanée. En effet, les lipides sont les principaux responsables des propriétés de surface de la peau (polarité, mouillabilité). Grâce à cette technique basée sur les angles de contact, Mavon et al. ont pu analyser les propriétés de surface de la peau et ont souligné l'influence de l'extraction lipidique par l'éther sur l'énergie de surface de la peau, montrant ainsi l'intérêt de cette méthode pour l'étude des lipides de surface et même matriciels (Mavon et al. 1997).

Elkhyat et al. quant à eux ont développé cette méthode en construisant des formules standardisées pour l'établissement de trois nouveaux paramètres issus des mesures d'angle de contact : l'hydrophilie, l'hydrophobie et la polarité de la peau (Elkhyat et al. 2001).

### 3. Evaluation de la toxicité et de l'irritation cutanée

#### *3.1. Rappel sur la physiopathologie de l'irritation et l'inflammation cutanée.*

Lors d'une blessure, d'une infection ou de contact avec des chimiques, la couche cornée est traversée et/ou altérée. Une réponse inflammatoire est alors mise en place par les cellules résidentes de l'épiderme et du derme. Cette réaction induit le recrutement de cellules immunitaires circulantes.

Au niveau de l'épiderme, les kératinocytes sont la principale source de cytokines (CK), molécules de l'inflammation qui seront décrites ultérieurement. Les kératinocytes sont importants dans l'initiation et le développement des réactions inflammatoires et immunologiques. Après une stimulation, les kératinocytes sont capables de sécréter des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ ), des chimokines (IL-8), des facteurs de croissance (IL-6, TGF- $\alpha$ ) et des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ ) (Williams and Kupper 1996). Cette sécrétion peut être induite par des stimuli externes non spécifiques (UV, agents chimiques). Les kératinocytes produisent également des molécules antimicrobiennes (cathélicidine, défensine). Les kératinocytes sont importants pour la réponse immunitaire innée et participent directement à l'activation de l'immunité spécifique via la sécrétion de CK. Au-delà des kératinocytes, il existe d'autres cellules résidentes participant à la réaction d'inflammation. Parmi elles on retrouve les cellules de Langerhans, qui vont former un véritable réseau dendritique entourant les kératinocytes capable de détecter les antigènes qui franchissent le SC, les mélanocytes, capables de sécréter des CK (Corsini and Galli 2000) et les mastocytes, cellules granuleuses du derme exprimant des récepteurs à haute affinité pour les Ig E, responsables des réactions allergiques immédiates et qui vont sécréter des molécules de l'inflammation et l'allergie comme le TNF- $\alpha$ , l'histamine (Williams and Kupper 1996).

Avec son arsenal de cytokines, la peau fonctionne comme une barrière immunitaire entre l'environnement extérieur et les tissus internes. Les cytokines sont des petites molécules polypeptidiques qui interagissent avec des récepteurs spécifiques, et sont produites de façon locale et transitoire en réponse à une stimulation exogène.

Les cellules cutanées résidentes synthétisent et sécrètent des médiateurs inflammatoires qui sont libérés suite à divers stimuli. Parmi ces médiateurs, des cytokines dites primaires, préstockées dans les cellules vont induire la sécrétion d'une deuxième vague de cytokines néosynthétisées cette fois, appelées cytokines secondaires. Ce système d'induction de cytokines en cascade permet une réponse inflammatoire rapide et amplifiée.

Parmi les CK primaires il y a l'interleukine-1. Trois formes d'IL-1 ont été décrites, l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-1ra (IL-1 receptor antagonist) se liant aux mêmes récepteurs. La source majeure d'IL-1 $\alpha$  est le KC, alors que l'IL-1 $\beta$  est essentiellement produite par les CL. Les activités pro-inflammatoires de l'IL-1 $\alpha$  sont nombreuses, notamment (i) l'induction de sa propre expression, d'autres interleukines, de facteurs de croissance et de chimiokines, (ii) l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion favorisant l'infiltration cellulaire, (iii) la prolifération des kératinocytes et (iv) l'augmentation de l'activité des macrophages (Dinarello 1998; Corradi, Franzi, and Rubartelli 1995).

Il y a également le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) qui existe sous deux formes, une forme soluble et une forme membranaire. Le TNF- $\alpha$  soluble est impliquée dans les réactions inflammatoires systémiques, alors que la forme membranaire est impliquée dans les réactions inflammatoires locales. Le TNF- $\alpha$  est stocké dans les mastocytes du derme (Gordon and Galli 1990) et lors d'un stimulus il est aussi produit par les kératinocytes, les cellules de Lagerhans et d'autres types cellulaires (Larrick et al. 1989; Köck et al. 1990).

Comme l'IL-1 $\alpha$ , le TNF- $\alpha$  induit l'expression de cytokines secondaires exerçant ainsi des fonctions variées dans la génération de l'inflammation notamment dans l'infiltration des leucocytes.

L'interleukine-6 fait partie des cytokines secondaires. Elle est relarguée par presque toutes les cellules en réponse à un stimulus. Sa présence est ainsi un bon marqueur de l'inflammation. L'IL-6 est un important médiateur de l'inflammation et active la production des protéines de la phase aiguë. Elle agit sur la prolifération et la différenciation des LB et des LT cytotoxiques dans la réponse immunitaire spécifique (Akira, Taga, and Kishimoto 1993). Le dysfonctionnement de la production d'IL-6 pourrait contribuer aux maladies cutanées, en effet une augmentation de sa production et de l'expression son récepteur (IL-6R) a été détectée dans les peaux psoriatiques (Grossman et al. 1989).

Parmi les CK secondaire il y a également les facteurs de croissance hématopoïétiques qui sont produits par de nombreux types cellulaires et qui régulent la différenciation et la prolifération des

cellules souches hématopoïétiques. Le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) est particulièrement impliqué dans les réactions inflammatoires. C'est un facteur de croissance des neutrophiles, des éosinophiles et des macrophages, produit notamment par les kératinocytes en présence de l'IL-1 ou suite à l'application d'irritant par exemple (Kaplan et al. 1992).

Enfin, les chimiokines sont des petites protéines sécrétées (6-14 kDa) qui régulent le trafic de différents leucocytes, des cellules dendritiques et des monocytes en contrôlant leur adhésion aux cellules endothéliales, ainsi que leur migration et leur recrutement dans le tissu par chimiotactisme. Par exemple IL-8 est préférentiellement chimiotactiques pour les neutrophiles. La combinaison des chimiokines produites dans un tissu en réponse à un agent pathogène contrôle la mise en place et l'orientation de la réponse immunitaire, en influant sur la quantité de cellules recrutées dans un tissu, mais aussi sur la nature de ces cellules recrutées en fonction des récepteurs qu'elles expriment (Moser et al. 2004).

Il existe d'autres molécules pro-inflammatoires telles que l'acide arachidonique et ses métabolites. L'acide arachidonique est issu de phospholipides des membranes cellulaires sous l'action de la phospholipase A2. Il est libéré rapidement en réponse à des chimiques *in vitro* et *in vivo* (Marks, Fürstenberger, and Müller-Decker 1998). Les métabolites de l'acide arachidonique appelés les éicosanoïdes, comme les prostaglandines, les leucotriènes et les thromboxanes, jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire. Les réactifs oxygénés (OH,  $1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) appelés aussi radicaux libres oxygénés ou ROS (Reactive Oxygen Species) produit de façon excessive, active la formation de médiateurs inflammatoires issus de l'acide arachidonique. L'irradiation aux rayons UV, l'IL-1 $\alpha$  ou le TNF- $\alpha$  conduisent à la génération de forte concentration de ROS (Camhi, Lee, and Choi 1995).

Le système immunitaire cutané peut être activé par divers stimuli, telle une blessure, une exposition aux UV ou à des chimiques. Les xénobiotiques sont des agents chimiques non protéiques pouvant être de deux types : irritants ou haptènes.

Les irritants sont capables d'activer le système immunitaire inné cutané conduisant à une irritation cutanée qui peut évoluer en une maladie inflammatoire, la dermatite irritante de contact (DIC). En tant que molécules chimiques, ils ne sont pas détectés par le système immunitaire, mais par leurs propriétés physicochimiques toxiques ils déclenchent un signal de danger responsable de l'activation de la réponse innée. Les molécules impliquées dans le signal de danger sont sous forme préstockée dans les cellules du tissu endommagé, pour initier rapidement la réponse immunitaire, et sous forme néo-synthétisée afin de la mettre en place.

Selon la nature du chimique, la dose et la fréquence d'exposition, l'irritation cutanée peut aboutir à des manifestations cliniques plus ou moins visibles.

Les haptènes sont, en plus d'être pourvus d'un pouvoir irritant, capables d'induire une réponse immunitaire adaptative. Les haptènes sont responsables de l'eczéma allergique de contact appelé aussi dermatite allergique de contact (DAC). Comme pour les irritants, les haptènes ne sont pas reconnus directement par le système immunitaire, mais par leur propriété de liaison aux protéines ils sont capables de former des peptides hapténisés pouvant être présentés au système immunitaire et ainsi déclencher l'activation de lymphocytes T spécifiques.

Cliniquement, l'irritation cutanée compte pour 70% des cas de dermatites de contact. La présence d'érythème, d'œdème, de sècheresse cutanée, de fissures, de desquamation, de démangeaisons et de douleurs sont des signes de dermatite de contact irritante mais aussi d'allergie de contact. Pour différencier ces deux pathologies, seule l'irritation cutanée provoque une réponse inflammatoire directe, non immunogène qui disparaît en quelques jours. Les irritations aiguës surviennent rapidement après une seule exposition au produit, les irritations cumulatives, les plus fréquentes, surviennent suite à l'exposition répétée à des irritants assez doux. Ces deux formes sont caractérisées par une réaction inflammatoire prédominante, contrairement à l'irritation chronique qui est le plus souvent caractérisée par une hyperkératose, conduisant à un épiderme plus épais (Welss, Basketter, and Schröder 2004). Un irritant est un agent chimique capable d'altérer et/ou de pénétrer dans la peau par ses propriétés physicochimiques et ainsi être toxique au contact des cellules cutanées. La corrosivité et la capacité de pénétration dans la peau sont deux paramètres importants du pouvoir irritant des xénobiotiques, propriétés notamment utilisées dans la détermination de la toxicité de nouveaux chimiques (Barratt 1995). Le pouvoir irritant d'une substance est lié (i) à sa capacité à rompre et/ou pénétrer la barrière cutanée (Ponec 1992) et (ii) à sa toxicité conduisant à la perturbation des membranes des cellules cutanées. L'effet des irritants sur les cellules se caractérise par une perturbation du fonctionnement des cellules. L'hétérogénéité des propriétés physicochimiques des molécules irritantes explique des effets variables sur les cellules. Les solvants et les détergents perturbent les membranes cellulaires et leur fluidité par leurs actions sur les lipides, comme le sulfate de sodium dodecyl (SDS) appelé aussi sulfate de sodium lauryl (SLS) souvent utilisé dans les études. Ces modifications induisent l'activation et/ou la mort des cellules par apoptose ou par nécrose suivant la nature et la dose de l'irritant. Ces cellules vont ainsi libérer des médiateurs pro-inflammatoires (histamines, prostaglandines, cytokines...) (Nickoloff and Naidu 1994) qui seront responsables de l'activation du système immunitaire inné cutané induisant l'inflammation. Le pouvoir irritant dépend de la dose, de la durée et de la fréquence d'exposition, mais aussi de facteurs environnementaux (pollution,

stress, infection...) et génétiques, il est donc difficile de prévoir chez un individu donné les effets d'un produit donné. En fait tout chimique est un irritant cutané potentiel, un faible pouvoir irritant et une exposition relativement limitée fait apparaître certains chimiques peu irritants comme non irritants. Pour la mise sur le marché de leurs produits, les industriels se doivent d'évaluer leur toxicité. Ceci a nécessité le développement de modèles d'études concernant l'irritation cutanée.

### ***3.2. Les modèles et tests in vivo***

Dans les années 40 est apparu le test de Draize, pour prédire le pouvoir irritant de matières premières ou de produits finis. Le modèle de Draize consiste à appliquer sur la face dorsale de 3 à 6 lapins albinos, le chimique d'intérêt de façon semi-occlusive (gaze) pendant 24 heures, le niveau d'irritation est évalué suite à l'examen visuel de la peau du lapin, de la présence d'érythème ou d'œdème puis un score est attribué en fonction des observations cliniques sur le site d'application après 24, 48 et 72 heures.. (OCDE; Draize, Woodard, and Calvery 1944) Durant la seconde moitié du 20ème siècle il a été le test le plus utilisé pour l'évaluation de l'irritation cutanée. Cependant la reproductibilité et la prédiction par rapport aux résultats obtenus chez l'homme restent faibles, le test sur les lapins sous-estimait et quelques fois surestimait l'irritation (Nixon, Tyson, and Wertz 1975; Phillips et al. 1972). Ceci est dû à la différence physiologique entre la peau de lapin et la peau humaine. Suite à ces résultats, et d'un point de vue éthique concernant l'expérimentation animale (Directive Européenne 76/768/EEC et règlement cosmétique 1123/2009), la mise en place de méthodes d'évaluation alternatives a vu le jour.

### ***3.3. Les tests chez l'homme***

Chez l'homme l'utilisation de patch est la méthode la plus courante et la plus proche des conditions réelles d'exposition par rapport aux tests de scarification (Frosch and Kligman 1976) ou d'applications répétées de l'agent chimique chimique (Bowman et al. 2002). La méthode consiste à appliquer pendant 4 heures une quantité standardisée du produit à tester sur la peau d'un volontaire sous un patch occlusif. Pour éviter toute réaction exacerbée, le test est surveillé 15 min, 30 min puis toutes les heures suivant l'application (Basketter et al. 1997). Puis un score est attribué en fonction des observations cliniques sur le site d'application, de la même façon que pour le modèle du lapin de Draize. Les agents chimiques sont classés comme non irritant,

irritant ou corrosif, correspondant pour la législation européenne à non classé, R38 ou R34 respectivement.

### ***3.4. Les modèles de peau reconstruites***

Depuis les années 80, différents modèles de peau ont été développés, nombre ont été validés par l'ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods). Parmi eux, en 2007 et 2008, trois modèles d'épiderme humain reconstruit (RHE) ont été validés par l'ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) pour remplacer le test de Draize dans l'évaluation de l'irritation cutanée : EpiDerm™ SIT, EpiSkin™ et SkinEthic™ RHE (Alépée et al. 2010). Ils ont fait l'objet de nombreuses études de fiabilité concernant les tests d'irritation cutanée (Faller and Bracher 2002). Il a cependant été montré que malgré leur forte ressemblance avec l'épiderme humain, la plus grande limite de ces modèles résulte de leur plus forte perméabilité, provenant d'une fonction barrière moindre (Ponec et al. 2001; Schmook, Meingassner, and Billich 2001). Le Tableau 8 expose les caractéristiques morphologiques de l'épiderme et des modèles existants (Ponec et al. 2002).

*Tableau 8. Caractéristiques morphologiques de l'épiderme et des modèles de peau reconstruite.*

Modèle	EpiDerm modèle de irritation (EPI-200-F)	EpiDerm modèle de pénétration (EPI-606-A)	EpiSkin modèle d'irritation	EpiSkin modèle de pénétration	SkinEthic modèles d'irritation et de pénétration	RE-DED (Epiderme reconstruit sur derme dé-épidermisé)	Peau native
<b>Architecture du tissu</b>							
Stratification	Toutes les strates (SB, SS, SG, SC)	Toutes les strates (SB, SS, SG, SC)	Toutes les strates (SB, SS, SG, SC)	Toutes les strates (SB, SS, SG, SC)	Toutes les strates (SB, SS, SG, SC)	Toutes les strates (SB, SS, SG, SC)	Toutes les strates (SB, SS, SG, SC)
Nombre de couche de cellules viables	7-14	6-8	7-10	7	5-9	6-10	7-12
Epaisseur de l'épiderme (µm)	83-100	28-43	24-69	38-48	23-59	40-60	80-90
<b>Membrane basale</b>							
Lamina densa/lucida	Fragmentée	Fragmentée	Fragmentée	Fragmentée	Fragmentée	Continue	Continue
Hémidesmosomes	Présent dans 50% des cultures	Présent dans 50% des cultures	Présence rare	Présence rare	Présent	Présent	Présent
<b>Stratum basale</b>							
Forme de la cellule	Cylindrique à ronde	Cylindrique à ronde	Ronde et irrégulière	Ronde et irrégulière	Cylindrique à ronde	Cylindrique à ronde	Cylindrique
Goutte de lipides intracellulaire	Présent	Présent	Présent	Présent	Occasionnellement présent	Absent	Absent
<b>Stratum spinosum</b>							
Forme de la cellule	Couches supérieures : cellule aplatis	Couches supérieures : cellule aplatis	Cellule aplatis et forme irrégulière	Cellule aplatis et forme irrégulière	Cellule aplatis	Couches supérieures : cellule aplatis	Couches supérieures : cellule aplatis
Goutte de lipides intracellulaire	Occasionnellement présent	Occasionnellement présent	Occasionnellement présent	Occasionnellement présent	Occasionnellement présent	Absent	Absent
<b>Stratum granulosum</b>							
Corps lamellaires	Normaux, nombreux	Normaux, nombreux	Normaux, nombreux	Normaux, nombreux	Normaux, nombreux	Normaux, nombreux	Normaux, nombreux
Granules de kéatohyaline	Etoilé et arrondi	Etoilé et arrondi	Elargi et arrondi	Elargi et arrondi	Etoilé et arrondi	Etoilé	Etoilé
<b>Stratum corneum</b>							
Nombre de couches cellulaires	16-25	16-25	15-24	60-100	14-24	15-20	15-20
Epaisseur du SC (µm)	12-28	12-28	17-37	73-102	15-32	14-17	10-12
Organisation des couches lipidiques	Faiblement organisé	Faiblement organisé	Densément organisé	Densément organisé	Densément organisé dans quelques cultures	Faiblement organisé	Faiblement organisé
Extrusion des corps lamellaires à l'interface SG/SC	Complète et rapide	Complète et rapide	Retardée ; CL présents le SC supérieur	Retardée ; CL présents le SC supérieur	Retardée dans certaines cultures	Complète et rapide	Complète et rapide
Goutte de lipides intracornéocytaires	Parfois présent	Parfois présent	Souvent présent	Souvent présent	Souvent présent	Absent	Absent
Organisation des lipides intercellulaires	Régulier lamellaire	Régulier lamellaire	Localement lamellaire	Localement lamellaire		Régulier lamellaire	Régulier lamellaire
Distance de répétition (motif) de la phase lamellaire		12 nm				12 nm	6.4 nm 13.4 nm
Cholestérol cristallin	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Quasi absent

Ces différents modèles ont été comparés suivant plusieurs critères. L'architecture tissulaire a été examinée à l'aide de microscopie optique, électronique et par immunohistochimie. La composition en lipides épidermique a été analysé par chromatographie sur couche mince haute

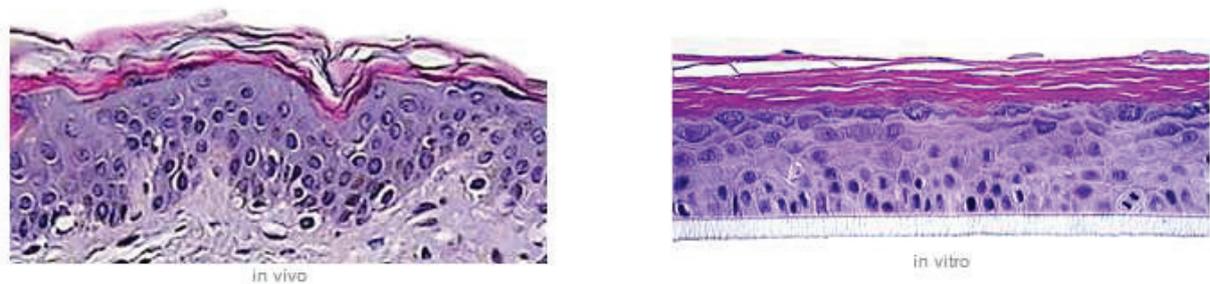
performance. L'examen histologique a montré que l'épithélium était complètement stratifié pour tous les modèles de peaux et était de cette manière proche du SC natif. Peu de variation au sein du même lot concernant l'architecture tissulaire mais une variation considérable entre des lots différents a été observé pour tous les modèles. Dans la plupart des modèles, quelques différences indiquent des perturbations dans le processus de différenciation. Cela inclut : (1) la transition relativement abrupte des cellules basales cubiques aux cellules aplaties granuleuses dans les modèles SkinEthic et Episkin ; (2) la forme globale des granules de kératohyaline avec moins de réseau de filament de kératine formé et une expression réduite des kératines différenciées spécifiques (K1 et K10) dans les modèles Episkin ; (3) la variation dans l'expression d'un certain nombre de marqueurs protéiques spécifiques comme la kératine 6, l'involucrine, les transglutaminases dans la plupart des modèles et (4) la présence de gouttes de lipides dans les cellules basales des modèles EpiDerm, SkinEthic et Episkin et dans les cellules suprabasales de certains de ces modèles.

Un des critères les plus importants pour évaluer la performance des systèmes de culture de peau *in vitro* est la formation d'une barrière perméable compétente car en effet, les produits appliqués de façon topique doivent d'abord passer à travers le SC. Comme la perméabilité de la peau est essentiellement due à la matrice lipidique extracellulaire du SC, provenant de l'extrusion du matériel contenu dans les corps lamellaires, l'étude de l'organisation et de la composition de ces lipides est importante. Pour les modèles EpiDerm et RE-DED (épiderme reconstruit sur derme dé-épidermisé), les corps lamellaires sont dans les couches supérieures du stratum spinosum comme pour le SC natif, et leur extrusion a été complète à la frontière SG/SC. Dans certains lots de modèles Episkin, le procédé d'extrusion a été retardé et la présence de corps lamellaires a été observé dans les couches supérieures du SC. Malgré le fait que dans tous les modèles testés les phases lamellaires lipidiques caractéristiques aient été trouvées, des différences ont été observées dans leur schéma de distribution. La présence abondante de goutte de lipides dans le SC, sa forte compacité et sa forte épaisseur et l'absence de phase lamellaire lipidique dans certaines régions extracellulaires sont indicatrices de perturbations dans le processus de différenciation terminal des modèles de pénétration d'Episkin. Pour la formation des phases lamellaires la présence de classes lipidiques majeures (cholestérol, céramides et AGL) est nécessaire. L'analyse lipidique a révélé que ces lipides sont synthétisés *in vitro* mais pas dans les mêmes proportions que dans l'épiderme natif. Dans tous les modèles testés, le contenu en AGL était bas et dans les modèles d'EpiDerm, SkinEthic et EpiSkin, le profil de céramides était incomplet. Les céramides AS et AP sont fortement réduites et la céramide AH est inexistante. De plus dans les modèles EpiDerm et EpiSkin, une céramide

additionnelle appelée Cer2a était abondamment présente. Dans tous les modèles testés, la présence uniquement d'une phase lamellaire de longue périodicité, 12nm, a été observée contrairement à l'épiderme natif qui lui possède également la phase à courte périodicité de 6nm. Cette différence n'est pas due à la modification concernant le profil des céramides, car le RE-DED possède exactement le même profil en céramides que l'épiderme natif et ne présente cependant pas la même organisation latérale. La présence d'AGL à courtes chaînes présents de manière plus abondante dans tous les modèles expliquerait cette modification d'organisation lamellaire.

En conséquence, tous les modèles sont des modèles fiables pour l'étude des effets de molécules appliquées de façon topique, bien qu'il y ait des variations au niveau de l'homéostasie du tissu et des propriétés de la fonction barrière à corriger. Ces modèles reproduisent beaucoup de caractéristiques de l'épiderme normal et fournissent donc un véritable moyen d'évaluer l'irritation cutanée *in vitro*.

Ces photos de coupes histologiques montrent la structure du modèle SkinEthic™ RHE (b) comparé à un épiderme humain (a) (Figure 32).



(a)

(b)

Figure 32. Coupe histologique d'un épiderme humain et du modèle SkinEthic™ RHE, d'après <http://www.skinethic.com>

### 3.5. Les tests *in vitro*

Plusieurs tests sur ces modèles de peau sont effectués pour évaluer l'irritation cutanée. Le test de référence est celui de la viabilité cellulaire (OECD 2010).

### 3.5.1. Les tests de viabilité cellulaire

La méthode la plus utilisée pour déterminer la viabilité cellulaire est le test MTT (Kobiela et al. 2013; Tornier, Roquet, and Fraissinette 2010). Il est basé sur l'activité d'une enzyme mitochondriale des cellules capable de réduire le sel de MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide), un sel de tétrazolium de couleur jaune, en cristaux de formazan violet-bleu, insolubles dans l'eau (Mosmann 1983). La classification des irritants se fait en déterminant un seuil de viabilité cellulaire (ex : < 50%, irritant de catégorie 2 selon OECD). Le test d'irriation se déroule de la façon suivante. Le produit à tester est appliqué de façon topique sur l'insert contenant la couche de peau reconstruite avec un minimum de  $70\mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou  $30\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Au moins deux inserts doivent être utilisés pour évaluer un produit avec présence d'un contrôle positif et négatif pour vérifier la viabilité, la fonction barrière et la sensibilité du tissu sont dans les normes. Après incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant un temps défini, les inserts sont placés dans une solution de MTT de concentration appropriée ( $0.3$  ou  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) pendant 3h. puis précipité violet-bleu de formazan est du tissu en utilisant un solvant (ex : isopropanol) et la concentration en formazan est mesurée par densité optique à  $570\text{ nm}$ .

Le test lactate déshydrogénase (LDH) est souvent couplé au test MTT. Ce test utilise le même réactif que le test MTT, cependant il est basé sur l'activité d'une enzyme cytosolique cette fois. Si le réactif, présent dans le milieu extracellulaire, est réduit, cela reflète une altération de la membrane cellulaire, conduisant à une fuite de la LDH du cytoplasme dans le milieu extracellulaire. Il est fortement corrélé au test de MTT (Faller and Bracher 2002; Osborne and Perkins 1994; Arechabala et al. 1999). Les figures 33 et 34 illustrent les tests MTT et LDH. La figure 28 montre des inserts de multicouches de kératinocytes qui ont été traitées pendant 72h avec différents produits, puis ont été en contact avec le MTT pendant 3h et sont dans de l'isopropanol afin d'extraire le formazan. On peut visuellement constater que tous les produits testés n'ont pas la même toxicité comme il y a des puits très foncés où il y a eu une forte activité de l'enzyme mitochondriale est donc une bonne viabilité cellulaire, et les puits très clairs, où peu de formazan a été synthétisé, reflétant une faible activité enzymatique traduisant la mort des kératinocytes.

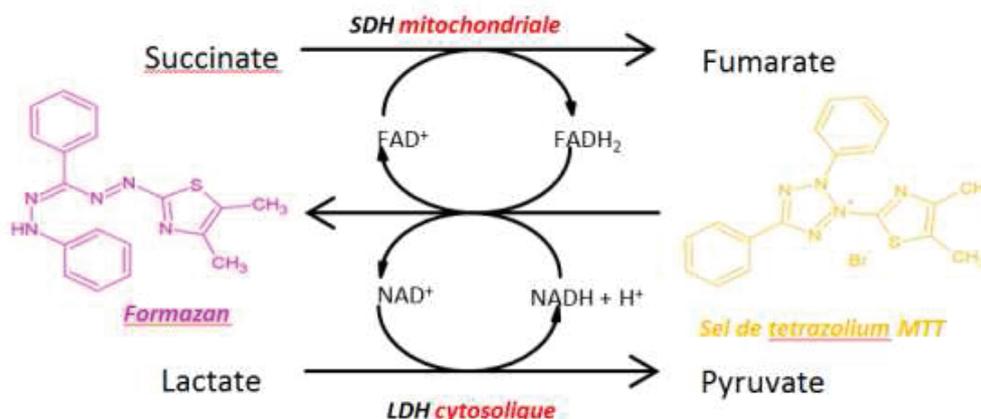


Figure 33. Réaction chimique pour les Tests MTT et LDH

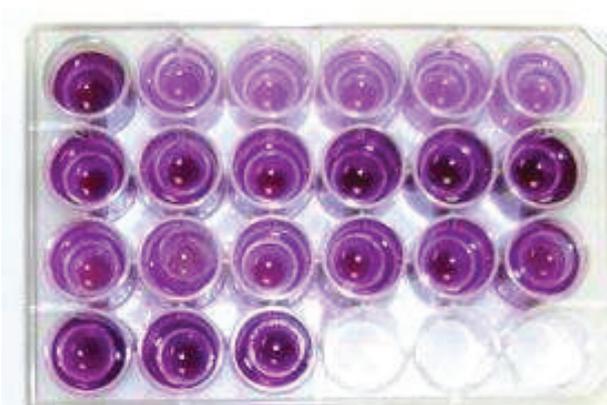


Figure 34. Puits contenant les inserts de multicouches de kératinocytes traitées par différentes émulsions et le réactif MTT

Il existe d'autres tests pour évaluer la toxicité cellulaire comme le test du rouge neutre ou le test d'exclusion au bleu trypan, mais le test du MTT est le plus employé (Gutiérrez-Praena et al. 2011).

L'ECVAM a reconnu le fait que le test MTT seul ne permettait pas de prédire de manière assez précise le pouvoir irritant d'un produit. Ainsi l'addition d'autres marqueurs biologiques est conseillé (Welss, Basketter, and Schröder 2004).

### 3.5.2. Les tests d'inflammation

Le dosage de la libération dans le milieu extracellulaire, de médiateurs pro inflammatoires tels que les cytokines, permet de préciser les tests *in vitro*. La cytokine de référence est l'IL-1 $\alpha$ .

Comme dit précédemment, c'est un médiateur très important dans la réponse inflammatoire. L'épiderme intact ayant un réservoir d'IL1 $\alpha$ , cette molécule est libérée lors d'altération de la membrane cellulaire et représente un facteur d'inflammation primaire. L'IL1 $\alpha$  est le principal élément déclencheur de la réaction inflammatoire. En effet ce médiateur induit l'expression de lui-même mais également d'autres cytokines pro inflammatoires tels qu'IL6, IL8... Ces dernières cytokines sont quant à elles plus des marqueurs d'une inflammation retardée (Dinarello 1998; Sims et al. 1993). D'autres marqueurs peuvent aussi être étudiés, comme le Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) qui a la particularité d'être exprimé suite à une exposition à différents irritants et qui semble être indépendant de la libération d'IL1 $\alpha$  (Corsini et al. 1996). L'IL10 est aussi intéressant du fait qu'il est un suppresseur de la réponse à l'irritation et qu'il limite les dommages immunopathologiques de la peau (Berg et al. 1995). L'acide arachidonique et ses médiateurs (PLA<sub>2</sub>, prostaglandine E<sub>2</sub>) peuvent également être d'intérêt, cependant tous les modèles de peau n'ont pas la même sensibilité concernant ces molécules. Enfin, le calcium est aussi un élément important dans la régulation de l'inflammation (Welss, Basketter, and Schröder 2004).

Les dosages de cytokines peuvent se faire par dosages immuno-enzymométriques (Mullerdecker, Furstenberger, and Marks 1994). Actuellement, des méthodes de cytométrie de flux, permettent de doser à l'aide d'un seul échantillon, plusieurs marqueurs simultanément (Cook et al. 2001).

D'autres méthodes *in vitro* telle que la cornéosurfamétrie, ont été développées pour attester du pouvoir irritant et toxique d'une molécule (Gabard et al. 2001). Cette méthode est basée sur la capacité du stratum corneum à se colorer suite à un traitement par une solution de fuchsine basique et de bleu de toluidine. Cette coloration est mesurée à l'aide d'un chromamètre, appareil qui va donner accès à deux paramètres : la luminance et la chromaticité de l'échantillon. Une relation linéaire entre ces deux paramètres a été établie, montrant que plus la luminance était forte, plus la chromaticité était faible. Il a été montré sur des strippings réalisés à la surface cutanée de zones traitées par différents shampoings, gel douche ou solution de tensioactifs que la teinture du SC par la solution colorée reflétait l'interaction du tensioactif sur le SC. En effet, les tensioactifs présentant les interactions les plus faibles avec le SC étaient responsables des plus grandes valeurs de luminance et des plus petites valeurs de chromaticité, pouvant donc prédire le potentiel irritant du tensioactif (Piérard, Goffin, and Piérard-Franchimont 1994).

### **3.6. Les tests *in vivo***

Des méthodes *in vivo* existent également pour évaluer l'irritation. Parmi elles, des tests d'utilisation courante comme le lavage répété des mains pour la toxicité des tensioactifs, ou des tests sous forme de patch occlusif ou semi-occlusif comme le « soap chamber test ». Le produit à une concentration donnée est laissé en contact sur la peau pendant une période déterminée. L'évaluation de l'irritation se fait après par l'établissement de scores en fonction des œdèmes et érythèmes présents mais également par d'autres mesures telles que la PIE et d'autres méthodes évaluant l'intégration de la fonction barrière (Corazza et al. 2010; Effendy and Maibach 1995; Frosch and Kligman 1979).



## Chapitre III. Les tensioactifs et la peau

### 1. Généralités sur les tensioactifs

La consommation mondiale de tensioactifs, notamment utilisés dans de nombreux produits de soin de la personne ou d'entretien ménager, a représenté, en 2007, 12 millions de tonnes, dont environ 3 millions pour l'Europe, soit 380 kilos de tensioactifs utilisés chaque seconde. Leur marché devrait croître de 2,7% par an entre 2012 et 2017. Les tensioactifs jouent un rôle prépondérant dans de nombreuses applications. Ils sont utilisés en tant que matières premières dans des formulations destinées à des usages ménagers et personnels tels que les détergents pour le linge, la vaisselle, les produits d'hygiène pour le corps. Les tensioactifs sont également utilisés en tant que produits auxiliaires industriels dans, par exemple, la majorité des émulsions cosmétiques, comme agent de stabilisation. Le nombre de molécules actuellement commercialisées dépasse les 5000 mais seulement un petit nombre d'entre elles répond aux critères de tolérance indispensables à une utilisation cosmétique (Martini 2006). En cosmétique, les tensioactifs sont principalement utilisés pour leurs propriétés émulsionnantes et détergentes. La détergence désigne le processus par lequel un agent de surface est capable par adsorption à la surface d'un matériau (peau, cheveux) d'enlever des molécules insolubles ou des petites particules solides et de les mettre en solution ou en dispersion (Mathis 1992). Ceci participe au nettoyage de la peau, mais peut également être une des causes de l'irritation cutanée observée suite à l'utilisation de tensioactifs.

#### 1.1. Définition

Un tensioactif est une molécule qui a deux parties de polarité différente : l'une constituée d'une chaîne hydrocarbonée qui présente un caractère hydrophobe ou lipophile ; l'autre, appelée la tête polaire, présente un caractère hydrophile et contient des hétéroatomes (O, P, S ou N). C'est une molécule dite amphiphile (Figure 35). Elle peut être mono, bi ou tricaténaire suivant le nombre de chaînes alkyles. Il existe également des tensioactifs dits géminés et bolaformes qui eux possèdent deux têtes polaires (Misra et al. 2010).

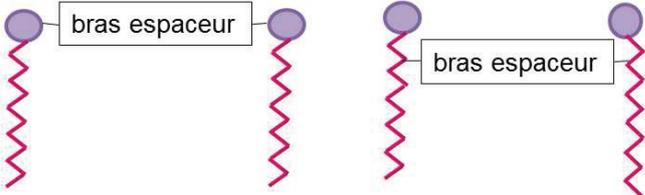
<i>Structure du tensioactif</i>	<i>Nom</i>
	monocaténaire
	bicaténaire
	tricaténaire
	bolaforme simple chaîne
	bolaforme double chaîne
	gémisés

Figure 35. Schéma des différents types de tensioactifs

## 1.2. Classification

Il existe différentes classifications possibles des tensioactifs (Larpent 1995; Schick 1967). Ils peuvent être classés en fonction:

- de la nature de leur tête polaire (non ionique, anionique, cationique ou amphotère)
- de la longueur de la partie lipophile qui permet de classer les tensioactifs en agents mouillants (C8-C10), détergents (C12-C16), émulsionnants ou adoucissants (C18-C22) (Noiret, Benvegny, and Plusquellec 2002).
- de leur origine, naturelle ou synthétique.

### 1.2.1. Les tensioactifs anioniques

Ces molécules possèdent un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en phase aqueuse pour donner des ions tensioactifs chargés négativement auxquels sont associés des cations tels que les métaux alcalins (Na, K) ou les ammoniums quaternaires (NR<sub>4</sub>). Ils possèdent des

propriétés détergentes, mouillantes, moussantes et sont donc présents dans la plupart des produits d'hygiène et de nettoyage. Plus rarement, ils sont utilisés comme émulsionnants.

Parmi les tensioactifs anioniques, on peut compter :

- **les savons** : Ce sont les sels d'acides carboxyliques, résultant de la saponification de triglycérides d'origine végétale (huile de palme, d'olive,...) ou animale (suif). La partie hydrophile est constituée d'un groupement carboxylique saponifié. Ce sont des **produits détergents, mouillants et moussants**. La réaction de saponification conduit à des solutions très alcalines, un pH=10 peut alors être atteint d'où des **réactions d'irritation** qui peuvent apparaître sur certaines peaux fragiles suite au savonnage.
- **les dérivés sulfatés**. Ils sont composés d'une partie hydrophile constituée d'un groupement sulfaté (-O-SO<sub>3</sub>) et d'une chaîne alkyle lipophile, le plus souvent en C12 et généralement saturée (C12:0). Ils présentent les avantages d'être de **bons détergents, de bons moussants et mouillants**. Parmi eux, on peut compter :
  - o Les alkylsulfates : le laurylsulfate de sodium (SLS) ou SDS (dodécylsulfate de sodium)
  - o les alkyléthersulfates, (ex: Sodium Lauryl Ether Sulfate) qui sont **moins irritants que le SDS** tout en ayant les mêmes propriétés. Pour ces tensioactifs, le groupement éther est une chaîne polyoxyde d'éthylène (POE)
- **les dérivés sulfonés** issus de l'industrie de raffinage du pétrole. Leur partie hydrophile est constituée d'un radical sulfoné salifié et leur partie lipophile est une chaîne grasse qui peut être linéaire ou ramifiée, saturée ou insaturée. Toutefois, les **utilisations en cosmétique** comme tensioactifs restent **limitées** bien qu'ils soient de **bons agents dégraissants**. Deux familles de produits sulfonés de synthèse ont été développées plus récemment; il s'agit des sulfosuccinates et des sulfonamides d'acides gras. Les **sulfosuccinates** sont **doux et peu irritants** mais ne peuvent être utilisés que dans une **étroite gamme de pH** (entre 6 et 8) en raison de leur faible stabilité. Les **sulfonamides** (encore dénommés N-acyltaurides) sont de bons tensioactifs à pouvoir **moussant et dispersant des sels de calcium**, donc intéressants à **utiliser en présence d'eaux calcaires**. Ceux-ci sont utilisés comme tensioactifs pour des crèmes opacifiées et pour des shampoings en poudre.

- **les dérivés phosphatés** qui résultent de la condensation d'un alcool gras avec l'acide phosphorique et se présentent sous forme d'alkylphosphates et d'alkyletherphosphates. Ils **ne moussent pas**. Ce sont essentiellement des **émulsionnants et des agents solubilisant dans les microémulsions**.

### 1.2.2. Les tensioactifs cationiques

Ils comportent un groupement ionique chargé positivement en solution aqueuse. Leur partie hydrophile chargée positivement leur permet de s'adsorber très facilement sur des substrats chargés négativement. Ainsi, cette charge positive leur confère notamment des **affinités avec la kératine, protéine qui constitue principalement le cheveu (95%)**. D'autre part, beaucoup d'entre eux possèdent des **propriétés bactéricides**. En effet, ils ont la capacité de détruire (lyser) la membrane des micro-organismes lorsque la chaîne grasse est courte. Parmi les tensioactifs cationiques, les plus utilisés sont les **dérivés d'ammonium quaternaires**.

### 1.2.3. Les tensioactifs amphotères ou zwitterioniques

Les tensioactifs amphotères possèdent deux groupes fonctionnels, l'un anionique et l'autre cationique. Dans la plupart des cas, c'est le pH qui détermine le caractère dominant. Cette **structure dipolaire s'apparente à celle des phospholipides** naturels et conduit à une famille de produits généralement **non irritants et peu agressifs sur le plan biologique**. Ils sont compatibles à la fois avec les tensioactifs anioniques et les tensioactifs cationiques et présentent les propriétés principales de ces deux catégories. Ainsi, ils sont **détergents, mouillants, moussants et légèrement bactéricides**. Les principaux tensioactifs amphotères sont les **dérivés de la bétaine** (alkylbétaine) et **dérivés d'imidazoline** (amphoacétates).

### 1.2.4. Les tensioactifs non ioniques

Ces tensioactifs sont caractérisés par une tête hydrophile non chargée (alcool, éther, ester, amide) contenant des hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène. Les tensioactifs non ioniques sont **émulsionnants, solubilisants et mouillants**. Ils sont principalement utilisés dans la formulation des émulsions. Parmi les tensioactifs non ioniques, on peut compter:

- **les esters** qui ont pour formule générale R-COO-R'. Ils sont très nombreux car peuvent être obtenus à partir de molécules hydroxylées très variées (R'). En revanche, les chaînes grasses (R) sont essentiellement représentées par les chaînes carbonées de C12 à C18, le plus souvent saturées Cx:0 mais aussi insaturées en C18:1 ou C18:2. Ils sont principalement utilisés en temps qu'émulsionnants et peuvent avoir des propriétés de promoteurs d'absorption. Ils sont considérés comme très peu irritants pour la peau.
  - o **Les esters de sucre** : ils sont très nombreux dû à la variabilité de la base hydrophile. Les esters de sorbitan associés ou non au polyoxyde d'éthylène (POE) sont les plus connus et sont appelés communément Polysorbate®. Il existe également les esters de sucrose, glucose, saccharose...(Piccicuto et al. 2001).
  - o **Les esters de PEG**. Ils résultent de la polycondensation d'un acide gras avec plusieurs molécules d'oxyde d'éthylène (POE). Les plus utilisés ont une longueur de chaîne de POE de 8 à 12 motifs. Ce sont des produits plutôt lipophiles utilisés comme **facteur de consistance et stabilisateur d'émulsion**.
  - o **Les esters de polyglycérol** sont des **émulsionnants** employés dans la formulation d'émulsion.
  - o **Les alkylpolyglucosides** bien tolérés par la peau et les muqueuses, ils peuvent être utilisés dans les soins pour cheveux ou pour la peau. Ce sont de bons émulsifiants. La détergence optimale est obtenue avec une longueur de chaîne alkyle à C13 et des groupes glucosidiques à 65% (Piccicuto et al. 2001). Ils sont intéressants puisqu'ils **rendent la peau douce et sont facilement biodégradables**.
- **les éthers** de formule générale R-O-R', ou R représente la chaîne hydrocarbonée lipophile provenant d'un alcool gras ou d'un alkylphenol et R' une chaîne POE dont la longueur varie. Etant non ioniques, ce sont des tensioactifs peu irritants en comparaison aux ioniques cependant, une toxicité supérieure par rapport aux esters a été démontré.

En résumé, les tensioactifs anioniques, qui se présentent sous forme de savons, de dérivés sulfatés, sulfonés ou phosphatés sont de bons détergents, mouillants, moussants, faiblement émulsionnants mais irritants et toxiques. Ainsi, en cosmétique, ils sont plutôt utilisés dans la formulation de produits d'hygiène et de nettoyage (Tableau 9).

Les tensioactifs cationiques, essentiellement représentés par des dérivés d'ammonium quaternaires, des sels d'alkylpyridinium ou des aminoxydes sont anti-moussants, mouillants

mais faiblement détergents, émulsionnants et moussants. Ils sont également toxiques et du fait de leur bonne affinité avec la kératine, ils sont utilisés dans les shampoings, après shampoings... (Tableau 9).

Les tensioactifs amphotères sont souvent des dérivés de la bétaïne ou d'imidazoline. Ils sont essentiellement de bons détergents, mouillants, moussants et grâce à leur faible toxicité et potentiel irritant, ils sont utilisés dans les formulations de produits pour bébés et démaquillants (Tableau 9).

Les tensioactifs non-ioniques, qui sont des esters ou des éthers, sont également de bons détergents, émulsionnants, solubilisants et stabilisateurs de mousse. Ils sont faiblement moussants, mouillants et toxiques. En cosmétique, ils sont utilisés dans le maquillage, démaquillage, soins du corps et du visage (Nardello-Rataj, Tai, 2006 ; Polefka, 1999).

*Tableau 9. Bilan des tensioactifs et leurs applications en fonction de leur nature (d'après Giardi 2011)*

	<b>Anionique</b>	<b>Cationique</b>	<b>Amphotère</b>	<b>Non ionique</b>
<b>Détergent</b>	+	-	+	+
<b>Emulsionnant</b>	-	-		+
<b>Irritant</b>	+	+	-	-
<b>Mouillant</b>	+	+	+	-
<b>Moussant</b>	+	-	+	-
<b>Stabilisateur de mousse</b>				+
<b>Anti-mousse</b>		+		
<b>Solubilisant</b>				+
<b>Applications cosmétiques</b>	produits d'hygiène et de nettoyage	shampoings après-shampooing	produits de toilettes pour bébés, démaquillants	maquillage démaquillage soins corps et visage

### ***1.3. Propriétés physicochimiques des tensioactifs susceptibles de déclencher une DIC***

#### **1.3.1. Physicochimie des interfaces**

##### **La tension superficielle**

Les molécules au sein d'un liquide sont l'objet de forces attractives (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals ou interactions dipôle-dipôle) de la part de toutes leurs voisines, dont la résultante est nulle. Au contraire, à la surface du liquide ou à l'interface d'un liquide non

miscible, elles perdent la moitié des interactions attractives et subissent une force nette dirigée vers le bas (Figure 36).

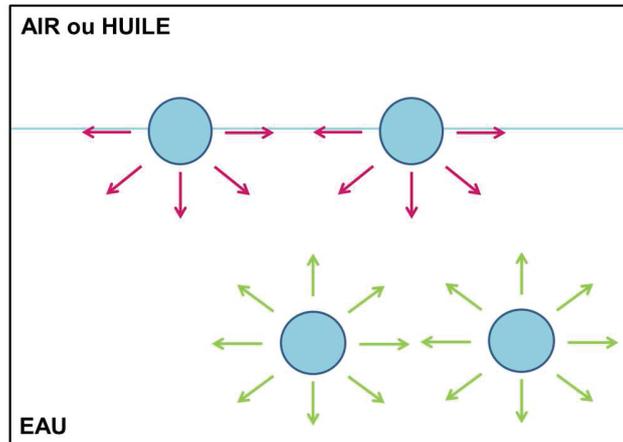


Figure 36. Comportement des molécules d'eau à l'interface (d'après Brochard-Wyart, Gennes, and Quéré 2004)

La molécule d'eau à la surface, est donc dans un état énergétique défavorable. La tension superficielle (en  $\text{mJ.m}^{-2}$  ou en  $\text{mN.m}^{-1}$ ) est l'énergie qu'il faudrait fournir pour augmenter la surface eau/air ou eau/huile d'une unité.

On comprend alors que plus la tension de surface diminue plus il est facile d'étendre l'interface eau/air ou eau/huile.

### Comportement du tensioactif à l'interface

#### **Le phénomène d'adsorption**

La structure particulière des tensioactifs leur confère la propriété de s'orienter et de se concentrer aux interfaces. Ce phénomène se produit aux interfaces liquide/liquide (ex : eau/huile) ou liquide/gazeux (ex : eau/air), les molécules de tensioactifs vont ainsi prendre la place de molécules d'eau et de ce fait abaisser la tension superficielle ou interfaciale selon la loi de Gibbs.

#### **Le phénomène de micellisation**

A partir d'une certaine concentration, l'interface est saturée. Pour des concentrations supérieures, les molécules de tensioactif en excès s'auto-associent en solution sous forme

d'agrégats appelés micelles : les chaînes hydrophobes constituent le cœur de la micelle et les têtes polaires sont au contact de l'eau. Au cœur de ces micelles peuvent être piégées diverses molécules hydrophobes, ou salissures.

La concentration à partir de laquelle un composé tensioactif s'auto-associe sous forme de micelles en solution aqueuse est appelée concentration micellaire critique (CMC). La valeur de la concentration micellaire critique est une caractéristique du tensioactif.

Quelques règles générales peuvent être mentionnées (Larpent 1995).

- Les CMC des tensioactifs non ioniques (de l'ordre de  $10^{-5}$  M) sont inférieures aux CMC des tensioactifs ioniques (de l'ordre de  $10^{-3}$  M).
- Pour une même classe de tensioactifs, la valeur de la CMC diminue lorsque le caractère hydrophobe augmente (augmentation du nombre d'atomes de carbone).
- La valeur de la CMC augmente avec le caractère hydrophile du tensioactif (par exemple, dans le cas de tensioactifs polyéthoxylés, la CMC croît avec le nombre de motifs éthoxy).
- La CMC d'un mélange de tensioactifs est inférieure aux CMC des tensioactifs isolés.

Pour déterminer la CMC d'un tensioactif, on construit l'isotherme de Gibbs qui est la représentation de la tension superficielle à l'équilibre en fonction du logarithme de la concentration en substances tensioactives, on obtient une courbe schématisée comme suit (Figure 37) :

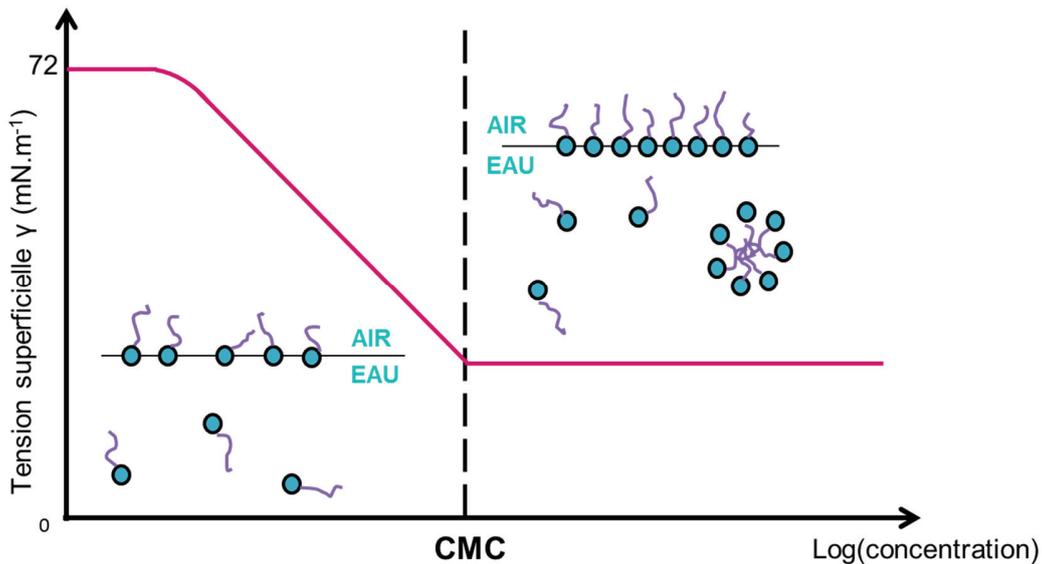


Figure 37. Isotherme de Gibbs

Le premier plateau représente la tension superficielle du solvant (ici de l'eau) et on considère qu'il n'y a quasiment pas de molécules à l'interface.

Dans la partie décroissante de la courbe, les molécules de tensioactifs migrent à l'interface et abaissent progressivement la tension superficielle. La relation de Gibbs permet de relier la variation de tension superficielle  $dy/d\ln C$  et la concentration superficielle de molécules adsorbées  $\Gamma$ .

$$\Gamma_i = -\frac{1}{RT} \left( \frac{d\gamma}{d\ln C_i} \right)$$

*Equation de Gibbs*

Pour  $\log(C) > \text{CMC}$ , on observe un deuxième plateau, et la tension superficielle est constante. L'interface est saturée en tensioactifs, les molécules en excès n'ont d'autre choix que de s'associer entre elles afin de donner des arrangements sphériques, les micelles. La CMC est donc le deuxième point de rupture de la courbe (Domingo et al. 1996).

En plus de la CMC, cette isotherme permet de calculer d'autres paramètres caractéristiques du tensioactif.

En effet en partant de la relation de Gibbs, on a accès à l'aire minimale de la tête polaire  $A_i$  par la relation suivante,  $N_A$  étant le nombre d'Avogadro :

$$A_i = \frac{1}{N_A \Gamma_i}$$

*Equation de l'Aire minimale de la tête polaire*

### 1.3.2. Organisation du tensioactif en solution

Les micelles ne sont pas les seules structures auto-organisées accessibles aux tensioactifs. Parmi les forces qui gouvernent l'auto-association de molécules tensioactives en solution il y a une compétition entre l'attraction hydrophobe des chaînes aliphatiques et les répulsions ioniques et stériques des têtes polaires. Selon Israelachvili et al., la géométrie, ou l'association des molécules en solution, peut être établie en fonction de paramètres géométriques simples qui sont la surface optimale par tête polaire  $a_0$ , la longueur de la chaîne aliphatique,  $l_c$ , et le volume

$v$  de la molécule. Israelachvili et al. ont déterminé un «paramètre de forme» ou paramètre d'agencement critique (PAC) égal à :

$$PAC = \frac{v}{a_0 l_c}$$

*Equation du Paramètre d'agencement critique*

dont la valeur est reliée à la forme du volume occupé par la molécule de tensioactif en solution et conditionne donc le type de structure formée (Israelachvili, Mitchell, and Ninham 1976). (Figure 38)

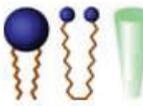
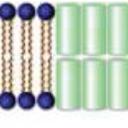
Amphiphile	Paramètre $p = \frac{v}{a_0 l_c}$	Forme géométrique	Organisation	Phase
Tensioactif monocaténaire à large tête polaire	$p < 1/2$			Micelles directes
Tensioactif monocaténaire type non ionique	$p \approx 1/2$			Micelles globulaires Phase hexagonale I
Tensioactif bolaforme, ou bicaténaire à large tête polaire	$1/2 < p < 1$			Phase lamellaire flexible = vésicules
Tensioactif bicaténaire	$p \approx 1$			Phase cubique QII Phase lamellaire
Tensioactif bicaténaire à tête polaire petite	$p > 1$			Micelles inverses Phase hexagonale II

Figure 38. Morphologie des agrégats en fonction de la valeur du PAC d'après (Bordes 2007)

Ainsi, suivant la structure du tensioactif et sa concentration en phase aqueuse, différentes phases organisées peuvent apparaître, de la phase micellaire directe, peu organisée, à la phase cristalline, très organisée. (Figure 39).

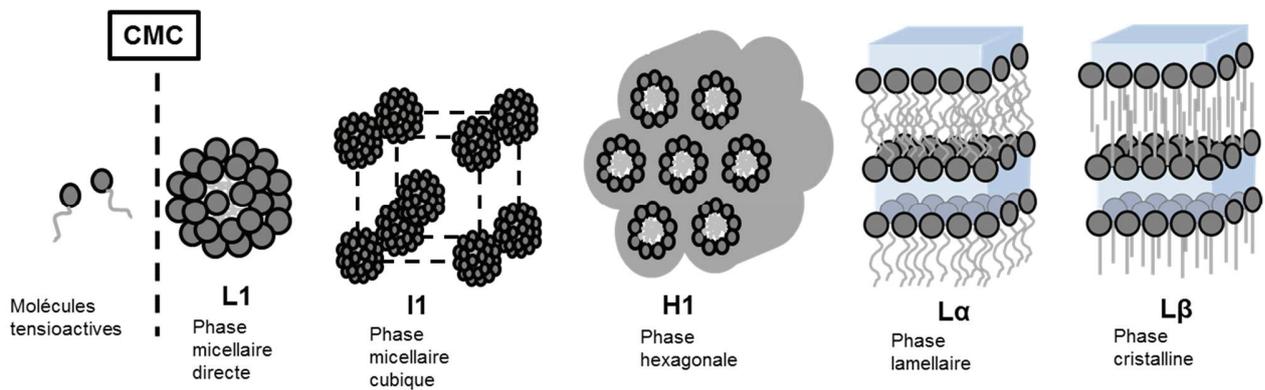


Figure 39. Organisations des tensioactifs en solution

### 1.3.3. Stabilisation des émulsions

Une émulsion est, selon la définition courante, une dispersion d'un liquide en fines gouttelettes dans un autre liquide, les deux liquides étant non miscibles (ex : l'eau et l'huile). C'est un système thermodynamiquement instable. Les tensioactifs, en se plaçant à l'interface entre les deux liquides et en abaissant ainsi la tension interfaciale permettent de stabiliser ce système.

Plusieurs types d'émulsion existent:

- Directe, huile dans eau (H/E)
- Inverse, eau dans l'huile (E/H). (Figure 40)

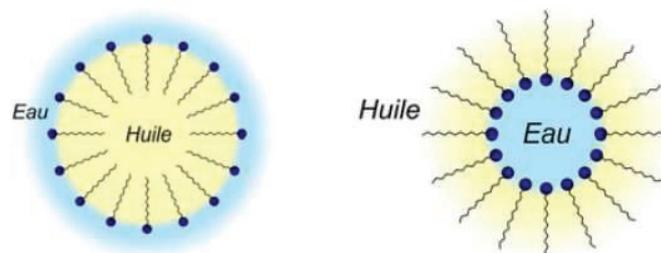


Figure 40. Schéma d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile.

L'obtention d'un type d'émulsion dépend du caractère plus ou moins hydrophile/hydrophobe du tensioactif, lui-même relié à sa structure. Afin de quantifier ce caractère, la notion de balance hydrophile lipophile (HLB) a été introduite par Griffin en 1949 (Griffin 1949).

$$HLB = 20 \frac{\text{Masse moléculaire de la partie hydrophile}}{\text{Masse moléculaire de la molécule}}$$

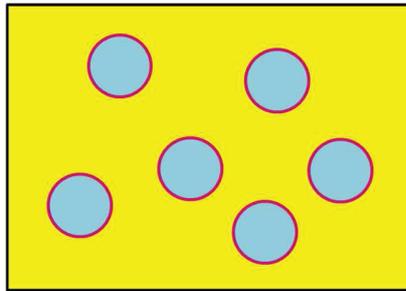
En 1961, Davies et Rideal proposent une formule empirique permettant de calculer le HLB d'une molécule à partir de la nature chimique des groupements constitutifs, plus adaptée aux tensioactifs ioniques (Davies and Rideal 1961).

$$\text{HLB} = 7 + \sum \text{valeurs associées aux groupes hydrophiles} + \sum \text{valeurs associées aux groupes hydrophobes}$$

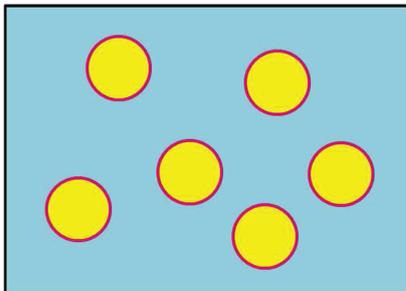
*Equation de Balance hydrophile-lipophile*

En couplant le PAC et le HLB on peut avoir une bonne prédiction du type d'émulsion obtenue:

- HLB < 9 et PAC > 1 : émulsion eau dans huile (E/H)



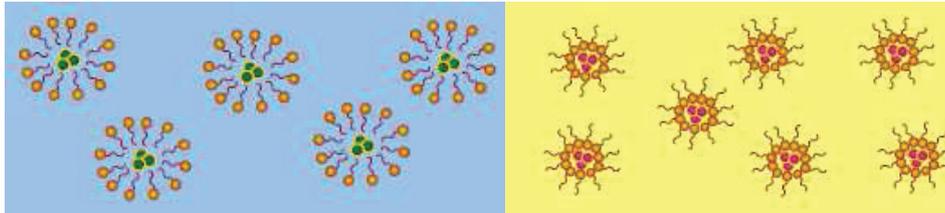
- HLB > 9 et PAC < 1 : émulsion huile dans eau (H/E)



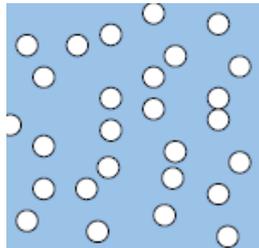
***1.4. Propriétés d'usage des molécules tensioactives, un lien avec leurs interactions avec les composants de la peau***

Grâce à leurs propriétés physicochimiques particulières, les tensioactifs vont avoir plusieurs actions au contact de la peau

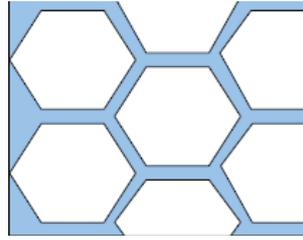
- **Agents solubilisants** : ils augmentent la solubilité apparente dans un solvant de corps peu solubles (ex : formulation de solutions micellaires)
  - o ***Ils sont susceptibles de former des micelles mixtes avec les lipides sébacés et intercornéocytaires***



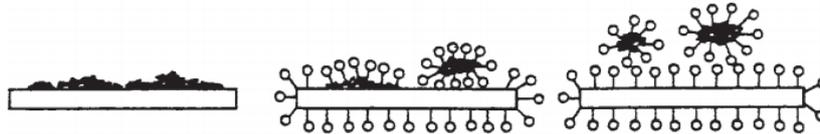
- **Agents mouillants** : ils facilitent l'étalement d'un liquide à la surface d'un corps solide (ex : formulation de suspensions)
  - o ***Ils favorisent l'étalement et modifient les propriétés de surface de la peau.***
- **Agents dispersants** : ils facilitent et maintiennent la dispersion de particules solides dans un liquide (ex : formulation de suspensions)



- **Agents émulsionnants** : ils facilitent la dispersion d'un liquide sous forme de petits globules à l'intérieur d'un autre liquide (ex : formulation d'émulsions).
  - o ***Ils émulsionnent les débris et saleté présents en surface de la peau et favorisent leur élimination par la phase continue de l'émulsion soit l'eau.***
- **Agents moussants** : ils facilitent la dispersion d'un gaz au sein d'un liquide (ex : formulation des mousses)
  - o ***Pour les consommateurs, la mousse est très souvent reliée au pouvoir nettoyant et détergent d'une formule cosmétique.***



- **Agents détergents** La détergence est la combinaison de plusieurs propriétés physico-chimiques. En effet cela comporte le mouillage des débris cellulaires et la solubilisation ou l'émulsification des lipides cutanés ce qui permet un rinçage par l'eau d'où l'utilisation de molécules tensioactives de haut HLB qui orientent les émulsions dans le sens H/E (Mathis 1992).



## 2. L'effet des tensioactifs sur la peau

Les tensioactifs font partie de l'usage quotidien. Ils sont présents dans les produits d'entretien ménager, dans les produits d'hygiène corporelle tels que les savons, gels douche et shampoings mais également dans les crèmes topiques en tout genre. Il y a donc un contact régulier entre la peau et les molécules tensioactives. De par leurs propriétés permettant de solubiliser les corps gras et le nettoyage de surfaces souillées, ces molécules peuvent également interagir avec les composants de la peau. Une des premières preuves évidentes de l'interaction des tensioactifs avec la peau est l'observation des signes cliniques suite à l'exposition prolongée ou chronique à des formules riches en tensioactifs. Ces molécules sont maintenant connues pour engendrer des dermatites irritatives de contact et font l'objet d'un véritable problème de santé publique concernant les maladies professionnelles aux détergents (Crepy 2005; Larson et al. 2006) En effet la dermatite irritante de contact (DIC) est la maladie professionnelle la plus fréquente dans les pays occidentaux (Diepgen 2003). Des études sur la validité de techniques de prévention de cette pathologie ont été effectuées car cette maladie peut rapidement évoluer en maladie chronique et une fois installée, il est difficile de la traiter.

Les techniques de prévention personnelle sont généralement l'utilisation de crèmes protectrices étant de véritables barrières, l'emploi de gants et d'agents hydratants. Des systèmes de scores incluant des mesures quantitatives et qualitatives ont également été établis comme le Hand eczema severity index (Held et al. 2005). L'étude menée par Bauer et al. a montré un effet bénéfique de ces trois types de protection préventives sur l'apparition de DIC, mais les effets n'ont pas été significativement démontrés, une étude incluant un plus grand nombre d'individus doit être mise en place (Figure 41) (Bauer et al. 2010).



Figure 41. Dermatite d'irritation de contact chez une serveuse de restaurant collectif liée au travail en milieu humide, plonge, port de gants trop courts laissant pénétrer les détergents

## 2.1. Signes cliniques

### 2.1.1. Sensations de tiraillement

Cette sensation se manifeste dans les 5 à 10 minutes suivant le contact avec la peau. Elle est liée au stress engendré par une rapide évaporation d'eau à la surface de la peau. Kawai et al. ont observé cette sensation sur des personnes ayant nettoyé leur visage pendant 10 secondes avec une solution à 5% en tensioactif et après avoir rincé 5 fois (Kawai and Imokawa 1984). Cette sensation serait liée aussi bien à l'extraction des lipides cutanés par le tensioactif qu'aux liaisons qu'il peut faire avec les protéines (Imokawa 1997).

### 2.1.2. Rugosité de la peau

Cliniquement, la rugosité de la peau est caractéristique d'une peau desséchée et desquamant. Ce symptôme est le plus souvent observé suite à une exposition répétée aux tensioactifs (Imokawa 1997). La sécheresse cutanée n'est pas forcément liée à l'irritation cutanée, certains solvants, alcools, ou tensioactifs non ioniques engendrent une sécheresse qui n'est pas accompagnée d'irritation (Imokawa and Hattori 1985). Ces effets sur la peau sont souvent plus importants dans une atmosphère sèche et froide, en hiver par exemple. La sécheresse cutanée a été reliée à un manque d'hydratation en surface mais pas à l'augmentation de la PIE, montrant que cette sécheresse n'est pas due forcément à une rupture de la fonction barrière. Cette manifestation clinique a été reliée aux liaisons entre le tensioactif et les protéines de la peau et également à la délipidation cutanée (Rhein and Simion 1991, Ananthapadmanabhan et al. 2004).

### 2.1.3. L'irritation cutanée

L'exposition prolongée aux tensioactifs peut donner lieu à une irritation non immunologique se manifestant par l'apparition d'érythème, d'œdème, accompagnés de démangeaisons et de douleurs. Cette pathologie est appelée la **dermatite irritante de contact (DIC)**. Bien que la DIC soit moins étudiée que la dermatite allergique de contact (DAC), elle représente 60% à 80% des dermatites de contact professionnelles (Belsito 2005). La DIC est le résultat d'une réponse immunitaire cutanée non spécifique qui peut être d'origine physique et plus fréquemment chimique (tensioactif). Cette dermatite peut être définie comme étant causée par un agent externe qui génère une réaction inflammatoire cutanée directe. Selon la nature, la concentration et le temps d'exposition de l'irritant, les caractéristiques cliniques peuvent être différentes (Willis, Stephens, and Wilkinson 1989), d'autant plus que d'un individu à l'autre les réactions varient aussi (Smith et al. 2004). La DIC est difficilement différenciable de la DAC d'un point de vue histologique et clinique. Chez le sujet atteint, la DIC est responsable d'une sensation de brûlure qui reste localisée. Ce sont les mains qui sont le plus souvent affectées car elles sont les plus en contact avec les produits chimiques. Différents types de DIC sont décrites (Krasteva et al. 1999; Basketter et al., 1999)

- La DIC aiguë, au contact d'irritants forts, présente au site de contact un érythème (rougeur) avec des vésicules et un oedème (gonflement). Le cas le plus fréquent est une exposition accidentelle au travail.
- La DIC aiguë retardée est une DIC aiguë mais qui n'apparaît que 8 à 24 heures après l'exposition à certains chimiques (anthraline, epichlorhydrine, oxyde d'éthylène...).

- La réaction irritante correspond au développement d'érythèmes et de gerçures les premiers mois d'exposition répétée de l'individu à un irritant et/ou lors de travaux fréquents dans des conditions humides (coiffeurs, nourrices, femmes de ménage...). La réaction irritante génère des altérations de la peau invisibles chez la majorité des individus, mais elle évolue souvent en DIC cumulative.
- La DIC cumulative est la dermatite de contact la plus fréquente. Elle se développe suite à des contacts répétés avec des irritants à intervalle de temps insuffisants pour la guérison. L'inflammation est alors plus importante, l'érythème et les gerçures sont associés à une peau sèche avec une hyperkératose et une lichenification (éruptions papuleuses avec épaissement de l'épiderme provoquant de violentes démangeaisons).
- La dermatite irritante traumatique se développe lentement après un traumatisme aigu de la peau (brûlure, lacération...). Elle reste peu fréquente mais peut entraîner des gerçures et une lichenification avec une guérison relativement longue.
- La dermatite pustuleuse et acnéiforme se caractérise par la formation de pustules, de papules et de comédons après contact avec des cosmétiques, des huiles, des métaux, des graisses, du goudron...
- La dermatite subjective correspond à une irritation de la peau non visible cliniquement mais avec des sensations de démangeaisons, de piqûres ou de picotements souvent au niveau du visage. La pathophysiologie n'est pas connue.

#### 2.1.4. Perturbation de la barrière cutanée

L'exposition aux tensioactifs et particulièrement le Lauryl sulfate de Sodium induit une augmentation de la PIE, signe d'une altération de la fonction barrière de la peau (R. Tupker, Pinnagoda, and Nater 1989; de Jongh et al. 2006).

Tous ces effets cliniques sont également dépendants de la concentration en tensioactif, de sa nature, du type d'exposition, de la durée de contact et de la variabilité individuelle (Pezron 2006).

Après avoir exposé les effets macroscopiques des tensioactifs sur la peau, concentrons-nous maintenant sur leurs effets au niveau microscopique, pour comprendre les causes de ces manifestations cliniques. Il faut noter que la plupart des études ont été menées sur le Lauryl

sulfate de Sodium, (SLS ou SDS) molécule tensioactive modèle pour l'irritation cutanée (Effendy and Maibach 1995).

## 2.2. *L'interaction des tensioactifs avec les protéines du stratum corneum*

### 2.2.1. Liaisons protéiques, et irritation cutanée

L'interaction entre tensioactifs et protéines est connue depuis une quarantaine d'années en biochimie suite à leur utilisation pour l'extraction des protéines membranaires (Kragh-Hansen, le Maire, and Møller 1998; Jones 1992). La fonctionnalité d'une protéine est dépendante de sa conformation tridimensionnelle apportée par plusieurs types de liaisons, les tensioactifs vont pouvoir agir sur un certain nombre de ces liaisons (Figure 42).

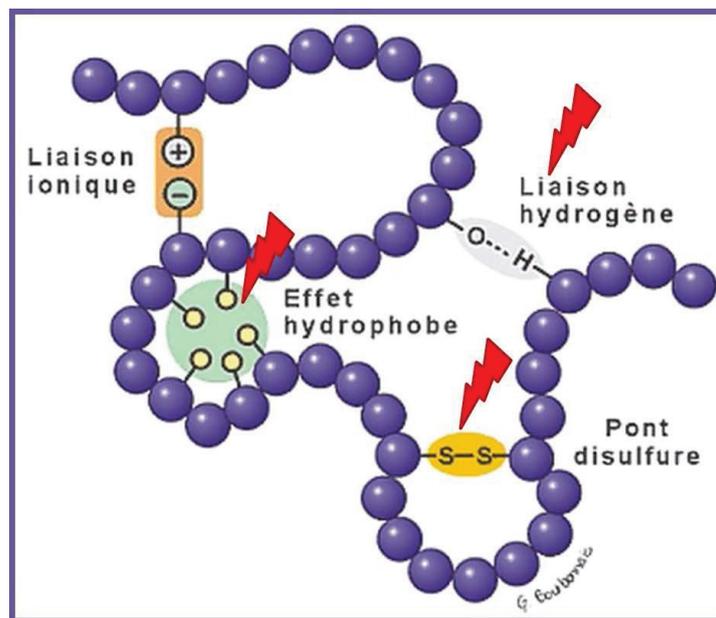


Figure 42. Schéma d'une protéine et sites d'action du tensioactif.

La peau étant composée à 70% de protéines, l'effet des tensioactifs sur les protéines de la peau a été largement étudié. La capacité du tensioactif de se lier aux protéines du SC a été étudiée au travers de tests *in vivo* et *in vitro* sur différents échantillons de kératine (cheveux, cal humain, laine) et sur des modèles protéiques (Breuer 1979).

Le Maire et al. (2000) admettent qu'une fois la protéine solubilisée, les tensioactifs forment une monocouche parallèle légèrement courbée s'apparentant à un tore ellipsoïdal autour des domaines transmembranaires hydrophobes de la protéine. Le mécanisme de solubilisation par les tensioactifs n'est pas totalement élucidé. Deux hypothèses sont exprimées sur les causes de l'inactivation des protéines solubilisées par des tensioactifs :

- L'introduction des tensioactifs dans les régions transmembranaires hydrophobes des protéines.
- La solubilisation de certains co-facteurs stabilisant les protéines dans les micelles de détergents comme les autres protéines ou les lipides voisins (Le Maire, Champeil, and Møller 2000).

Les tensioactifs ont donc un pouvoir solubilisant sur les protéines. L'inactivation des protéines suite à leur déstabilisation peut également conduire à une dénaturation des protéines, résultant d'une perte irréversible de son activité biologique.

### ***La solubilisation***

A.M. Seddon et al. 2004, mettent en évidence que les détergents anioniques comme le SLS sont très efficaces pour solubiliser les protéines membranaires mais entraînent presque toujours une dénaturation de celles-ci. Les tensioactifs non ioniques sont généralement considérés comme doux, sans potentiel irritant et relativement non dénaturants. Ils cassent préférentiellement les liaisons entre les lipides ou entre les lipides et protéines plutôt que les liaisons protéines/protéines (Seddon, Curnow, and Booth 2004).

### ***La dénaturation***

Le tensioactif peut agir sur deux sites de liaisons faibles de la protéine : les liaisons hydrophobes et hydrogènes, mais également sur des sites de liaisons plus fortes.

En 1953, Van Scott et Lyon montrent une augmentation de l'exposition des groupes sulfhydryles de kératines en poudre provenant de cheveux, d'ongle ou de la voûte plantaire, suite à une exposition à différents détergents. Cela montre l'effet de ces détergents qui provoquent la rupture des ponts disulfures essentiels à la structure tridimensionnelle native de la protéine, provoquant ainsi son dépliement ainsi que sa dénaturation, responsables de la perte irréversible de sa fonction biologique. C'est le cas des sulfates d'alkyles et sulfonates, contrairement aux

tensioactifs non ioniques, comme les alcools éthoxylés, qui ne provoquent pas de dépliement (Van Scott and Lyon 1953).

Imokawa et al. ont poursuivi les études sur l'effet des tensioactifs sur les protéines en utilisant le modèle de l'albumine de sérum bovin, montrant une relation entre la dénaturation de cette protéine et le pouvoir du tensioactif à induire une rugosité de la peau (Imokawa, Sumura, and Katsumi 1975). Par des tests *in vivo*, durant lesquels la peau de l'avant-bras avait été traitée par une solution circulante de tensioactifs pendant 10 min, puis exposée à une teinture acide révélant l'adsorption du tensioactif sur la peau, ils ont pu classer les TA par ordre d'adsorption sur la peau. La comparaison entre les tensioactifs anioniques a montré que le TA ayant le plus grand pouvoir d'adsorption était le SDS, suivi du SLES. Ils ont aussi évalué la capacité de différents alkyl sulfates à se fixer sur du cal humain. Ils ont montré une saturation apparente de la fixation des tensioactifs sur le cal à partir de la CMC, suggérant que le monomère de tensioactif était l'entité capable de se fixer aux protéines, et non pas la micelle (Imokawa and Mishima 1979). Cela rejoint les observations de Jones, qui a conclu que le processus de la liaison du tensioactif monomérique aux protéines, commençant bien avant la CMC, est plus favorable que la formation de micelles autour des protéines (Jones 1992).

A part quelques exceptions, seuls les tensioactifs chargés conduisent à une dénaturation des protéines. Le processus de dénaturation peut se décomposer en plusieurs étapes (Figure 43) :

- Phase 0: A faible concentration en tensioactifs, ceux-ci se lient aux protéines sur des sites spécifiques *via* des interactions électrostatiques sans modifications de conformation de la protéine; pour les tensioactifs anioniques sur les chaînes latérales cationiques (Lysine, Arginine, Histidine) et pour les tensioactifs cationiques sur les chaînes latérales anioniques (Acide aspartique, Acide glutamique).
- Phase 1: S'il y a augmentation de la concentration en TA, une fois que la couche monomoléculaire est attachée à la protéine, de nouvelles molécules peuvent être attirées par des interactions hydrophobes pour former une seconde couche, il y aura soit des interactions hydrophobes tensioactif/tensioactif soit protéine/tensioactifs avec les domaines hydrophobes présents à la surface de la protéine. Ceci a pour effet de déployer la protéine.
- Phase 2: Lorsque les protéines sont déployées, toutes les molécules de tensioactifs forment des structures micellaires sur les sites hydrophobes de la protéine, ces agrégats

protéines/tensioactifs sont assimilés à des colliers de perles. Ceci peut se faire à des concentrations en dessous de la CMC.

- Au-dessus de la CMC, les micelles présentes dans le milieu vont se lier entièrement aux protéines conduisant aux mêmes structures que pour la phase 2.

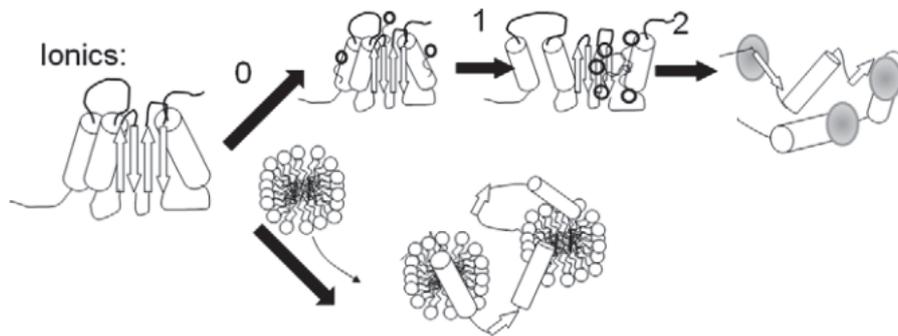


Figure 43. Mécanisme d'action des tensioactifs ioniques sur le dépliement de la structure protéique (d'après Otzen 2011).

Il semblerait que l'irritation cutanée provoquée par un tensioactif soit corrélée avec le potentiel dénaturant du tensioactif. Kotani et al, ont étudié l'effet d'une série d'alkyl sulfates de sodium sur la peau, *via* des expériences *in vitro*. Ils ont conclu que bien que le tensioactif en C18 ait causé des lésions cellulaires, les composés en C10-C16 causaient une destruction de la membrane cellulaire et une dénaturation de protéines plus sévères. Par ailleurs, leurs effets sur la peau étaient beaucoup plus sévères comparés au composé en C18 en raison de leur forte action hémolytique et de la dénaturation protéique (Kotani, Masamoto, and Watanabe 1994). Pezron et al en 1996 puis Moore et al. en 2003, ont utilisé le test de la zéine, basé sur la capacité des tensioactifs à solubiliser cette protéine végétale, insoluble dans l'eau à l'origine. Une corrélation a été établie entre cette capacité de solubilisation et l'altération épidermique dû à ces tensioactifs (Pezron, Galet, and Clausse 1996; Moore, Puvvada, and Blankschtein 2003b). Le problème de ce test est que la structure chimique de la zéine diffère de celle de la kératine (Walters et al. 2012). En 2006, Özdemir et Sezgin ont étudié l'interaction entre les kératines et les tensioactifs comme indicateur de l'irritation cutanée. Les interactions tensioactif/kératine ont été évaluées par la mesure de l'abaissement de la tension de surface de la solution de tensioactif lors de l'ajout de kératine rendant compte de la formation de complexes tensioactif/kératine. Ils ont montré que les interactions entre les rhamnolipides (biotensioactif produit par *Pseudomonas aeruginosa*, de plus en plus étudié pour sa biocompatibilité) étaient

moins fortes que celles entre le SDS (témoin positif pour la dénaturation protéique) et les kératines (Özdemir and Sezgin 2006).

Comme la dénaturation des protéines a été fortement reliée à la toxicité du tensioactif sur la peau (Wolf and Parish 2012), ceci explique la classification des tensioactifs en fonction de leur potentiel irritant retrouvé dans la littérature, à savoir anionique/cationique > zwitterionique > non ionique.

Par ailleurs, comme l'entité monomérique du tensioactif semble être la principale responsable de la dénaturation protéique, les tensioactifs d'une même classe ayant une CMC plus faible sont classés comme moins irritants. Cela a permis d'établir une première liaison entre la structure du TA et sa toxicité. L'augmentation du volume de la tête polaire diminuerait la toxicité du TA en raison d'une CMC plus faible à chaîne alkyle équivalente, des mélanges de TA ayant une CMC plus faible que chaque TA seul seraient également moins toxiques (Faucher and Goddard 1978; Pierard, Goffin, and Pierardfranchimont 1994; Ananthapadmanabhan et al. 1996). Il faut tout de même rester prudent sur cette hypothèse car des expériences ont montré que la réactivité de la peau augmentait lors de l'augmentation de la concentration en TA même au-delà de la CMC (Rhein et al. 1990; Wilhelm et al. 1993; Faucher and Goddard 1978). Ces études réalisées *in vitro* et *in vivo* n'ont utilisé que le SDS comme modèle de TA, et les travaux de Moore ont apporté une explication potentielle à cette observation montrant que des petites micelles de SDS pouvaient pénétrer dans le SC *via* les pores aqueux (Moore, Puvvada, and Blankschtein 2003a).

Les tensioactifs ioniques, de par leurs charges et leur capacité à dénaturer les protéines sont reconnus comme les plus toxiques. Cependant, les tensioactifs non ioniques ne sont pas totalement inoffensifs. Otzen et al. en 2009, ont montré que les 4 classes de tensioactifs étaient capables de dénaturer l' $\alpha$ -lactalbumine. Les TA non chargés ne peuvent se lier aux protéines que par des liaisons hydrophobes faibles. Le déploiement de la protéine se fait de manière beaucoup plus lente dans le cadre de ces tensioactifs par rapport à ceux chargés. Aucune dénaturation n'est observée à une concentration en dessous de la CMC. Les monomères seuls, ne dénaturent pas la protéine, mais coopèrent avec les micelles dans le processus de dénaturation (Otzen, Sehgal, and Westh 2009). (Figure 44)

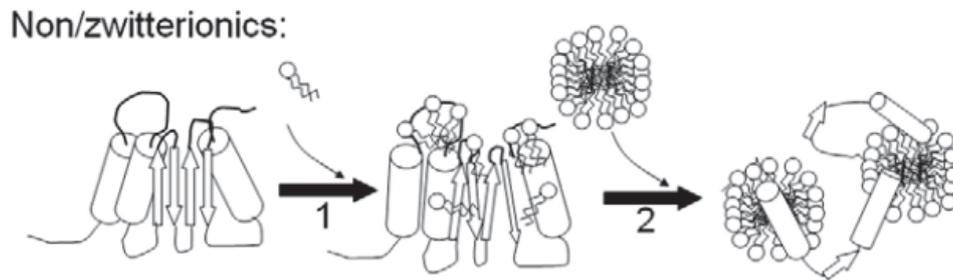


Figure 44. Mécanisme d'action des tensioactifs non ioniques sur le dépliement de la structure protéique (d'après Otzen 2011).

Hofland and al. (1991) ont étudié l'influence de la longueur de la chaîne alkyle et de la liaison entre la chaîne et la tête polaire de tensioactifs non ioniques sur la prolifération des kératinocytes. Ils ont utilisé des éthers de polyoxyéthylène de différentes longueurs de chaîne et n'ont observé qu'un effet mineur de la longueur de la chaîne alkyle sur la prolifération des kératinocytes. En revanche la comparaison entre l'oleth-5 et le PEG 5-oleate montra une forte influence de la nature de la liaison entre la chaîne alkyle et la tête polaire. La concentration de tensioactifs avec liaison éther inhibant la prolifération cellulaire de 50% était 10 fois plus faible que celle des tensioactifs avec liaison ester (Hofland et al. 1991).

Ces dernières expériences montrent que les tensioactifs non ioniques ne sont pas si inoffensifs sur les protéines du SC.

### 2.2.2. Liaisons protéiques, gonflement de la membrane et hydratation cutanée

La dénaturation des protéines suscite des modifications conformationnelles pouvant être impliquées dans le gonflement macroscopique du stratum corneum observé par Rhein et al. sur du SC humain isolé et par Puttermann et al. sur du SC de cochon d'Inde (Rhein et al. 1986; Putterman et al.1977). Ce gonflement serait le reflet du phénomène d'hyperhydratation du SC observé après traitement par des tensioactifs anioniques, et résulterait de la destruction des structures secondaires et tertiaires des kératines exposant de nouveaux sites de liaison à l'eau susceptibles d'entraîner une augmentation de l'hydratation membranaire (Wilhelm et al. 1993).

Mizushima et al. proposent un mécanisme d'hyperhydratation du SC résultant d'une perturbation et d'une altération continue des structures secondaires et tertiaires des protéines de kératine par

les tensioactifs. Les fibres de kératines coopèrent avec le NMF dans les liaisons avec l'eau. L'action dénaturante est responsable de l'exposition de nouveaux sites de liaison de des protéines à l'eau et ainsi du gonflement des membranes du SC. Après l'évaporation de l'excès d'eau, la kératine dénaturée voit ses capacités de fixation de l'eau réduites et sa capacité à fonctionner comme un obstacle à la PIE diminuée. Ceci conduit à la sécheresse cutanée observée suite à un traitement par des tensioactifs (Mizushima et al. 2000). Berardesca et al. démontrent que des applications répétées de SLS réduisent significativement la capacité de liaison d'eau aux kératines du SC *in vivo* (Berardesca and Maibach 1990).

Le dessèchement de la peau s'explique aussi par le fait que les tensioactifs conduisent à une diminution du taux de NMF dans le stratum corneum (Prottey and Ferguson 1975; Rawlings and Matts 2005).

Bien que l'interaction avec les protéines soit souvent décrite comme la cause du pouvoir irritant et desséchant du tensioactif, certaines études mettent en avant l'importance de l'interaction avec les lipides de la matrice. Une étude récente s'intéressant à l'effet du SDS sur le SC par spectroscopie infrarouge, ne montre aucun changement dans les régions spectrales de l'amide I et de l'amide II, communément utilisées pour contrôler la structure secondaire de la protéine ; contrairement aux régions montrant l'organisation lipidique qui elles sont modifiées. Ils expliquent la différence de résultats obtenus concernant l'effet du SDS sur les protéines, en soulignant le fait que la kératine présente dans l'enveloppe cornée est plus difficile d'accès comparativement aux solutions de protéines (zéine) qui sont le plus souvent utilisées pour les tests *in vitro* de toxicité cutanée en évaluant la solubilisation ou dénaturation protéique (Walters et al. 2012).

### ***2.3. L'interaction des tensioactifs avec les lipides du stratum corneum***

Une des propriétés des TA est la capacité à éliminer les corps gras d'une surface solide, aussi appelée détergence. C'est pourquoi l'observation des signes cliniques causés par l'exposition aux TA de la peau a d'abord été reliée à la possible extraction des lipides du SC (Imokawa et al. 1989; Wolf and Parish 2012). Cependant, plusieurs études ont montré que les tensioactifs n'avaient qu'un très faible pouvoir extracteur, pour des concentrations supérieures à la CMC. Froebe et al. ont étudié l'hypothèse de l'extraction lipidique par les TA *in vitro* sur du SC humain isolé. Ils ont constaté une extraction lipidique pour des concentrations supérieures à la CMC

uniquement, et limitée à 7% pour les alkyl sulfonates linéaires et 4% pour le SLS. L'extraction des TG ou CER n'était pas significative mais une diminution du cholestérol a été observée après plusieurs expositions de courtes périodes à une solution de SLS à 2% (Froebe et al. 1990). Fulmer et Kramer, ont fait une étude *in vivo* avec des expositions répétées à des solutions aqueuses à 4% de SLS. Ils ont constaté les symptômes cliniques de sécheresse et de rugosité de la peau sans changements significatifs de la quantité de lipides présents dans le SC. Des différences dans la composition des céramides ont été observées, la quantité de cholestérol total est restée inchangée mais une quantité plus importante de cholestérol et plus faible de cholestérol estérifié a été observée, le ratio libre/estérifié passant de 2,4 à 3,6. La quantité d'AGL était un peu plus faible (19,7 ng d'AGL par µg de protéines par rapport à 25,3) pour les peaux traitées au SLS, avec une diminution des AGL à longues chaînes (C22-C28) au profit d'AGL à courtes chaînes (Fulmer and Kramer 1986). Rawling et al. ont observé une diminution progressive du taux de céramides et une augmentation du cholestérol en lien avec la sévérité de la xérose dans une xérose hivernale induite par le savon (Rawlings et al. 1994). Ces changements de composition ont été expliqués par Fartash et al. qui ont montré que le SDS induisait une altération directe des corps lamellaires du stratum granulosum, perturbant le processus de mise en place de bicouches de lipides provenant des corps lamellaires dans l'espace intercellulaire et indirectement, induisant un problème de différenciation au sein de l'épiderme viable (Fartash 1997). Imokawa et al. ont quant à eux, reporté une diminution des céramides avec une faible diminution des TG et du cholestérol (Imokawa et al. 1989). Lévêque et al. ont observé une augmentation de la proportion en céramides dans le SC après 24h d'immersion dans une solution à 1% de SLS, ils ont également décrit une diminution de la proportion en cholestérol alors que les TG restaient inchangés (Lévêque et al. 1993). Les variations concernant les conclusions sur l'extraction lipidique par les tensioactifs peut s'expliquer par la variabilité des méthodes d'expositions, des processus d'extraction et des techniques d'analyse ceci s'ajoutant à la variabilité individuelle. De plus, des travaux sur des modèles de liposomes ont également montré qu'à faible concentration en tensioactifs, les membranes perdent leur fonction barrière (Kalmanzon et al. 1992) alors qu'à des concentrations supérieures à la CMC, une lyse cellulaire apparaît (Partearroyo et al. 1990). Pour confirmer le fait que l'extraction lipidique n'est pas ce qui explique l'effet perturbateur des tensioactifs sur la barrière, Maza et al. ont montré que la première étape d'altération des lipides du SC était l'intercalation du tensioactif dans la bicouche plus que l'extraction lipidique (Maza et al. 1997).

Cependant, Ananthapadmanabhan et al. suggèrent que la faible quantité d'AGL extraits par le TA suffit à perturber la cohésion entre les cornéocytes, provoquant des liaisons plus fortes et

moins souples, entraînant des cassures et des fissures dans le SC. Ils appuient leur hypothèse en montrant que l'ajout d'AGL dans les formules détergentes diminuent leur toxicité (Ananthapadmanabhan, Mukherjee, and Chandar 2013).

Les lipides intercornéocytaires sont un élément majeur de la barrière cutanée. Bien qu'ils n'extraient pas de façon significative et certaine les lipides du SC, les tensioactifs sont connus pour augmenter la PIE, signe d'une perturbation de la fonction barrière (Wickett and Visscher 2006). C'est pourquoi l'effet des tensioactifs sur les lipides cutanés a été largement étudié au travers de modèles de liposomes. Kragh-Hansen et al. ont montré que le tensioactif pouvait avoir deux modes d'actions sur les lipides. Le tensioactif sous forme monomérique peut s'insérer dans la bicouche lipidique, il peut également y avoir extraction lipidique par solubilisation micellaire (Kragh-Hansen, le Maire, and Møller 1998).

Grâce à la diffraction des rayons X aux petits angles, Friberg et al. ont observé que les tensioactifs avaient un effet sur la structure des lipides du SC résultant d'une fluidification de la matrice, les tensioactifs anioniques ayant le plus d'effet, suivi des cationiques. Les TA non ioniques semblaient au contraire ne pas avoir d'effets (Friberg et al. 1987). Ces observations ont été confirmées pour le SLS par plusieurs études (Ribaud et al. 1994; Ananthapadmanabhan et al. 2004; Som, Bhatia, and Yasir 2012). Plus récemment, Saad et al. ont montré grâce à la spectroscopie infrarouge que le SDS, ayant pénétré dans le SC est observé dans un état plus ordonné au sein du SC que dans la solution, indiquant que le SDS interagit avec les lipides ordonnés du SC. Les résultats révèlent que le SDS réduit la proportion de phase orthorhombique et augmente celle de la phase hexagonale aux températures physiologiques (Saad et al. 2012). De plus Moore et al. avaient auparavant démontré la participation de la forme micellaire du SDS dans la pénétration de ce tensioactif dans l'épiderme suite à des expériences utilisant du SDS marqué au carbone 14. Ces résultats apportent aussi la preuve que les monomères ne sont pas les seuls à interagir avec la peau (Moore, Puvvada, and Blankschtein 2003a).

La déstabilisation de la barrière lipidique par les tensioactifs ayant été montrée, le rôle de ces agents comme promoteurs d'absorption a été largement étudié (Williams and Barry 2012; Lane 2013).

L'effet de tensioactifs non ioniques sur la fonction barrière a été étudié suite à l'observation de leur capacité à promouvoir la pénétration cutanée de certaines molécules (López et al. 2000; Walters, Bialik, and Brain 1993; Park et al. 2000; Sarpotdar and Zatz 1986; Bialik et al. 1993).

Ainsi, Nokhodchi et al. ont rapporté deux actions possibles du polysorbate 80, sa pénétration dans les régions intercellulaires, augmentant la fluidité des lipides, cette pénétration pouvant être suivie d'une liaison avec des filaments de kératine, perturbant les cornéocytes (Nokhodchi et al. 2003).

La structure du TA comme la longueur de la chaîne, le degré et la position d'insaturations et la taille de la tête polaire peut influencer la capacité du TA à promouvoir l'absorption de substances dans la peau. Il est connu que les TA ayant des chaînes alkyl linéaires en C12 ont un maximum d'effets sur la perméabilité de la barrière cutanée. Cette observation est faite pour les tensioactifs ioniques et non ioniques, concernant la pénétration cutanée ou l'irritation cutanée (Pezron 2006). Cela peut s'expliquer par le fait que la chaîne en C12 a une solubilité intermédiaire entre l'eau et l'huile et est capable de pénétrer dans la bicouche lipidique (Ashton, Hadgraft, and Walters 1985; Park et al. 2000). Parmi les éthers polyoxyéthylénés, la chaîne lauryle en C12 est la plus efficace concernant la pénétration de la lidocaïne, suivi de la chaîne oléique (C18 :1) (Park et al. 2000). Les analogues stéarique avec une chaîne en C18 saturée se sont montrés inefficaces en tant que promoteurs d'absorption (Ayala-Bravo et al. 2003). Les sucrose esters ou esters de saccharose ont aussi été reconnus comme promoteurs d'absorption, là aussi, c'est le sucrose laurate qui semble être le plus efficace (Ganem-Quintanar et al. 1998; Ayala-Bravo et al. 2003). Ces conclusions restent cependant assez controversées car très études dépendantes, suivant la molécule étudiée.

#### ***2.4. Les tensioactifs et l'épiderme viable : lien avec l'inflammation***

Les tensioactifs sont capables de perturber la fonction barrière de la peau et de pénétrer plus profondément dans l'épiderme. Ils vont pouvoir interagir avec les kératinocytes, induisant plusieurs anomalies. Ils peuvent agir sur le processus de kératinisation, induisant une hyperprolifération des kératinocytes et une différenciation partielle des kératinocytes en cornéocytes, qui peuvent conserver leur noyau. Ce phénomène est également appelé parakératose (Willis, Stephens, and Wilkinson 1992; Moore, Puvvada, and Blankschtein 2003c; Varani et al. 1991; Wilhelm, Saunders, and Maibach 1990).

Willis et al. ont suggéré le fait que les molécules de tensioactifs pouvaient agir sur les membranes cellulaires, et être responsables de la libération de cytokines provoquant la prolifération cellulaire (Willis, Stephens, and Wilkinson 1992). En effet l'interaction des tensioactifs sur les kératinocytes est connue pour produire des médiateurs de l'inflammation, les

cytokines. L'IL-1 $\alpha$  est aussi libérée naturellement suite à une perturbation de la fonction barrière, faisant partie du processus de protection visant à stimuler la réparation de la barrière. Pour une peau irritée par les tensioactifs, ce phénomène est combiné à une production exacerbée en cytokines IL1 $\beta$ , entraînant l'hyperprolifération (Corsini and Galli 1998; Gibbs et al. 2002; Gatto et al. 1992). Cette augmentation rapide du taux de cornéification, ne va pas laisser le temps au processus normal de l'élaboration de l'enveloppe cornée de se faire, induisant la formation de cellules avec des enveloppes cornées dites fragiles. Ces cellules perdent plus facilement leur NMF et n'ont pas une bonne fonction barrière (Rawlings et al. 1994; Harding et al. 2003; Fulmer and Kramer 1986).

### ***2.5. Les tensioactifs comme protecteurs de la fonction barrière et comme promoteurs d'hydratation, des exceptions intéressantes***

Certains tensioactifs non ioniques, déjà connus comme les moins irritants, se présentent comme des exceptions vis-à-vis de leur effet sur la fonction barrière. En effet Barany et al. ont étudié l'impact de tensioactifs non ioniques sur des peaux saines et lésées par du SLS. Certains émulsionnants qui augmentent la PIE sur peau saine ont le pouvoir de la diminuer sur peau lésée. Le mécanisme sous-jacent n'est cependant pas bien identifié (Bárány, Lindberg, and Lodén 2000).

Certaines publications mettent plutôt l'accent sur l'importance de l'agencement des tensioactifs concernant le pouvoir hydratant des émulsions, et notamment l'agencement lamellaire dont la structure est proche de celle des lipides du SC comme dans le cas des liposomes (Schreier and Bouwstra 1994; Elsayed et al. 2007; Iwai, Fukasawa, and Suzuki 1998).

Il semble aussi que certaines catégories de tensioactifs comme les éthers de glucose, les esters de saccharose ou encore les tensioactifs fabriqués avec des lipides polaires soient capables de conférer un pouvoir hydratant à la peau et sont étudiés dans la littérature (Platon 1997; Lefur and Arnaud 2004; Guilbot 2006; Savic et al. 2011).

## Conclusion

L'investigation de l'effet des tensioactifs sur la peau fait l'objet de nombreuses études et certaines conclusions ont été mises en avant. La toxicité cutanée d'un tensioactif apparaît comme étant fortement liée à son interaction avec les protéines de la peau, les kératines. Ceci explique pourquoi les tensioactifs chargés (cationiques et anioniques) sont considérés comme les plus irritants, leurs charges leur permettant une interaction plus facile avec les protéines qui possèdent également des sites chargés. De plus la forme monomérique du tensioactif semble être l'entité responsable de la toxicité cutanée, s'insérant plus facilement dans la matrice lipidique et pouvant alors interagir avec les composants du SC et de l'épiderme viable. Ainsi, la CMC du tensioactif est considérée comme un paramètre important expliquant la toxicité cutanée. La faculté du tensioactif à pénétrer dans le SC est importante dans l'explication de son pouvoir irritant, ainsi, les tensioactifs avec un rapport longueur de chaîne alkyl/volume de la tête polaire idéal pour l'insertion dans la matrice lipidique sont considérés comme étant les plus toxiques. Parmi les TA non ioniques, les chaînes en C10-C16 et particulièrement en C12 sont responsables d'un effet marqué sur la barrière cutanée et donc d'une plus forte toxicité. Ces différentes conclusions restent cependant discutées régulièrement suivant la méthode d'évaluation choisie. En effet, les résultats dépendent dans un premier temps de la sélection des tensioactifs, les TA ioniques étant le plus souvent étudiés et comparés à un ou deux TA non ioniques. De plus, la cible étudiée diffère suivant les études. Certains travaux s'intéressent à la fonction barrière, qui peut s'évaluer de plusieurs manières. Des méthodes *in vivo* avec la mesure de la PIE ou *in vitro/ex vivo* avec l'observation de l'organisation de la matrice lipidique ou la pénétration de molécules sont quelques exemples de méthodes d'évaluation de la fonction barrière. D'autres travaux se focalisent sur l'irritation cutanée. Celle-ci peut également être évaluée via différentes méthodes. Des méthodes *in vivo*, avec l'observation d'érythème et de rugosité, ou *in vitro* avec des modèles de peau reconstruites par la mesure de viabilité cellulaire et d'inflammation sont quelques exemples possibles. Les stratégies d'études sont donc très diverses concernant la caractérisation de l'effet du tensioactif (fonction barrière et/ou irritation cutanée), les paramètres choisis pour expliquer l'effet observé, le modèle d'étude choisi et les conditions d'application. Ces variabilités au niveau de l'évaluation de l'effet du tensioactif sur la peau expliquent que les résultats de travaux restent relatifs et peuvent aisément être comparés au sein d'une étude, mais cela reste plus compliqué de comparer les conclusions entre les différents auteurs. En raison des études qui sont dépendantes de multiples paramètres. La

nature chimique du tensioactif, la variabilité interindividuelle, la fiabilité des modèles d'études et des techniques employées sont autant de paramètres possibles expliquant qu'aucune certitude scientifique n'ait encore été établie sur l'impact de la physicochimie des tensioactifs sur la peau.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**



L'objectif de cette thèse était de relier les paramètres physicochimiques des tensioactifs à leurs effets sur la toxicité cutanée et la fonction barrière de la peau. Pour cela une sélection de différentes molécules tensioactives a été réalisée.

Les tensioactifs sélectionnés ont ensuite fait l'objet de nombreuses études physicochimiques afin de les caractériser au mieux. La description de ces tensioactifs et les résultats des études physicochimiques associées fera l'objet d'une première partie.

Puis un lien entre la physicochimie et la toxicité cutanée a été étudié grâce à des techniques d'évaluation de la toxicité *in vitro* et sera présenté en deuxième partie.

Parmi les TA sélectionnés, certains ont été utilisés pour approfondir l'étude et évaluer leur impact sur la fonction barrière de la peau à travers trois méthodes expérimentales, la spectroscopie infrarouge avec un dispositif ATR, les mesures d'énergie de surface et de polarité et le dosage par HPLC-ELSD des lipides extraits. Cette étude fait l'objet d'une troisième partie.

Par la suite, nous avons tenté de relier les effets des TA sur la fonction barrière et leur toxicité cutanée, cette étude sera présentée en quatrième partie

Enfin une étude d'évaluation de l'influence de la physicochimie du TA sur son pouvoir hydratant ou desséchant a été menée via des mesures de cornéométrie, pour des raisons de confidentialité ces résultats ne seront pas.



# Chapitre I. Etudes physicochimiques des tensioactifs

## 1. Sélection des tensioactifs pour l'étude

Plus de 5000 molécules tensioactives existent sur le marché. Dans le cadre de ce projet de recherche, une sélection basée sur les critères suivant a été établie:

- La variabilité des classes de TA (anionique, cationique, non ionique)
- La variabilité des structures chimiques au sein d'une même classe (taille et nature de la tête polaire, longueur de chaîne alkyl, présence ou non d'insaturation, nature de la liaison chimique entre la partie polaire et la partie apolaire)
- L'utilisation de ces TA (recherche académique, formulation industrielle)
- L'utilisation des TA pour la formulation d'émulsions directes (Huile/Eau)

38 tensioactifs différents dont deux mélanges sont ressortis de cette phase de sélection, ils ont été étudiés tout au long de cette thèse.

### 1.1. Les tensioactifs anioniques

Différentes longueurs de chaînes alkyl et différentes nature de tête polaires sont présents :

- **C12** : Sodium lauryl **sulfate** **TEXAPON K12P**: tensioactif de référence dans la littérature pour son potentiel irritant.
- **C18** : Stearic acid **LIPO STEARIC ACID** : tensioactif et agent de texture très utilisé en cosmétique (crème au stéarate), fait partie des bases savons
- **C16-C18** : Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 **Phosphate** (and) Dicapryl Phosphate **CRODAFOS™ CS20A**: tensioactif à base phosphate, utilisé en cosmétique pour les émulsions fluides riches en pigments. Il s'agit d'un mélange de molécules tensioactives et d'alcool gras)
- **C18** : Sodium stearoyl **lactylate** **DERMOFEEL SL**: tensioactif estérifié à base lactique, utilisé également en alimentaire
- **C18** : Sodium stearoyl **glutamate** **EUMULGIN SG**: tensioactif faisant partie des amino acide alkyl amide

## 1.2. Les tensioactifs cationiques

Les tensioactifs cationiques les plus répandus et les plus utilisés en cosmétique sont les ammoniums quaternaires. Trois types ont été sélectionnés différant par la longueur de la chaîne alkyl.

- **C22+C18+C16** : Behentrimonium **Methosulfate** (and) Cetearyl Alcohol **INCROQUAT™ BEHENYL TMS**: conditionneur, apporte également de la texture grâce à sa longue chaîne et à l'alcool gras
- **C16** : Cetyl triméthylammonium **Chloride**/CTAC **VARISOFT 300**: surtout utilisé dans les conditionneurs pour cheveux. Connu dans la littérature pour être irritant
- **C18 (x2)** : Distearyl dimonium **Chloride** **VARISOFT TA 100**: utilisé comme émulsionnant de conditionneur pour cheveux ou de crème pour la peau améliorant le toucher.

## 1.3. Les tensioactifs non ioniques

Parmi les tensioactifs non ioniques choisis, plusieurs classes sont représentées en fonction de la nature de leur tête polaire et de la liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyl. Au sein de chaque classe, les tensioactifs varient de par leur longueur de chaîne, la présence ou non d'insaturation et le volume de la tête polaire. Ces tensioactifs ne se présentent pas sous forme de mélanges complexes, facilitant l'établissement de relations entre les paramètres physicochimiques de la molécule et son action sur la peau.

### 1.3.1. Les éthers de PEG

- **C12**: Laureth-23 **LIPOCOL L23**
- **C16** : Ceteth-10 : **BRIJ C10**
- **C18**: Steareth-100 **BRIJ S100**
- **C18**: Steareth-2 **BRIJ S2**
- **C18**: Steareth-21 **BRIJ 721**
- **C18:1**: Oleth-20 **LIPOCOL O20**
- **C22** : Beheneth-25 **EUMULGIN BA25**

Dans cette famille, deux tensioactifs ont été utilisés en couple, le Steareth-2 et le Steareth-21 (chaînes en C18 pour les deux), pour respecter l'usage traditionnel en formulation cosmétique.

### 1.3.2. Les esters de PEG

- **C18** : PEG-20 stearate **LIPOPEG 10S**
- **C18** : PEG-100 stearate **LIPOPEG 100S**
- **C26** : PEG-8 beewax **APIFIL CG**
- **C18x3** : PEG-25 hydrogenated castor oil **CRODURET 25**

Du fait de son origine animale, l'Apifil CG, issu de la cire d'abeille peut présenter des impuretés, à savoir des longueurs de chaînes non uniformes, cependant il est très utilisé en cosmétique.

### 1.3.3. Les esters de sucrose

- **C12** : Sucrose Laurate **SURFHOPE C1216**
- **C18** : Sucrose stearate **SURFHOPE C1816**
- **C18:1** : Sucrose oleate **SURFHOPE C1715**

Ces trois familles de tensioactifs ont fait l'objet d'études dans le cadre des promoteurs d'absorption cutanée et sont fréquemment utilisés dans les produits cosmétiques à usage topique.

### 1.3.4. Les esters de sorbitan polyoxyéthylénés

- **C12** : Polysorbate 20 **TWEEN 20**
- **C18** : Polysorbate 60 **MONTANOX 60DF**
- **C18:1** : Polysorbate 80 **MONTANOX 80 VG**

Cette famille des TA est la plus couramment étudiée dans la littérature concernant les non ioniques.

### 1.3.5. Les esters de polyglycérol

Un seul représentant de cette famille a été choisi.

- **C12** : Polyglyceryl-5 laurate **DERMOFEEL G5L**

Tout comme les esters de sucrose, le Dermofeel G5L a l'avantage d'être non éthoxylé. En effet les tensioactifs éthoxylés, bien qu'ayant été reconnus comme non toxiques lors de leur utilisation cosmétique, ont une mauvaise image par les consommateurs (Fruijtjer-Pölloth 2005).

### 1.3.6. Les autres tensioactifs non ioniques

A la suite de cette liste de tensioactifs non ioniques, pour la plupart utilisés seuls avec une structure chimique relativement simple, d'autres molécules ont été ajoutées à l'étude. Ces tensioactifs sont des molécules plus complexes chimiquement et souvent en mélange, en présence d'alcool gras. Pour certains ces mélanges sont de véritables bases pour la formulation d'émulsions cosmétiques alliant les agents de surface et de texture. Bien que leur complexité et leur originalité ne facilitent pas l'établissement d'un lien entre la physicochimie du produit et son effet sur la peau, ils ont été également étudiés pour des raisons industrielles.

- **C12** : **Inulin** lauryl carbamate **INUTEC SP1**
- **C12x2** : Water (and) Sodium **Dilauramidoglutamide Lysine PELLICER L-30**
- **C16-C18** : Cetearyl Alcohol & Cetearyl **Glucoside MONTANOV 68**
- **C18** : Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl **Glucoside SIMULGREEN 18-2**
- **C16-C18** : Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and) PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20 **EMULIUM DELTA**
- **C18, C18:1, C16** : Hydrogenated **lecithin EMULMETIK 320**
- **C18** : Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate **SIMULSOL 165**
- PEG-12 **Dimethicone GRANSURF 61**
- **C18 (x1,5)** : PEG-20 Methyl **glucose sesquistearate GLUCAMATE SSE-20**
- **C18 (x1,5)** : Methyl **glucose sesquistearate GLUCATE SS**
- **C18, C12** : Sorbitan stearate (and) **Sucrose cocoate ARLACEL 2121**
- **C20:4** : Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & **Arachidyl Glucoside MONTANOV 202**

Ici également, deux TA sont utilisés usuellement en couple le Glucate SS et le Glucamate SSE-20.

## 2. Choix du squelette pour la formulation de l'émulsion

L'objet de l'étude reste le tensioactif, pour évaluer au mieux son effet sur la peau dans un contexte cosmétique, il nous a semblé plus pertinent de formuler une émulsion. Cette émulsion devait être la plus simple possible afin d'observer au mieux l'impact du tensioactif sur la peau et non pas des autres excipients.

Nous avons fait le choix d'une émulsion directe, huile/eau, celle-ci étant la forme majoritaire sur le marché de la cosmétique. Dans l'émulsion, le tensioactif a été introduit à la concentration de 3%, proportion moyenne, s'adaptant à l'utilisation usuelle de la majorité des tensioactifs, excepté pour l'Eumulgin SG et le Pellicer L-30 qui s'utilisent habituellement à des pourcentages plus faibles.

## ***2.1. Choix de la phase grasse***

Trois huiles ont été sélectionnées parmi celles les plus utilisées dans l'industrie.

Afin de déterminer celle qui sera la phase grasse de la base d'émulsion, leur tension superficielle et leur tension interfaciale (eau/huile) ont été déterminées grâce à un tensiomètre à goutte Krüss Drop Shape Analysis System, modèle DSA-10 Mk2, à température ambiante, selon la méthode de la goutte pendante.

Pour les mesures de tensions, la procédure générale consiste à former, à l'aide d'une aiguille, une goutte à l'équilibre, c'est à dire juste avant qu'elle ne tombe. On mesure ensuite certaines de ses dimensions à l'aide d'une image numérique. La forme de la goutte est reliée à la tension superficielle de l'huile si la goutte d'huile est à l'air libre (Figure 45) et interfaciale si la goutte d'eau se forme dans l'huile étudiée (Figure 46). La formation d'une goutte d'eau dans l'huile est plus pratique lorsque l'eau est plus dense que l'huile, ce qui était le cas pour ces trois huiles.



*Figure 45. Image numérique pour la mesure de la tension superficielle d'une huile.*



*Figure 46. Image numérique pour la mesure de la tension interfaciale d'une huile.*

Les mesures ont été faites avant et après purification des huiles sur une colonne d'alumine, afin de supprimer les impuretés susceptibles de modifier les tensions de surface. D'après les résultats obtenus (Tableau 10), le choix d'une huile de polarité moyenne, relativement pure à l'état initial, a été fait, il s'agit du **Caprylic Capric Triglyceride ou Miglyol 812N**. Cette huile possède de plus un grade pharmaceutique.

Tableau 10 Tensions superficielles et interfaciales des trois huiles sélectionnées avant et après purification.

	Tension superficielle (mN.m <sup>-1</sup> )		Tension interfaciale (mN.m <sup>-1</sup> )	
	Huile purifiée	Huile non purifiée	Huile purifiée	Huile non purifiée
C12-15 alkylbenzoate <b>FINSOLV TN</b>	30,38 ± 0,07	33,33 ± 0,25	38,27 ± 0,17	15,66 ± 0,20
Caprylic/Capric Triglycerides <b>MIGLYOL 812N</b>	<b>26,63 ± 0,52</b>	29,83 ± 0,19	<b>25,28 ± 0,37</b>	24,41 ± 0,53
Ethylhexylstearate <b>CETIOL 868</b>	27,55 ± 0,60	29,85 ± 0,09	39,94 ± 1,23	36,81 ± 0,48

La phase grasse a été ajoutée à hauteur de 20%.

## 2.2. Choix de l'agent de texture

Le tensioactif ne permet pas toujours de stabiliser totalement une émulsion. Il faut souvent avoir recours à des agents de texture (épaississants ou gélifiants) qui vont permettre de renforcer la stabilité de la formule en augmentant sa viscosité.

Le choix de cet agent de texture s'est porté sur la gomme xanthane, gélifiant d'origine microbienne très utilisé en industrie. Il a la particularité d'être indépendant du pH de la formule contrairement aux carbomères, autre gélifiant très utilisé. Cependant, la gomme xanthane est une molécule anionique, elle est donc incompatible avec les tensioactifs cationiques. Lorsque le TA cationique ne suffisait pas à lui seul pour stabiliser la formule (cas unique pour le Varisoft 300/ Cetyl trimethylammonium chloride), un autre gélifiant a été ajouté, l'hydroxyethylcellulose.

L'agent de texture a été ajouté à la concentration de 0.5%.

## 2.3. Base définitive et formulation

La formule définitive de l'émulsion de base est :

- 3% de tensioactif
- 20% d'huile
- 0.5% de gélifiant
- 76.5% d'eau déionisée

Pour la formulation, les recommandations des fournisseurs ont été respectées, en ce qui concerne la phase d'incorporation des tensioactifs et la température d'émulsification. Des lots de 200grs ont été réalisés, avec le même matériel d'agitation, les mêmes béciers et les mêmes temps et vitesse d'agitation afin de pouvoir observer uniquement l'effet de la nature du tensioactif sur les propriétés de la crème. (§ Matériel et méthode Chap2.)

### **3. Caractérisations physicochimiques des tensioactifs en solution**

#### ***3.1. Calcul du HLB***

La détermination du HLB des tensioactifs s'est effectuée grâce à la méthode de Griffin et de Davies, ainsi qu'en se renseignant auprès des fournisseurs (Annexe 1).

On constate que la majorité des HLB sont compris entre 10 et 20, ce sont des tensioactifs hydrophiles, utilisés pour la formation d'émulsions huile/eau.

#### ***3.2. pH en solution et en émulsion***

Les pH de solutions aqueuses à 3% de tensioactifs et des émulsions ont été mesurés à température ambiante à l'aide d'un pH-mètre. L'ensemble des résultats est présenté en Annexe 2.

On constate que la plupart des tensioactifs ne modifient que très peu le pH de l'eau ou de l'émulsion. Il est compris entre 5 et 7. Quelques exceptions existent cependant.

Certains TA acidifient la phase aqueuse avec des pH de 2.3 à 4.7: le Crodafos CS20A, l'Incroquat TMS, le Varisoft TA100 (ioniques) et deux non ioniques, le Lipopeg 10S et le Surfhope C1715

D'autres en revanche rendent l'émulsion ou la solution plus alcaline (pH de 7.2 à 9.05). C'est le cas de l'Eumulgin SG et du SLS pour les ioniques et du Gransurf 61 et du Pellicer L-30 pour les non ioniques.

### ***3.3. Tension superficielle et tension interfaciale***

Pour ces deux mesures, l'utilisation d'un tensiomètre à anneau de de Nouy a été préférée à celle du tensiomètre à goutte. En effet les solutions aqueuses étant à une forte concentration en TA, au-dessus de la CMC, une goutte formée au bout de l'aiguille d'un tensiomètre à goutte a tendance à se décrocher avant la saturation de l'interface. De plus, les mesures de tension interfaciale eau/huile ont été réalisées à chaud pour mimer l'étape d'émulsification, le délai de refroidissement étant important, là encore la goutte se décroche de l'aiguille avant le retour à température ambiante des deux phases.

L'anneau de de Nouy, mesure la tension de surface en tenant compte de la force d'étirement du film d'eau, jusqu'à sa hauteur maximale.

Ces mesures ne peuvent être effectuées que sur une partie des tensioactifs de l'étude : les tensioactifs solubles dans l'eau. En effet, les tensioactifs solubles dans l'huile, le sont à chaud, et en refroidissant, durcissent la phase huile, rendant la mesure de tension interfaciale impossible.

Pour toutes ces mesures, un soin particulier doit être apporté à la verrerie utilisée, qui doit être nettoyée selon un protocole garantissant l'élimination de toute impuretés et/ou contamination qui fausseraient les mesures.

#### **3.3.1. Tension superficielle**

Une solution aqueuse à 3% de TA est préparée et mise à chauffer au bain marie à 75°C, dans un flacon hermétiquement fermé, pour solubiliser parfaitement le TA. Puis la solution est transvasée dans le bécher de mesure couvert, et mis à température ambiante pendant 1h, afin que l'interface eau/air soit à l'équilibre

L'anneau est plongé dans la solution, la mesure de la TS est réalisée 3 fois de suite à 5 minutes d'intervalles afin que l'interface se stabilise de nouveau (Figure 47).

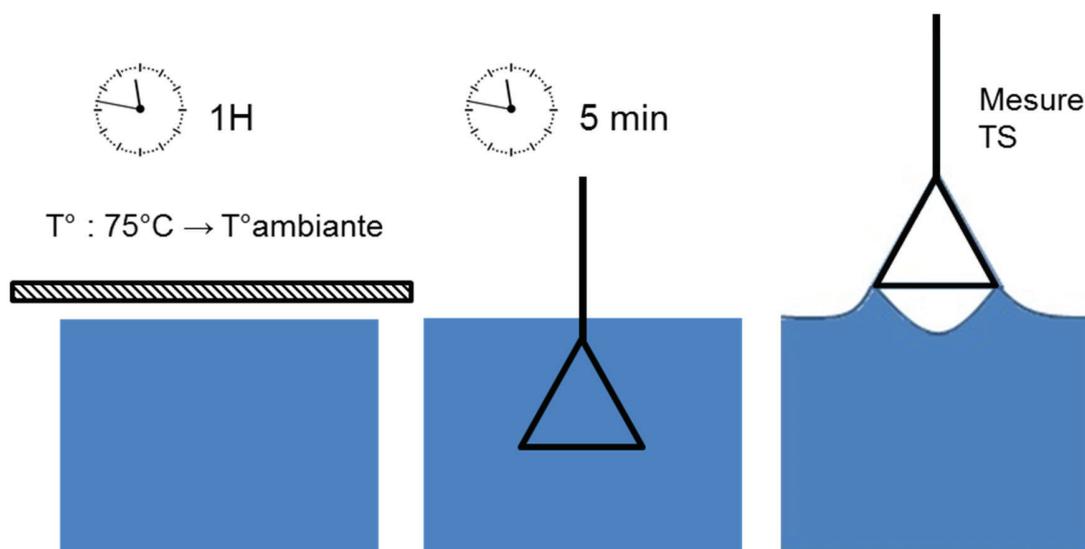


Figure 47. Protocole de mesure de la tension superficielle.

### 3.3.2. Tension interfaciale

La phase aqueuse à 3% de TA et la phase huileuse sont chauffées séparément dans le bain marie à 75°C. La phase aqueuse est versée ensuite dans le bécher de mesure. L'anneau est plongé dans la solution aqueuse, puis la phase huile est versée par-dessus. Le système est laissé au repos pendant 1h30 afin d'assurer le retour à la température ambiante et la stabilisation de l'interface. La mesure de la TI est réalisée 3 fois de suite à 5 minutes d'intervalle afin que l'interface se stabilise entre chaque mesure (Figure 48).

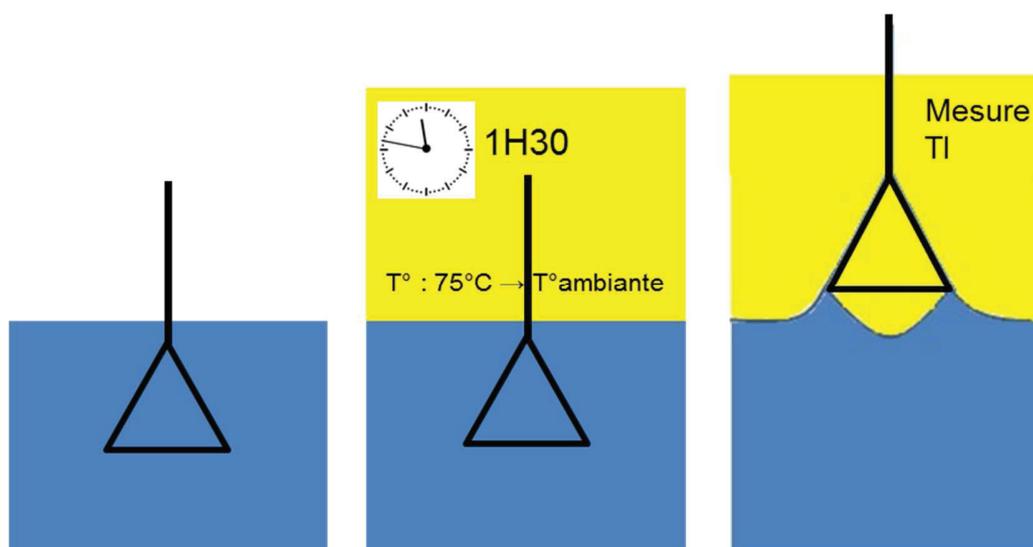


Figure 48. Protocole de mesure de la tension interfaciale.

### 3.3.3. Résultats

Les valeurs de tensions superficielles varient de  $29.9 \text{ mN.m}^{-1}$  à  $51.1 \text{ mN.m}^{-1}$  montrant bien la capacité du TA à abaisser la tension de surface de l'eau pure qui est de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$ .

Concernant la tension interfaciale, celle mesurée pour le Miglyol 812N et l'eau pure est en accord avec les résultats précédents par la méthode de la goutte pendante car elle est de  $23 \text{ mN.m}^{-1}$ .

Les tensions interfaciales entre les différentes solutions de TA et l'huile vont de  $0.8 \text{ mN.m}^{-1}$  pour le sucrose oléate à  $12.5 \text{ mN.m}^{-1}$  pour le Steareth-100.

On remarque que la charge du TA n'a pas d'impact sur la tension interfaciale, elles sont comprises entre  $2.9 \text{ mN.m}^{-1}$  et  $5.0 \text{ mN.m}^{-1}$ . La longueur de la chaîne alkyle ne semble pas influencer non plus, le Beheneth-25 (C22) et le Laureth-23 (C12) ont tous deux une TI de  $6.8 \text{ mN.m}^{-1}$ . Cette remarque reste pourtant contredite par l'observation des résultats des esters de sorbitan. La liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyl n'a pas non plus d'impact (ex : Oleth-20, TI =  $4.9 \text{ mN.m}^{-1}$  et PEG-20 Stearate, TI =  $4.3 \text{ mN.m}^{-1}$ ). En revanche la taille de la tête polaire semble avoir un effet. Le steareth-100 et les PEG-100 stearate ont des valeurs de TI de  $12.5 \text{ mN.m}^{-1}$  et  $8.7 \text{ mN.m}^{-1}$  respectivement contre  $4.3 \text{ mN.m}^{-1}$  pour le PEG-20 stearate. De plus le TA géminé, ayant deux têtes polaires donne une tension interfaciale de  $11.7 \text{ mN.m}^{-1}$ .

La famille des esters de sucrose semble être la plus efficace pour abaisser la tension interfaciale (TI comprise entre  $0.8 \text{ mN.m}^{-1}$  et  $2.9 \text{ mN.m}^{-1}$ ). Les résultats détaillés sont en Annexe 3.

Il faut souligner que ces TA n'ont pas subi de purification préalable et ont été utilisés dans les conditions de formulation de produits cosmétiques en industrie. Il est connu qu'ils peuvent souvent présenter des impuretés, ce qui expliquerait certains résultats contradictoires.

### 3.4. CMC, PAC et caractéristiques micellaires

La concentration micellaire critique est la concentration à partir de laquelle les molécules de tensioactifs vont s'agencer en micelles. Cette concentration dépend de la structure chimique du tensioactif. C'est un paramètre d'intérêt pour cette étude puisque qu'il a souvent été relié à la toxicité cutanée du tensioactif (Ananthapadmanabhan et al. 2004). De plus, comme précisé

précédemment dans la partie bibliographique, le calcul de la CMC permet d'avoir accès à d'autres paramètres tels que le paramètre d'agencement critique qui renseigne sur les caractéristiques micellaires des solutions de tensioactifs.

La CMC est déterminée en réalisant la courbe de la tension superficielle en fonction du log de la concentration en tensioactif. Pour cela plusieurs solutions de concentrations croissantes en TA ont été réalisées.

Chaque tensioactif est étudié à treize concentrations différentes.

Une solution mère de concentration 10 mg/ml est réalisée puis les dilutions suivantes sont réalisées à partir de la solution mère, à l'exception de la solution de concentration finale 0.001 mg/ml qui est réalisée à partir de la solution à 0.1 mg/ml.

<b>Concentration finale (mg/ml)</b>	<b>Volume de solution mère (ml)</b>	<b>Volume d'eau (ml)</b>
5	7.5	7.5
2.5	3.75	11.25
1	1.5	13.5
0.5	0.75	14.25
0.25	0.375	14.625
0.1	0.15	14.85
0.05	0.075	14.925
0.025	0.0375	14.9625
0.01	0.015	14.985
0.005	0.0075	14.9925
0.0025	0.00375	14.99625
0.001	0.15	14.85

Les mesures de tensions superficielles ont été réalisées à l'aide du tensiomètre à goutte Krüss Drop Shape Analysis System, modèle DSA-10 Mk2, par la méthode de la goutte pendante. Toutes les mesures ont été faites à température ambiante et tripliquées.

Suivant leur taille et leur encombrement stérique, le temps pour que les molécules de tensioactifs migrent à l'interface eau/air, la saturent et ainsi abaissent la tension superficielle, peut varier. C'est pourquoi il est important de faire des études cinétiques sur chaque tensioactif avant de mesurer les tensions superficielles des solutions.

La solution de concentration intermédiaire à  $0.1\text{mg.ml}^{-1}$  a été choisie pour réaliser ces mesures de cinétique de migration. La tension superficielle est prise toute les 30 secondes pendant 10 à 15 minutes.

On obtient le type de courbe représenté sur la (Figure 49).

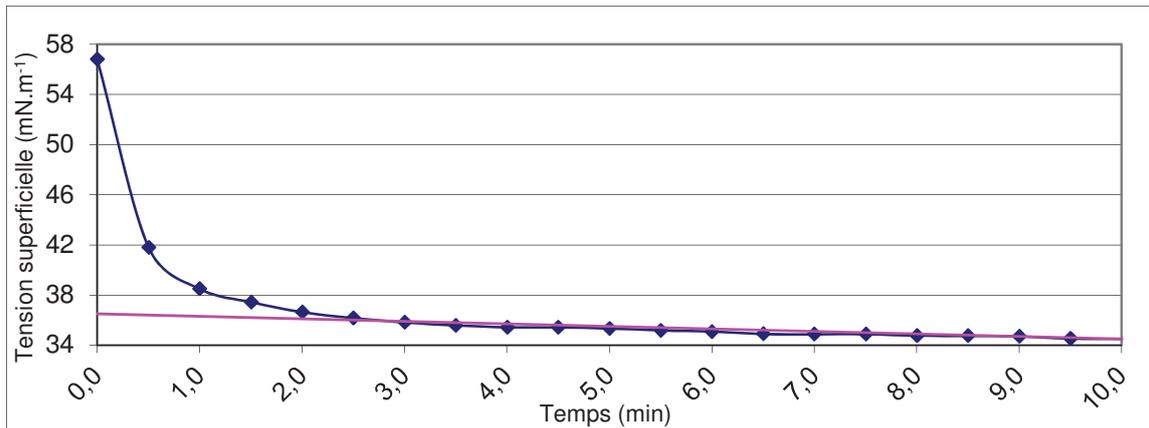


Figure 49. Etude cinétique de l'abaissement de la tension superficielle d'une solution de sucrose stéarate à  $0.1\text{mg.ml}^{-1}$ .

On remarque deux pentes sur cette courbe. La première de 0 à 2 minutes, correspond à un abaissement rapide de la tension superficielle, résultant de la migration des molécules de tensioactifs vers l'interface. La deuxième pente de 2 minutes à 10 minutes correspond à un abaissement très lent de la tension superficielle, correspondant à la migration d'impuretés présentes dans le lot de tensioactif. La tangente à la partie linéaire de la courbe coupe l'axe des ordonnées à une valeur de tension de surface donnée, qui correspond à un temps donné. Ce temps correspond à la cinétique de migration du tensioactif à l'interface.

Les molécules de sucrose stéarate mettent 2 minutes pour saturer totalement l'interface eau/air. Les mesures de tensions superficielles de chaque solution de sucrose stéarate seront effectuées 2 minutes après la formation de la goutte au bout de l'aiguille du tensiomètre à goutte. Les temps utilisés pour tous les tensioactifs sont donnés en Annexe 4.

Lorsque l'on construit le graphique de la tension superficielle ( $\gamma$ ) en fonction du log de la concentration en tensioactif on obtient la figure suivante (exemple du sucrose stéarate) (Figure 50).

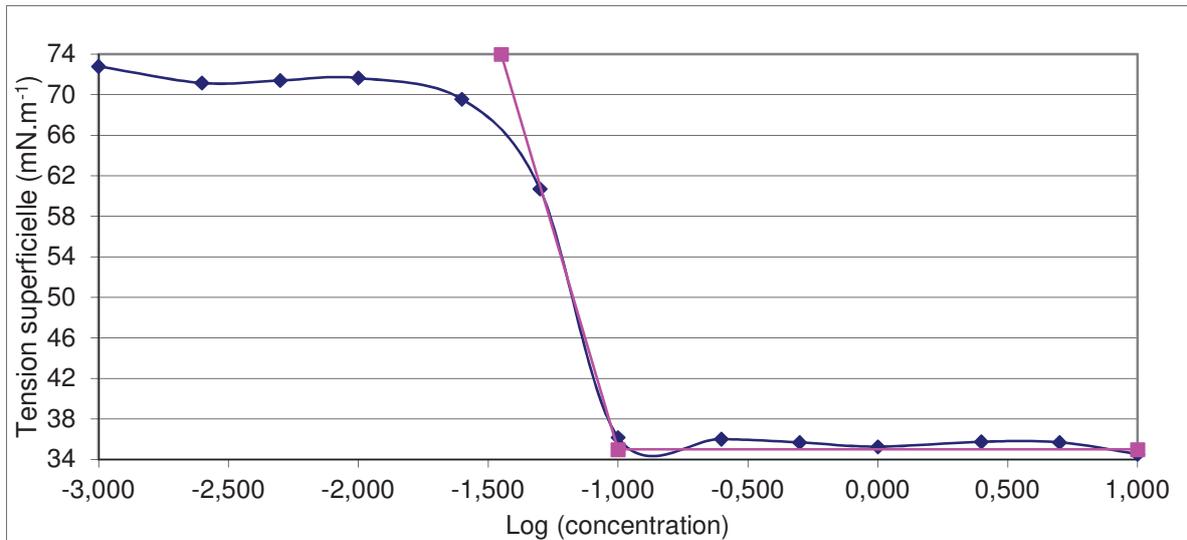


Figure 50. Tension superficielle de la solution en fonction du log de la concentration en TA (exemple de sucrose stearate)

Le point d'intersection des deux tangentes a pour coordonnées (-1 ; 35) avec  $\log C = -1$  et  $\gamma = 35$  mN/m. On en déduit donc  $C = 10^{-1} = 0.1$  mg.ml<sup>-1</sup>.

La CMC du sucrose stéarate est donc de 0.1 mg.ml<sup>-1</sup>.

La CMC nous permet d'avoir accès au paramètre d'agencement critique (PAC) du tensioactif.

Après avoir converti les concentrations en mol.ml<sup>-1</sup>, calculées à l'aide des masses molaires des tensioactifs, le graphe de la tension superficielle moyenne (en mN.m<sup>-1</sup>) en fonction du logarithme de la concentration (en mol.ml<sup>-1</sup>) est tracé. Après avoir calculé la pente de la tangente à la partie descendante de la courbe, il est alors possible de déterminer l'aire minimale de la tête polaire, et à partir de la longueur et du volume de la partie hydrophobe, d'en déduire le PAC :

$$\text{Pente} = \frac{d\gamma}{d \log C}$$

$$\Gamma \text{ (mol/m}^2\text{)} = - \frac{\text{pente}}{R \times T \times 2.3} \text{ pour les tensioactifs non ioniques}$$

$$\Gamma \text{ (mol/m}^2\text{)} = - \frac{\text{pente}}{R \times T \times 4.6} \text{ pour les tensioactifs ioniques}$$

$$\text{Aire minimale de la tête polaire } a_0 \text{ (m}^2\text{/molécule)} = \frac{1}{N_A \times \Gamma}$$

$$\text{PAC} = \frac{54 \times n_{\text{CH}_3} + 27 \times n_{\text{CH}_2}}{a_0 \times (1,265 \times n_{\text{C}} + 1,5)}$$

Le PAC renseigne sur les caractéristiques micellaires des solutions de tensioactifs :

Si  $PAC < 1/3$ , il se forme des micelles sphériques et on a une émulsion huile/eau.

Si  $1/3 < PAC < 1$ , il se forme des micelles cylindriques et on a une émulsion huile/eau.

Si  $PAC > 1$ , le système est inverse, on a une émulsion eau/huile.

Ainsi, pour l'ensemble des tensioactifs solubles dans l'eau ces paramètres ont pu être déterminés, les résultats figurent en Annexe 4.

On constate que les CMC vont de 2 ou 2.51 g.L<sup>-1</sup> pour les tensioactifs ioniques solubles dans l'eau à savoir le SLS et de CTAC, à 0.03g.L<sup>-1</sup> pour le Steareth-100. Les tensioactifs ont tous des caractéristiques d'émulsion directe huile/eau, excepté le sucrose stéarate. Ce tensioactif a pourtant un HLB de 18, mais il était faiblement soluble dans l'eau, ces esters de sucrose peuvent contenir des impuretés, ou peuvent être mélangés avec des esters de longueurs de chaîne différentes, expliquant ce comportement particulier.

On constate une influence de la structure chimique sur la CMC.

Surfactant	INCI	CMC (mg/mL)	
Tween 20	Polysorbate 20	0,11	} CMC diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyl augmente
Tween 60	Polysorbate 60	0,071	
Montanox 80	Polysorbate 80	0,063	
Texapon K12	Sodium Lauryl sulfate	2	
Gransurf 61	PEG-12 diméthicone	0,43	
Pellicer L30		1,41	
C 1816	Sucrose stéarate	0,1	} CMC difficile à obtenir (pureté du produit)
C 1715	Sucrose oléate	0,18	
C 1216	Sucrose laurate	0,16	
Lipopeg 10S	PEG-20 stéarate	0,06	} CMC augmente quand le volume de la tête polaire augmente
Lipopeg 100S	PEG-100 stéarate	0,13	
Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	0,13	
Lipocol L23	Laureth-23	0,22	} CMC diminue lorsque la longueur de la chaîne alkyl augmente
Lipocol O20	Oleth-20	0,04	
Brij S100	Steareth-100	0,03	} CMC augmente quand le volume de la tête polaire augmente
Eumulgin BA25	Beheneth-25	0,13	
Varisoft 300	Cetyl triméthylammonium Chloride	2,51	
Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	0,35	

La présence de charges augmente considérablement la CMC.

La nature de la liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyl semble influencer la valeur de la CMC.

Dans la littérature, la CMC a souvent été reliée au pouvoir irritant du tensioactif, cette partie sera développée dans le Chapitre 2.

### ***3.5. Comportement du tensioactif en phase aqueuse***

Le comportement du tensioactif dans la phase aqueuse est un paramètre d'intérêt, permettant de différencier les tensioactifs. Les différentes phases organisées que peuvent réaliser les tensioactifs dans l'eau vont influencer leurs interactions avec la surface cutanée.

Ce paramètre est étudié grâce à l'établissement de diagrammes de phase binaires eau/tensioactifs à 70°C, température d'émulsification et à 25°C. La méthode d'obtention de ces diagrammes et de quantification des phases retrouvées est développée dans la partie méthode du chapitre 2.

L'ensemble des résultats des diagrammes binaires figure dans le chapitre 2 (§ Résultats et § Résultats complémentaires).

## **4. Caractérisations physicochimiques des tensioactifs en émulsion**

### ***4.1. Granulométrie***

Une émulsion est une dispersion de globules d'huile dans une phase aqueuse contenant un faible pourcentage de gélifiant pour aider à sa stabilisation. La taille et l'homogénéité de taille des globules peut dépendre de plusieurs paramètres, ceux relatifs aux procédés de formulation et ceux relatifs à la nature des matières premières. Chaque émulsion a été formulée dans les mêmes conditions (mode d'agitation, vitesse, temps, volume de formule), elles ne diffèrent que par la nature du tensioactif. Ainsi, le tensioactif est le seul responsable des variations de granulométrie observées entre les différentes émulsions.

Les mesures de granulométrie sont réalisées grâce à un granulomètre laser Mastersizer 2000, basé sur le principe de diffraction du rayonnement laser par les globules d'huile. Deux paramètres ont été déterminés, le diamètre moyen des globules (d50) et la distribution de taille des globules exprimée par le Span  $((d90-d10)/d50)$ .

Les valeurs de diamètres moyens sont très variées, allant de 3.5µm pour l'Arlacel 2121 fortement utilisé en industrie cosmétique, qui est un mélange de plusieurs molécules tensioactives (Sorbitan Stearate (and) Sucrose Cocoate), 4µm pour le Croduret 25 (PEG-25 hydrogenated castor oil) à 79.6 µm pour le tensioactif cationique Incroquat TMS (Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol).

La dispersion de taille est large pour l'ensemble des tensioactifs (Span >1), à l'exception du tensioactif géminé Pellicer L30 (Water (and) Sodium Dilaoramidoglutamide Lysine) qui forme des émulsions avec des tailles de globules relativement homogène (Span = 0.77).

Plusieurs comportements sont ainsi observés (Annexe 5).

Par exemple le Brij S100 (Steareth-100) va former une émulsion homogène (Span = 0.99) où les globules auront un diamètre moyen relativement gros (d50 = 50 µm).

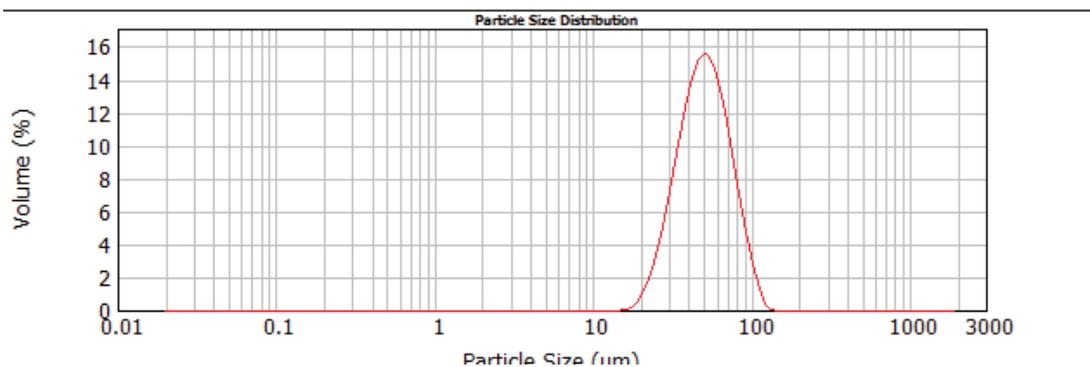
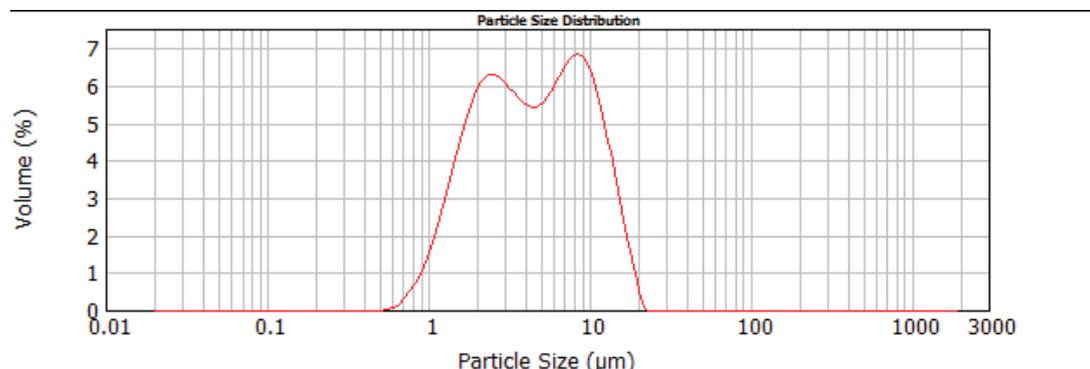


Figure 51. Distribution de taille des globules d'huile dans un émulsion stabilisée par le Brij S100.

L'Emulium delta va lui formuler une émulsion avec un diamètre moyen de globule petit (d50 = 4.5 µm) mais différentes tailles de population de globules (Span = 2.3)



*Figure 52. Distribution de taille des globules d'huile dans un émulsion stabilisée par l'Emulium delta.*

Ces résultats ne sont pas surprenant, l'objectif n'était pas d'avoir une même taille de globules pour toutes ou une distribution étroite, il faudrait pour cela ajuster les quantités et les conditions opératoires.

#### **4.2. Viscosité et rhéologie**

La viscosité et la rhéologie d'une émulsion dépend principalement de l'agent de texture incorporé dans la formule. Ici, l'agent viscosifiant est en très faible quantité. Les mesures de viscosités et des comportements rhéologiques des émulsions, ont été réalisées à température ambiante, à l'aide d'un rhéomètre cône/plan (Rheomat Lamy RM-300). Les émulsions avaient une viscosité comprise entre 350 et 1150 mPa.s<sup>-1</sup>, avec un comportement newtonien, montrant le faible impact de la nature du tensioactif sur les propriétés d'écoulement de l'émulsion. (Annexe 6)

#### **4.3. Comportement du tensioactif en émulsion**

Tout comme le comportement du tensioactif en phase aqueuse, ce paramètre est intéressant pour différencier les tensioactifs et pouvoir avoir des informations sur l'organisation des tensioactifs lors de l'application de la crème sur la peau, au fur et à mesure de l'évaporation de l'eau. L'étude des différentes phases que peut former le tensioactif en présence d'eau et d'huile à différentes concentrations se fait grâce à l'établissement de diagrammes de phase ternaires à 70°C, température d'émulsification et à 25°C (§ Partie bibliographique).

La méthode de réalisation de ces diagrammes et les résultats obtenus sont développés dans la partie méthode et les parties résultats et résultats complémentaires du chapitre 2. Les valeurs des paramètres d'ordre sont rassemblées dans l'annexe 7.

## **5. Conclusion**

Ce chapitre apporte une véritable carte d'identité du tensioactif d'un point de vue physicochimie. Les nombreux paramètres mesurés pour caractériser et différencier au mieux l'ensemble des

tensioactifs de l'étude seront utilisés systématiquement dans les autres chapitres afin de relier la physicochimie du tensioactif à sa toxicité cutanée et son effet sur la fonction barrière.



## Chapitre II. La toxicité cutanée des tensioactifs : relations structure/toxicité

**Contexte :** Les tensioactifs de par leurs propriétés physicochimiques sont présents dans de nombreux produits topiques. Ils peuvent interagir avec les constituants de la peau et causer des problèmes cutanés comme de l'irritation et de l'inflammation. Le potentiel toxique des tensioactifs est très variable selon leur nature et leur classe. Certains sont connus pour être très toxiques et d'autres très doux. D'une manière générale, les tensioactifs ioniques sont reconnus pour être les plus irritants. La tolérance du tensioactif est un paramètre clé pour la formulation de produits cosmétiques en industrie. Une investigation poussée de la physicochimie d'une large gamme de tensioactifs et la mise en relation des paramètres physicochimiques avec la toxicité cutanée du tensioactif afin d'obtenir des relations structure/activité est le but de cet article.

**Méthodes :** 14 tensioactifs non ioniques ainsi que deux tensioactifs anioniques et deux tensioactifs cationiques ont été évalués concernant leur toxicité *in vitro* sur des épidermes humains reconstruits. Deux tests de viabilité cellulaire ont été utilisés : le MTT (viabilité cellulaire) et le LDH (altération membranaire) ainsi que le dosage de libération de marqueurs d'inflammation immédiate (IL-1 $\alpha$  et IL-8). Une étude de différents paramètres physicochimiques caractéristiques des tensioactifs a également été réalisée, comprenant la CMC, le HLB, la granulométrie dans une base simple d'émulsion, et le comportement organisé ou non du tensioactif dans l'eau ou dans une émulsion grâce à l'établissement de diagramme binaires et ternaires et à l'exploitation des données à l'aide du paramètre d'ordre décrivant chaque phase organisée observée. Des analyses statistiques comme l'analyse en composantes principale et l'établissement de matrice de corrélation ont été effectuées afin d'établir une relation entre la toxicité du TA et sa physicochimie.

**Résultats :** Parmi les 18 tensioactifs de l'étude, 7 ont présenté une toxicité cutanée : un anionique (SDS), un cationique (CTAC) et 5 non ioniques dont 3 PEG ether, montrant une véritable toxicité concernant cette famille de TA. Concernant les non ioniques, aucun paramètre physicochimique n'a été relié à la toxicité cutanée. L'influence de la liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyle a été soulignée en observant la toxicité quasi inexistante des PEG ester comparativement aux PEG ether. Certains paramètres physicochimiques tels que la CMC n'ont pas pu être calculés pour les tensioactifs ioniques. L'introduction d'un nouveau paramètre, le

paramètre d'ordre, en lien avec l'organisation du TA, a permis de relier leur comportement en solution et en émulsion à leur toxicité. Ainsi, les tensioactifs ioniques présentant une phase organisée cristalline en solution aqueuse ou en émulsion ne sont pas toxiques, contrairement aux autres tensioactifs ioniques moins organisés et donc plus solubles dans l'eau.

**Conclusion :** Cette étude a permis dans un premier temps d'évaluer la toxicité de tensioactifs peu étudiés bien que fréquemment utilisés en industrie. L'innocuité des tensioactifs non ioniques a été remise en question. Des paramètres physicochimiques expliquant traditionnellement le potentiel irritant des tensioactifs, tels que la CMC ou la charge du tensioactif n'ont pas montré de pertinence dans cette étude. Un nouveau paramètre pouvant s'appliquer à l'ensemble des tensioactifs, le paramètre d'ordre, a participé à l'explication sur la différence de toxicité entre les TA ioniques, montrant que les TA capables de former des phases cristallines n'étaient pas toxiques pour la peau.

## **Skin toxicity of surfactants: structure/toxicity relationships**

Emmanuelle LEMERY <sup>a,b</sup>, Stéphanie BRIANCON <sup>a</sup>, Yves CHEVALIER<sup>a</sup>, Claire BORDES<sup>c</sup>,  
Thierry ODDOS <sup>b</sup>, Annie GOHIER <sup>b</sup>, Marie-Alexandrine BOLZINGER <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Lyon F-69008, Lyon, France; Université Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, F-69008, Lyon, France; UMR CNRS 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, UMR-CNRS 5007 (LAGEP), F-69622, Villeurbanne, France.

<sup>b</sup> Johnson & Johnson Santé Beauté France, Département des Nouvelles Technologies. Campus de Maigremont, 27100 Val de Reuil, France.

<sup>c</sup> Université de Lyon, F-69622 Villeurbanne, France; Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5280, F-69622 Villeurbanne, France.

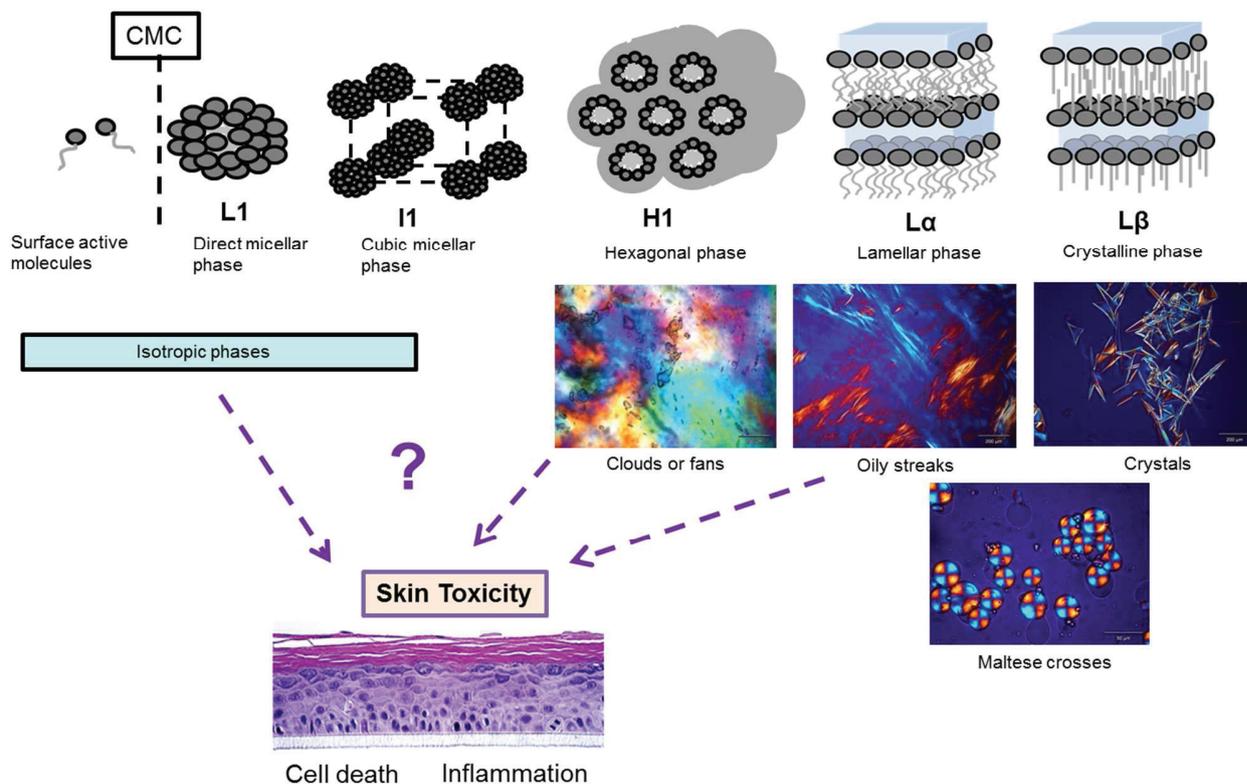
\*Corresponding author. E-mail address: chevalier@lagep.univ-lyon1.fr. Postal address: LAGEP, 43 bd du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne, France. Tel.: +33 (0) 4 72 43 18 77, Fax: +33 (0) 4 72 43 16 82 (Y. Chevalier).

---

**Publié dans Colloids and Surfaces A (Janvier 2015)**



## Graphical abstract



## Abstract

The skin toxicity of four ionic surfactants and fourteen non-ionic surfactants was investigated so as to disclose structure/toxicity relationships. The skin toxicity was assessed by means of four in vitro assays, MTT and LDH test of cell viability, and detection of the inflammation markers IL-1 $\alpha$  and IL-8. Several descriptors of the physicochemical properties of the surfactants were measured in order to find out those molecular descriptors that correlate with the toxicity measured on skin. Principal component analysis and correlation matrix were used for the search of the molecular descriptors having the highest relevance. There was a definite difference between ionic and non-ionic surfactants. Ionic surfactants are the most toxic if they are soluble in water. Crystalline ionic surfactants of low solubility show low toxicity. The sign of the charge, anionic or cationic does not matter. The value of the CMC that has been put forwards as a highly relevant parameter does not account for the full skin toxicities observed; the CMC of non-ionic

surfactants is not a parameter of relevance. For non-ionic surfactants, the nature of the chemical bond linking the polar head group and the alkyl chain has a significant impact on skin toxicity; PEG ethers appear more toxic than PEG esters. The results revealed the mildness of polyoxyethylene sorbitan esters whatever their alkyl chain length. On the other hand, for sucrose ester surfactants C12 alkyl length resulted in the greatest skin toxicity. Since the molecular parameters of ionic, non-ionic, water-soluble and crystalline surfactants are different, a universal parameter was introduced, the order parameter describing the orientation ordering of surfactant molecules at interfaces, The highly ordered organization of crystalline surfactants associated with their low solubility in water make them very low-irritant surfactants.

*Keywords:* surfactants; skin toxicity; CMC; order parameter; principal component analysis

---

**Abbreviations:**

RHE: Reconstructed Human Epidermis

SC: Stratum Corneum

TEWL: Transepidermal Water Loss

LDH: Lactate dehydrogenase

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium dye

EO: Ethylene oxide

PEO: Poly(ethylene oxide)

PEG: Poly(ethylene glycol)

HLB: Hydrophile Lipophile Balance

CMC: Critical Micellar Concentration

IL: Interleukin

SLS: Sodium lauryl sulfate

SSL: Sodium stearyl lactylate

DC: Distearyltrimonium chloride

CTAC: Cetyl trimethyl ammonium chloride

O/W: Oil in Water

PCA: Principal Component Analysis

## 1. Introduction

Topical formulations of either pharmaceutical or cosmetic products often contain surfactants; they are mainly used as emulsifiers or detergents, and many of them may elicit skin reactions such as irritant contact dermatitis or may cause inflammation. Though emulsions are often used to treat inflammatory skin disorders such as eczema or atopic dermatitis, emulsions may also cause skin disorders because of the presence of surfactants added as stabilizers [1]. The toxicity/irritancy properties of surfactants towards skin show a wide variability; some surfactants are recognized as having strong irritant potency whereas skin can much better withstand other surfactant molecules termed as “mild” [2]. Some surfactants show moisturizing properties because they are able to supplement a lack of endogenous lipids in the Stratum Corneum (SC) [3]. The mildness is one property that is considered when a surfactant is selected in the design of a topical formulation. Although experimental data do exist and rough rules have been established, there is no clear rationale pertaining to the irritant properties of surfactants so that empirical knowledge prevails. It is claimed that cationic surfactants are much more irritant than anionic and non-ionic; but there are many exceptions to this crude rule. In order to go beyond empirical knowledge, structure-activity relationships are needed, which is the purpose of the research reported in the present paper. Surfactants have been extensively studied under *in vitro* and *in vivo* conditions to determine such structure-activity relationships [4]. These studies pointed out the role of the nature of the polar head group of the surfactant and especially the presence of a charge which favors interaction with SC proteins, leading to a swelling of the SC [5,6]. There is a consensus that non-ionic surfactants have the least potential for irritancy [7]. In her safety assessment of PEGs and their derivatives, Fruijtjer-Pöllöth [8] drew attention to the fact that there were only few cases of a sensitization reaction for preparations containing PEG and PEG derivatives such as PEG ethers and PEG esters. These surfactants did not cause ocular or dermal irritation and had extremely low acute and chronic toxicities.

Since it is believed that the bioavailable part of the full surfactant content is the free molecules (monomers) and that the surfactants involved in micelles do not contribute to the irritancy, skin toxicity is also linked to the ability of a surfactant to self-assemble as micelles. The interaction of single molecules with SC proteins is stronger than that of micelles with SC proteins. On this basis, irritancy is related to the Critical Micellar Concentration (CMC); surfactants with high CMC being more toxic than those with low CMC [6,9]. This is a general trend only however; no definite conclusions of a general bearing can be drawn because there are so many exceptions to this

trend. Moreover, once dispersed in an emulsion, the situation is much more complicated because the surfactant exists in three states, free molecules, micelles and adsorbed on oil droplets; the contribution of the oil droplets to irritancy or inflammation has never been addressed. The emulsifier adsorbed at the oil-water interface is available, though sparsely, for interaction with the SC components. As summary, both the surfactant molecules and the other excipients of the formulation contribute to the skin irritancy.

The topic is made even more complex because there are several mechanisms by which surfactant can cause irritancy. Surfactants can have a detergent activity that causes removal (washing off) of the SC lipids. They can penetrate the skin and associate with the SC lipids, causing a fluidization of the SC barrier materials. They can penetrate the skin deeper into the viable layers and cause immune reactions. They can associate and denature biological materials such as proteins. Since there are so many mechanisms of action, several complementary testing methods should be associated for a significant overview of the surfactant activity can be reached. Indeed, several authors who tried to sort detergents according to their skin irritancy concluded that the irritancy ranking was dependent on the choice of the type of exposure method and the type of disturbance. As an example Tupker et al. [10] evaluated the skin irritancy ranking of an anionic detergent by several methods and pointed out the influence of the evaluation method when compared with the outcome of the irritancy method. Moreover depending on the method used and the kind of disorder (lipid removal or interaction with proteins as example) no definite link was found between two definite methods such as blood flow and TEWL [1]. *In vitro* tests evaluate both irritancy and cytotoxicity. These tests have become more widely used following the 6<sup>th</sup> amendment of the European Union Cosmetics Directive [11] which drew attention to alternative methods developed to replace animal testing for irritancy assessment. These are more complex methods using biochemical markers for studying the irritancy and cytotoxicity of skin. Development of *in vitro* skin models has grown exponentially in recent decades, starting from keratinocyte monolayer and extending to Human Reconstructed Epidermis or Living Skin Equivalent models. Ponc et al. [12] reported that these models are equivalent to native skin tissues, based on architecture, lipid composition and homeostasis measurements. Furthermore, these models are recommended by the European authorities for skin irritation assessment [13]. It is recognized though that reconstructed skin models have inferior skin barrier function than real skin [14,15].

Skin toxicity studies are based on several available tests, both *in vitro* and *in vivo*. All such tests provide indirect information on skin toxicity; they all give complementary pieces of information. *In vivo* tests more generally aim at measuring irritation than assessing cytotoxicity. After application of patch tests or soap chamber tests over various exposure times, skin is observed by macroscopic methods, such as visual and histological examination [16], measurements of skin redness with a chromameter [17], evaluation of skin blood flow and erythema [18]. Other physical measurements can provide information on surfactant action on the SC barrier such as Transepidermal Water Loss (TEWL) and corneometry, which reflect alteration of the skin barrier against water diffusion and disturbance of the lipid matrix of SC [19-21].

Cell viability is often evaluated by means of the MTT assay that makes use of the absorbance of the MTT tetrazolium dye (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [22]. The classical MTT assay reflects the mitochondrial enzyme activity [23-26]. It is generally coupled with an LDH assay [27], giving complementary data on membrane alteration [28-30]. As acknowledged in a workshop of the European Center for the Validation of Alternative Methods, there is indeed a correlation between irritant potential and reduced cell viability, but other important factors, such as cytokine release, must also be considered [31]. Cell viability measurements can be combined with interleukin assay as inflammation markers, IL-1 $\alpha$  and IL-8, are released in the case of inflammation. [30,32]. The inflammatory mediator IL-1 $\alpha$  initiates the inflammation process [33]. IL-1 $\alpha$  is expressed as an intracellular protein; it accumulates in keratinocytes and is released by injured cells or after membrane alteration [34]. IL-8 is a secondary inflammatory cytokine, secreted in response to IL-1 $\alpha$  release during inflammation. Its formation is not a specific response and therefore it represents a more general parameter of tissue damage [35,36]. A subsequent combination of data for both viability and inflammation may result in a more comprehensive evaluation of the skin toxicity of substances [31]. Moreover, Coquette et al. [37] suggested that the IL-8/IL-1 $\alpha$  ratio could be an interesting parameter to discriminate sensitizing surfactants from irritant ones. Skin chemicals can be considered as allergens when extracellular IL-8 > IL-1 $\alpha$  and as irritants when extracellular IL-8 < IL-1 $\alpha$ . This ratio was calculated in the present study.

The objective of this study was therefore to search for relationships between *in vitro* skin toxicity and physicochemical properties of surfactants. A wide range of surfactants (18) was selected from among those most commonly used in cosmetics. They were mainly non-ionic, but some cationic and anionic surfactants were also included. Due to its well-known irritant potential, SLS

was considered as a positive control for testing irritancy [38,39]. Several chemical structures were chosen in order to study the influence of the ionic/non-ionic character, the head group polarity and bulkiness, the nature of the chemical bond between the polar head and the alkyl chain, the length of the alkyl chain. Both for ethical reasons and considering the large number of surfactants included in this study, *in vitro* assays were chosen, as they were more relevant in the framework of a screening of skin toxicity potency [31].

In addition to chemical structure, other physicochemical properties have been examined in this study: the hydrophile lipophile balance (HLB), the critical micellar concentration (CMC) of the water-soluble surfactants, and the surfactant phase behavior in binary and ternary mixtures. The last of these was studied through binary and ternary phase diagrams and the formulation of simple emulsions characterized by their droplet size distribution and stability.

In this study, *in vitro* assays on reconstructed human epidermis (RHE) were chosen in order to evaluate the skin toxicity of the surfactants used. Cell viability and inflammation have been measured systematically in order to screen the surfactants according to their skin toxicity. The toxicity results were then related to the physicochemical properties of the surfactants. In this investigation, both the effect of chemical structure using different surfactants and the potential irritation in a ternary formulation have been studied.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

#### **2.1.1. Surfactants**

Two anionic surfactants and two cationic surfactants were chosen for studying the effect of the ionic group of surfactants. 14 non-ionic surfactants were also included in this study: 3 PEG esters, 5 PEG ethers, 3 poly(oxyethylene) sorbitan esters, and 3 sucrose esters. All surfactants were used without any further purification. A detailed list follows:

Anionics: Sodium lauryl sulfate (Texapon K12 P) from BASF (St. Augustin, Germany); Sodium stearyl lactylate (Dermofeel SL) from Lucas Meyer Cosmetics (Champlan, France).

Cationics: Distearyltrimonium chloride (Varisoft TA 100) and Cetyl trimethyl ammonium chloride (Varisoft 300) from Evonik Industries AG (Essen, Germany).

Non-ionic:

PEG esters: PEG-20 stearate (Lipopeg 10S) and PEG-100 stearate (Lipopeg 100S), from Lipo Chemicals Inc. (Paterson, NJ); PEG-25 hydrogenated castor oil (Croduret 25), from Croda France SAS (Trappes, France).

PEG ethers: Laureth-23 (Lipocol L23) and Oleth-20 (Lipocol O20) from Lipo Chemicals Inc., (Paterson, NJ); Ceteth-10 (Brij C10) and Steareth-100 (Brij S100) from Croda France SAS (Trappes, France); Beheneth-25 (Eumulgin BA25) from BASF (St. Augustin, Germany).

Poly(oxyethylene) sorbitan esters: Poly(oxyethylene) sorbitan laurate (Tween 20) from Croda France SAS (Trappes, France); Poly(oxyethylene) sorbitan stearate (Montanox 60) and Poly(oxyethylene) sorbitan oleate (Montanox 80) from Seppic SA (Castres, France).

Sucrose esters: Sucrose laurate (Surfhope C1216), Sucrose stearate (Surfhope C1816) and Sucrose oleate (Surfhope C1715) from Mitsubishi-Kagaku Foods Corporation (Tokyo, Japan).

#### 2.1.2. Emulsion components

For preparing the emulsions using the above surfactants as emulsifiers, Caprylic/Capric triglycerides of pharmaceutical grade, (Miglyol 812 N) from Sasol Germany GmbH, (Witten, Germany) was chosen as model oil owing to its wide use in cosmetic products. A gelling agent, Xanthan gum (Keltrol CG) from CP Kelco US. Inc, (Atlanta, USA) was added to improve emulsion stability.

#### 2.1.3. Chemicals

Reagents for the cell viability test were MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinum bromide) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and LDH (TOX7-1KT Lactate Dehydrogenase-based In-Vitro Toxicology Assay Kit, Sigma-Aldrich). Inflammation potency was evaluated by measuring the release of interleukins by flow cytometry; bioplex reagents (Human IL-1 $\alpha$  and IL-8 fluorokine MAP for LUMINEX, Human base kit, R&D Systems, Lille, France) being used. Reconstructed Human Epidermis (RHE) tissues were purchased from Skinethic, Lyon, France.

## 2.2. Methods

### 2.2.1. Surfactant characterization

Apart from their chemical structure, surfactants have been characterized by their CMC, their HLB and their behavior in a binary system with deionized water, and in a ternary system surfactant/water/oil as an emulsion with Miglyol 812N.

The CMC values have been determined from surface tension measurements by plotting the surface tension of the surfactant solutions as a function of the logarithm of the surfactant concentration. Surface tension was measured with a pendant drop tensiometer (Krüss Drop Shape Analysis System, model DSA-10 Mk2). CMC has been determined only for water-soluble surfactants.

The hydrophile lipophile balance (HLB) has been calculated in accordance with the Griffin method [40].

### 2.2.2. Phase diagrams

Binary phase diagrams:

For each surfactant, 12 aqueous solutions were prepared with the following surfactant concentrations: 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, and 90% (w/w). In addition a sample containing only surfactant (100%) was used. The samples were stored in closed vials in an oven at 25°C for several days/months until equilibrium was reached.

Ternary phase diagrams:

For each surfactant 15 emulsions were prepared. The percentage concentrations of oil, surfactant and deionized water for each sample are given in Table 1. Oil-soluble surfactants were added to the oily phase which was heated at 75°C. Water-soluble surfactants were added to the aqueous phase made of deionized water. The aqueous mixture was then heated to between 50 and 75°C, depending on supplier's recommendations. The oil phase was poured into the aqueous phase under high-speed stirring for one minute (Ultraturrax IKA T25, operating at 8,000 rpm). All samples were then placed in closed vials and stored in an oven at 25°C for several days/months until they reached equilibrium.

Table 1. Composition of the ternary mixtures used for establishing a ternary phase diagram.

% Oil	% Surfactant	% Water
10	3	87
10	5	85
10	10	80
10	15	75
10	20	70
20	3	77
20	5	75
20	10	70
20	15	65
20	20	60
30	3	67
30	5	65
30	10	60
30	15	55
30	20	50

#### Sample analysis:

Each binary and ternary vial was observed using polarized optical microscopy (LEICA DMLM) to identify the sample structure and identify the presence of crystalline, lamellar or cubic phases. The structures were mostly anisotropic but isotropic phases can also be observed as direct micellar phases or cubic phases.

From these observations water-surfactant binary phase diagrams have been drawn for each surfactant. In order to get a characteristic of the surfactant behavior in the aqueous phase, the first organized structure encountered at 25°C while increasing the surfactant concentration was identified from the polarized optical microscopy pictures and the order parameter  $S$  was attributed to this structure as explained in the Results section.

#### Emulsions:

O/W emulsions (200 g total mass) were prepared using a Rayneri Turbotest, model 33/ 300. They all contained 3% of surfactant, 20% of oil, 0.5% of gelling agent, and 76.5% of deionized water. This concentration of surfactant was above the CMC for each surfactant, oil droplets were all saturated by surfactants and micelles and monomers were present.

Oil-soluble surfactants were added to the oily phase which was heated at 75°C; the oily phase was then poured into hot deionized water (75°C) containing the gelling agent while stirring at

400 rpm. The emulsion was subsequently mixed at 800 rpm until it reached room temperature. The pH was adjusted to between 5 and 7 using an aqueous solution of sodium hydroxide or of citric acid when necessary in order to avoid the influence of pH variations on skin toxicity.

Water-soluble surfactants were added to hot deionized water (at a temperature between 50 and 75°C, depending on supplier recommendations). The gelling agent was then added and the aqueous solution stirred at 400 rpm. Oil was heated at the same temperature as the aqueous solution. It was then poured into the aqueous solution and mixed at 800 rpm until the mixture reached room temperature. For the same reasons as mentioned above, the pH was adjusted to between 5 and 7 with the addition of an aqueous solution of sodium hydroxide or of citric acid as necessary.

No preservative was added to the emulsions because they could alter the toxicity results. The emulsions were therefore used immediately after their preparation (within 3 days following their preparation).

Characterization:

Emulsion size distribution was measured by small-angle laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern, UK). Two parameters were determined: (i) d50 ( $\mu\text{m}$ ) (mean droplet diameter) and (ii) Span  $((d_{90}-d_{10})/d_{50})$ , characterizing the width of the droplet size distribution.

### 2.2.3. *In vitro* assessment of cytotoxicity and inflammation

Cytotoxicity tests were conducted on Reconstructed Human Epidermis (RHE) tissues. Upon delivery, RHE devices were transferred into 3 mL of RHE aqueous growth medium, free from antibiotics and hydrocortisone, and treated immediately. For each surfactant, three Reconstructed Human Epidermis (RHE) tissues were treated with 10  $\mu\text{L}$  of emulsion at 3% of surfactant placed at the center of the surface. The emulsion was then topically applied and left on the RHE during all the incubation. Four untreated RHE inserts were used as controls. Each sample was placed in 3 mL of aqueous growth medium and incubated at 37°C, in the presence of 5%  $\text{CO}_2$  and 95% humidity, for 72 h. A scheme of the experimental set up is shown in Figure 1.

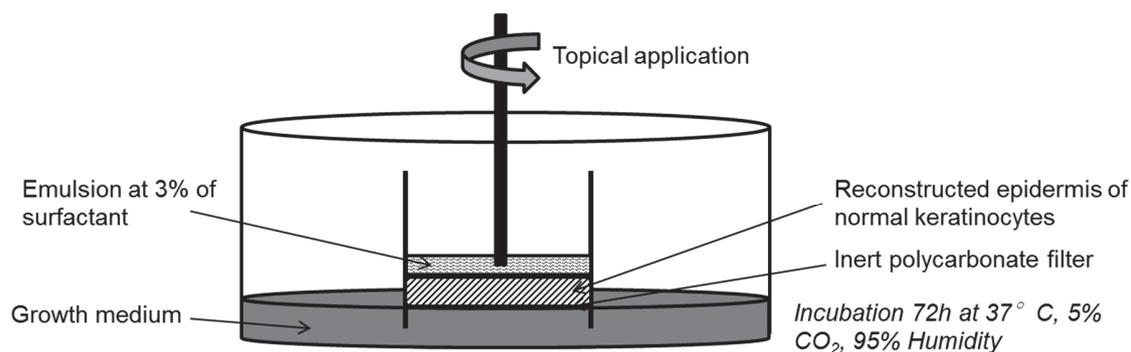


Figure 1. Scheme of the cytotoxicity experimental set up.

### 2.2.3.1. Cell viability

MTT method:

A solution of MTT at 5 mg/mL in PBS was prepared. 500  $\mu$ L of the 10 times diluted solution (at 500  $\mu$ g/mL) was transferred to each well and the RHEs were then added to the wells. After three hours incubation at 37°C and in the presence of 5% CO<sub>2</sub>, to dissolve the purple formazan product, the mixtures containing the RHEs were shaken for 30 min with isopropanol at room temperature. The absorbance of the resulting solutions was then read at a wavelength of 540 nm with a microplate reader [41].

LDH method:

100  $\mu$ L of supernatant was mixed at room temperature with 200  $\mu$ L of LDH reagent according to the procedure provided by the manufacturer.

The cell viability and the cell membrane alteration, linked to cell viability, were expressed relatively to the control from the relationship (x can be MTT or LDH results):

$$x = \frac{\text{mean of Absorbance values of treated skin (n=3)}}{\text{mean of Absorbance values of untreated skin (n=4)}}$$

### 2.2.3.2. Inflammation

The RHE growth medium was screened for the primary inflammation marker Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and the delayed inflammation marker Interleukin-8 (IL-8). The collected RHE growth medium

was labelled using the Fluorokine MAP Human Base Kit A and analyzed by flow cytometry using the Bioplex-200 instrument (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), a device relying on a Luminex Multi-Analyte Profiling technology. The same equation as mentioned above was used to evaluate the effect of the surfactant on IL-1 $\alpha$  and IL-8 release.

### 2.3. Data treatment and statistical analysis

For each surfactant and each cytotoxicity test (MTT, LDH, IL-1 $\alpha$  and IL-8) the ratio of the mean of the 3 treated RHE on the mean of 4 untreated RHE was used. The ratio of IL-1 $\alpha$  to IL-8 quantities was calculated to evaluate the irritant potency (high ratio) or the sensitization potency (low ratio) of the surfactant.

A Principal Component Analysis (PCA) was performed using the JMP<sup>®</sup> software (SAS Institute Inc.) to visualize the cytotoxicity data. The Pearson correlation coefficient was calculated between each pair of parameters to identify which physicochemical parameter is directly related to the cytotoxicity profile.

## 3. Results

### 3.1. Selection of the descriptors for the physicochemical properties of surfactants

The descriptors that have already been used in previous works have also been used in the present study: the CMC, the alkyl chain length and the degree of ethoxylation of the polar head. The CMC is defined for water-soluble surfactants only, and the ethoxylation degree pertains to nonionic surfactants only. Descriptors that apply to the full surfactant data set are needed.

The HLB number is one of them since its value is easily found in well-documented tables for all the most common surfactant molecules [42]. The predictive character of the HLB number is good when dealing with the stabilization of emulsions by nonionic surfactants; it is often in failure for ionic surfactants and/or when it is applied to other applications than emulsions. The crystalline cannot be described correctly by the HLB number. Therefore, the HLB number was retained as a descriptor because of its universal bearing; but it may be of poor help in the present work because of its limitation as an empirical parameter devoted to emulsions.

One general property of surfactants is the curvature of the interface that they form as they self-assemble into supramolecular structures. It is difficult to get a quantitative account of this property. In particular, both the balanced surfactants and the crystalline surfactants self-

assemble as flat interfaces (zero curvature) although they are definitely different. The order parameter of the surfactant molecules at an interface allows such a discriminative description. Indeed it assumes different values at interfaces of different curvatures, and it discriminates the perfect order of crystalline surfactants and the balanced surfactants at flat fluid interfaces.

The order parameter,  $S$ , of a surfactant describes its mean orientation with respect to the interface. The order parameter has been introduced in the field of liquid crystals as an estimate of the orientation of the molecules with respect to the director of the liquid crystal structure [43]. The higher the value of  $S$ , the most ordered the structure. It assumes the maximum value  $S = 1$  for the perfect order in a crystalline material.  $S = 0$  for a fully random orientation of the surfactant molecules.  $S$  is the second moment of the angular distribution function:

$$S = \frac{1}{2} \langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle$$

where  $\theta$  denotes the angle between the main axis of the surfactant molecule and the normal to the interface (Figure 2), and the angle brackets indicate averaging over all the molecules. In the case of surfactants,  $S$  has been measured in different systems and theoretical calculations confirmed the general trends of the experiments [44-46]. The typical values are:  $S = 1$  for a crystalline phase,  $S = 0.6$  for a lamellar phase,  $S = 0.5$  for a hexagonal phase,  $S = 0.4$  a cubic “micellar” phase and 0 for an isotropic randomized phase. Since surfactant micelles can assume different shapes, mainly spherical or cylindrical, and it is difficult to assess the curvature of the micelle surface in the isotropic micellar phase, the shape of the micelles was taken identical to that in the first adjacent ordered mesophase in the binary phase diagram (surfactant + water). Thus,  $S = 0.4$  if the most dilute mesophase is the cubic one made of spherical micelles ordered on a periodic array of cubic symmetry;  $S = 0.5$  if the most dilute mesophase in the hexagonal one made of cylindrical micelles, and  $S = 0.6$  if the first mesophase is the lamellar one.

Finally, since the toxicity behavior of surfactant in emulsions is affected by the presence of oil, and it is well-established that the properties of surfactants depend on the presence and the nature of oil, two supplementary descriptors of the properties of surfactants have been introduced: the size of oil-in-water emulsion droplets and the width of their size distribution assessed from light scattering measurements on emulsions prepared by the same standard emulsification process. The  $d_{50}$  was taken as the mean size of droplets and the  $\text{Span} = (d_{90} - d_{10})/d_{50}$  was taken as a descriptor for the width of the size distribution.

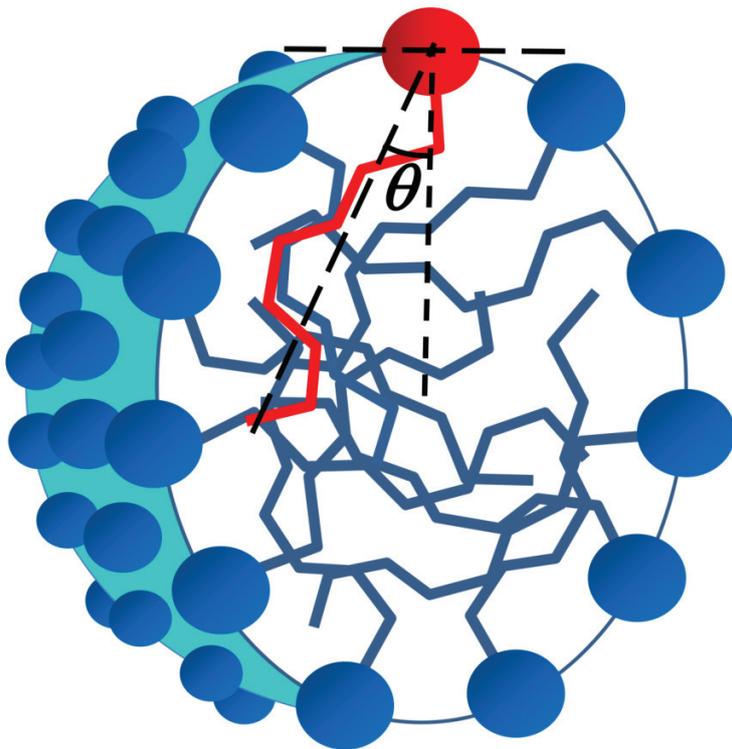


Figure 2. Orientation of a surfactant molecule inside its self-assembled structure. The  $\theta$  angle of its main axis with respect to the normal to the interface enters the calculation of the order parameter  $S$ .

### 3.2. Surfactants characterization and water-surfactant binary phase diagrams

The molecular parameters and the physicochemical descriptors of the surfactants inferred from the measurements carried out on their solution in water are given in Table 2.

Table 2. Physicochemical characteristics of surfactants and binary systems.

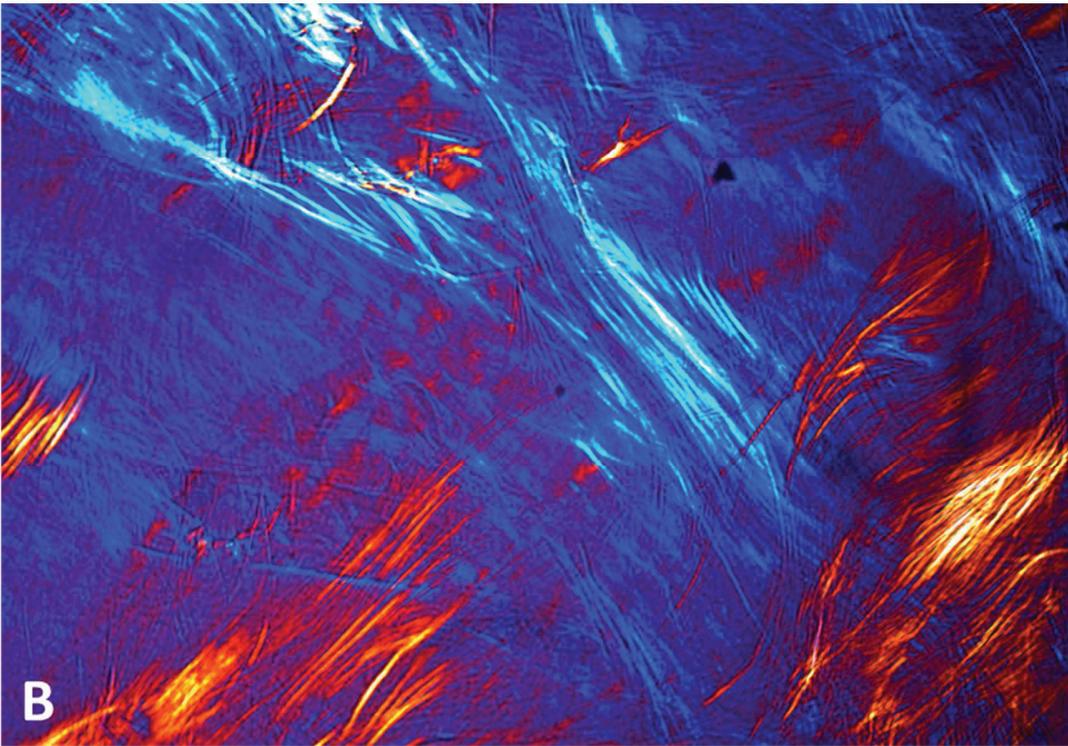
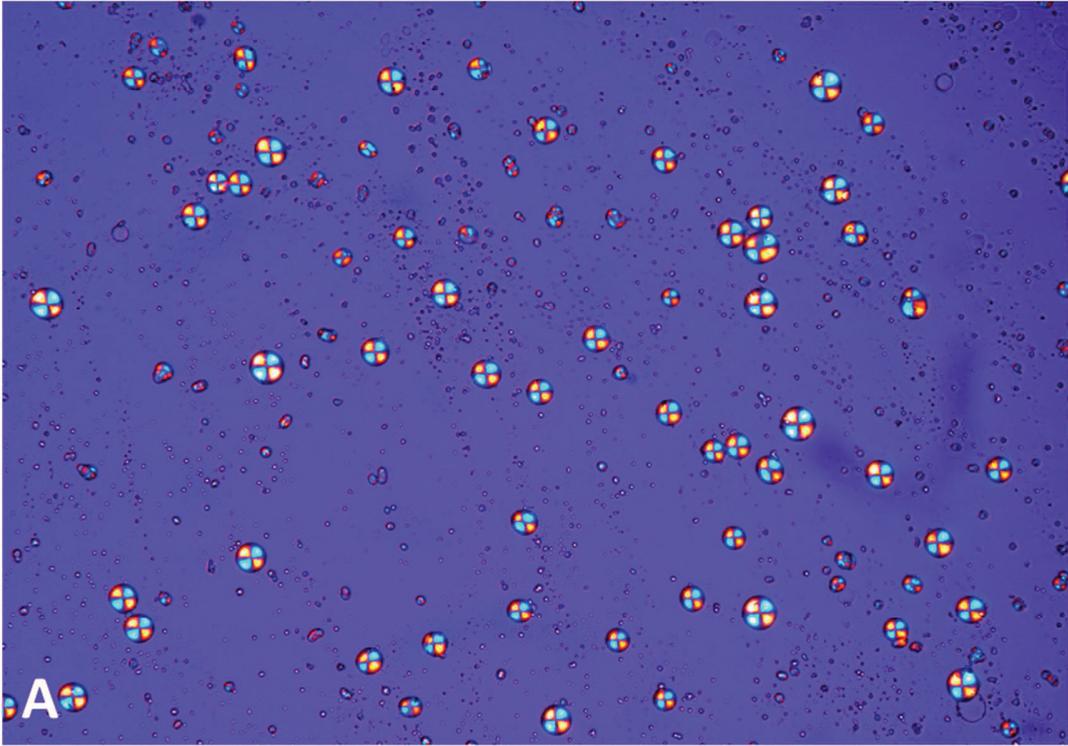
Surfactants	Chain length	Polar head (OE number)	CMC (g.L <sup>-1</sup> )	HLB	S binary	
PEG-20 stearate	C18		20	0.06	15.6	1
PEG-100 stearate	C18		100	0.13	18.9	0.4
PEG-25 hydrogenated castor oil	C18x3		25	0.13	11.8	0.6
Laureth-23	C12		23	0.22	17	0.4
Ceteth-10	C16		10	0.07	12.9	0.6
Steareth-100	C18		100	0.03	19	0.4
Oleth-20	C18:1		20	0.04	15.5	0.4
Beheneth-25	C22		25	0.13	15.4	0.5
Polyoxyethylene sorbitan laurate	C12		20	0.11	16.7	0.4
Polyoxyethylene sorbitan stearate	C18		20	0.071	14.9	1
Polyoxyethylene sorbitan oleate	C18:1		20	0.063	15	0.4
Sucrose laurate	C12			0.16	16	0.4
Sucrose stearate	C18			0.1	16	1
Sucrose oleate	C18:1			0.18	15	0.6
Sodium lauryl sulfate	C12			2	40	0.4
Sodium stearyl lactylate	C18				17	1
Distearyldimonium chloride	C18x2				10.5	0.6
Cetyl trimethylammonium chloride	C16			2.51	15.8	0.4

The CMC values ranged from 0.03 g.L<sup>-1</sup> for Steareth-100 to 2.51 g.L<sup>-1</sup> for CTAC, which is a wide range of two decades. The well-known variations of the CMC with respect to the chemical structure of the surfactants are found again [47]: ionic surfactants (SLS and CTAC) have higher CMC than the non-ionic ones; the CMC decreased as the carbon chain length increased;

The CMC increased when the polar head group volume increased (the CMC of PEG-100 stearate was twice that of PEG-20 stearate). The nature of the linkage between the polar group and the apolar chain also influenced the CMC: the CMC of PEG-100 stearate having an ester bond was higher than that of Steareth-100 having an ester bond.

In order to assess the order parameter  $S$  from the structure of the mesophase adjacent to the micellar phase in the water-surfactant binary phase diagram, the mesophases have been identified from polarizing optical microscope observations that typical pictures are given in Figure 3. Oily steaks and Maltese crosses indicated a lamellar mesophase ( $S = 0.6$ ), a cloudy texture indicated an hexagonal mesophase ( $S = 0.5$ ), an isotropic structure of a very viscous (semi-solid) sample indicated a cubic mesophase ( $S = 0.4$ ).

The choice of surfactants was also dictated by their ability to form and stabilize O/W emulsions, so their HLB is higher than 10, comprised between 10.5 for the cationic surfactant Distearyldimonium chloride, to 40 for the anionic surfactant SLS.



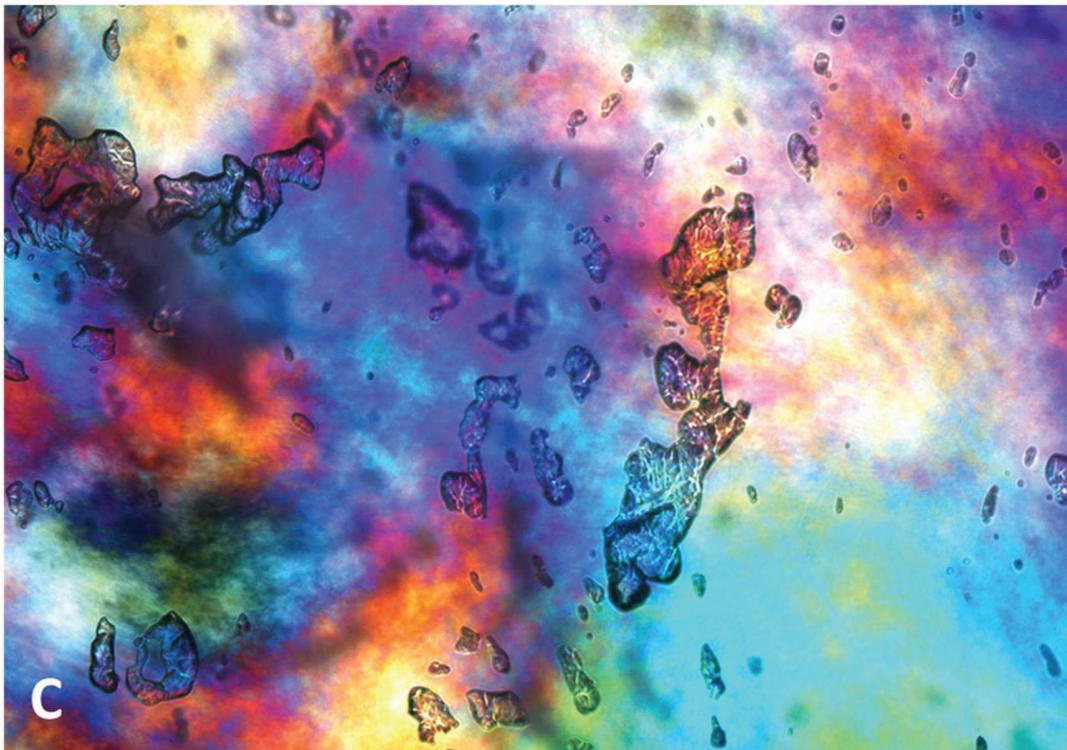


Figure 3. Sucrose oleate (30% in water, 25°C, magnification x10) lamellar phase with Maltese crosses (A); Ceteth-10 (70% in water, 25°C, magnification x10) lamellar structures with oily streaks (B); Beheneth-25 (60% in water, 25°C, magnification x10) hexagonal structure (C).

### 3.3. Emulsions and ternary phase diagrams

O/W emulsions of medium chain triglycerides were prepared with all surfactants according to the same emulsification process described in the “Materials and Methods” section and their droplet size distribution was measured (Table 3). Though the emulsification process was the same for all surfactants, the mean droplet sizes were very variable, ranging from 5 to 50  $\mu\text{m}$ . All the size distributions were also relatively broad (Span > 1), particularly when the PEG-25 hydrogenated castor oil was used as emulsifier (Span = 7 despite the small mean droplet size of 5.0  $\mu\text{m}$ ). The HLB of the non-ionic surfactants influenced the droplet size since  $d_{50}$  increased and Span decreased upon increasing the HLB.

Table 3. Physicochemical characteristics of ternary systems.

<b>Surfactants</b>	<b>d50 (µm)</b>	<b>Span</b>	<b>S ternary</b>
PEG-20 stearate	7.4	1.14	0.6
PEG-100 stearate	27.0	1.13	0.4
PEG-25 hydrogenated castor oil	5.0	7.11	0.4
Laureth-23	26.0	0.96	0.4
Ceteth-10	7.0	1.49	0.4
Steareth-100	50.0	0.99	0.4
Oleth-20	17.9	0.95	0.4
Beheneth-25	20.3	1.31	0.4
Polyoxyethylene sorbitan laurate	14.1	0.89	0.4
Polyoxyethylene sorbitan stearate	8.0	1.24	0.6
Polyoxyethylene sorbitan oleate	12.3	1.29	0.4
Sucrose laurate	9.5	0.95	0.4
Sucrose stearate	13.5	1.54	0.4
Sucrose oleate	12.3	1.29	0.4
Sodium lauryl sulfate	6.3	1.13	0.4
Sodium stearyl lactylate	8.5	1.76	1
Distearyldimonium chloride	28.9	1.59	1
Cetyl trimethylammonium chloride	8.2	0.86	0.4

The ternary phase diagrams were constructed by observing all ternary systems referred in Table 1 in polarized light microscopy. Structures were mainly micellar ( $S = 0.4$ ), some crystalline structures were also observed. Mean droplet sizes were not related to the order parameter.

### 3.4. Cytotoxicity

After exposure of RHE samples to O/W emulsions containing 20% of medium chain triglyceride oil and 3% of surfactant, the viability of the epidermal cells was assayed by the MTT and the LDH tests. The cell viability was expressed as the ratio of the flow cytometer reading of the skins exposed to emulsions to that of the control skin samples. If the surfactant in emulsion is not toxic, the ratio is close or equal to 1 for the MTT test showing the cell viability and close or equal to zero for the LDH test showing the membrane alteration (Figure 4A). As shown in Figure 4A, the range of the observed relative viability or membrane alteration was large; the smaller value for MTT was 0.05 for the most toxic SLS; the largest value was 1.12 for the mild surfactant PEG-100 stearate. Therefore, the viability experiments were highly sensitive to the type of surfactant. Three surfactants in emulsion were highly toxic: the presence of SLS, CTAC or Ceteth-10 resulted in the death of 80% to almost 100% of the cells. Furthermore, Ceteth-10 gave the

highest value for the LDH test at 10.3. Three other surfactants in emulsion induced viability lower than 50%: Laureth-23, Oleth-20 and Sucrose laurate. LDH and MTT tests led to the same conclusion concerning the skin toxicity of surfactants.

### 3.5. Inflammation

Inflammation markers have been released in the growth medium of the RHE as a consequence of the immune response to the presence of surfactants. Figure 4B shows the relative inflammation potency of the surfactants revealed by IL-1 $\alpha$  and IL-8 release. A value higher than 1 corresponds to a production of IL-1 $\alpha$  or IL-8 induced by the presence of the surfactant. The frequency distribution of the IL-1 $\alpha$  and IL-8 values was bimodal ; the threshold of significance was chosen as the Interleukin value corresponding to the minimum of frequency in between the two populations. Such threshold of significance was 3. Results are also highly variable, so that the data set was favorable for assessing structure-activity relationships. Indeed, some surfactants caused a very high IL-1 $\alpha$  production.

All PEG ethers in emulsion caused a large IL-1 $\alpha$  release from 3.1 to 90 times larger than the untreated RHE. The maximum was reached by Ceteth-10. Only one PEG ester (PEG-25 hydrogenated castor oil), one sucrose ester (Sucrose laurate), one anionic (SLS) and one cationic surfactant (CTAC) caused a noticeable IL-1 $\alpha$  release.

The same tendency was observed for IL-8 release, except for SLS which did not cause a high IL-8 release, certainly because SLS was responsible for a very rapid death of the cells avoiding IL-8 production. On the contrary, SSL caused only an important release of IL-8 (3.4 times larger than the untreated RHE) and no IL-1 $\alpha$  release.

The ratio IL-8/IL-1 $\alpha$  reported in Table 4, was lower than 1 for almost all surfactants. Among them 8 surfactants were responsible for a release of interleukins higher than the threshold of 3 times that of the control (Stearth-100, Ceteth-10, Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil, Oleth-20, Beheneth-25, SLS and CTAC). Only four surfactants yielded a ratio higher than 1: PEG-100 stearate, Poly(oxyethylene) sorbitan oleate, Sucrose laurate and Sodium stearyl lactylate. Sucrose laurate and SSL are the only ones which were responsible for a release of interleukins higher than the threshold of 3 times the control.

Table 4. IL-8/IL-1 $\alpha$  ratios for the different surfactants.

<b>Surfactants</b>	<b>IL-1<math>\alpha</math></b>	<b>IL-8</b>	<b>Ratio IL-8/IL-1<math>\alpha</math></b>
PEG-20 stearate	0.985	0.787	0.799
PEG-100 stearate	0.735	0.985	1.341
PEG-25 hydrogenated castor oil	<b>6.860</b>	<b>5.512</b>	0.804
Laureth-23	<b>3.105</b>	0.484	0.156
Ceteth-10	<b>90.400</b>	4.250	0.047
Steareth-100	<b>6.363</b>	<b>5.453</b>	0.857
Oleth-20	<b>34.359</b>	<b>3.111</b>	0.091
Beheneth-25	<b>24.592</b>	<b>11.502</b>	0.468
Polyoxyethylene sorbitan laurate	0.801	0.441	0.55
Polyoxyethylene sorbitan stearate	0.865	0.612	0.707
Polyoxyethylene sorbitan oleate	0.784	0.866	1.105
Sucrose laurate	<b>7.113</b>	<b>9.109</b>	<b>1.281</b>
Sucrose stearate	1.404	0.791	0.563
Sucrose oleate	1.073	0.948	0.883
Sodium lauryl sulfate	<b>22.121</b>	0.810	0.037
Sodium stearyl lactylate	0.582	<b>3.407</b>	<b>5.85</b>
Distearyldimonium chloride	1.242	0.648	0.522
Cetyl trimethylammonium chloride	<b>6.326</b>	0.172	0.027

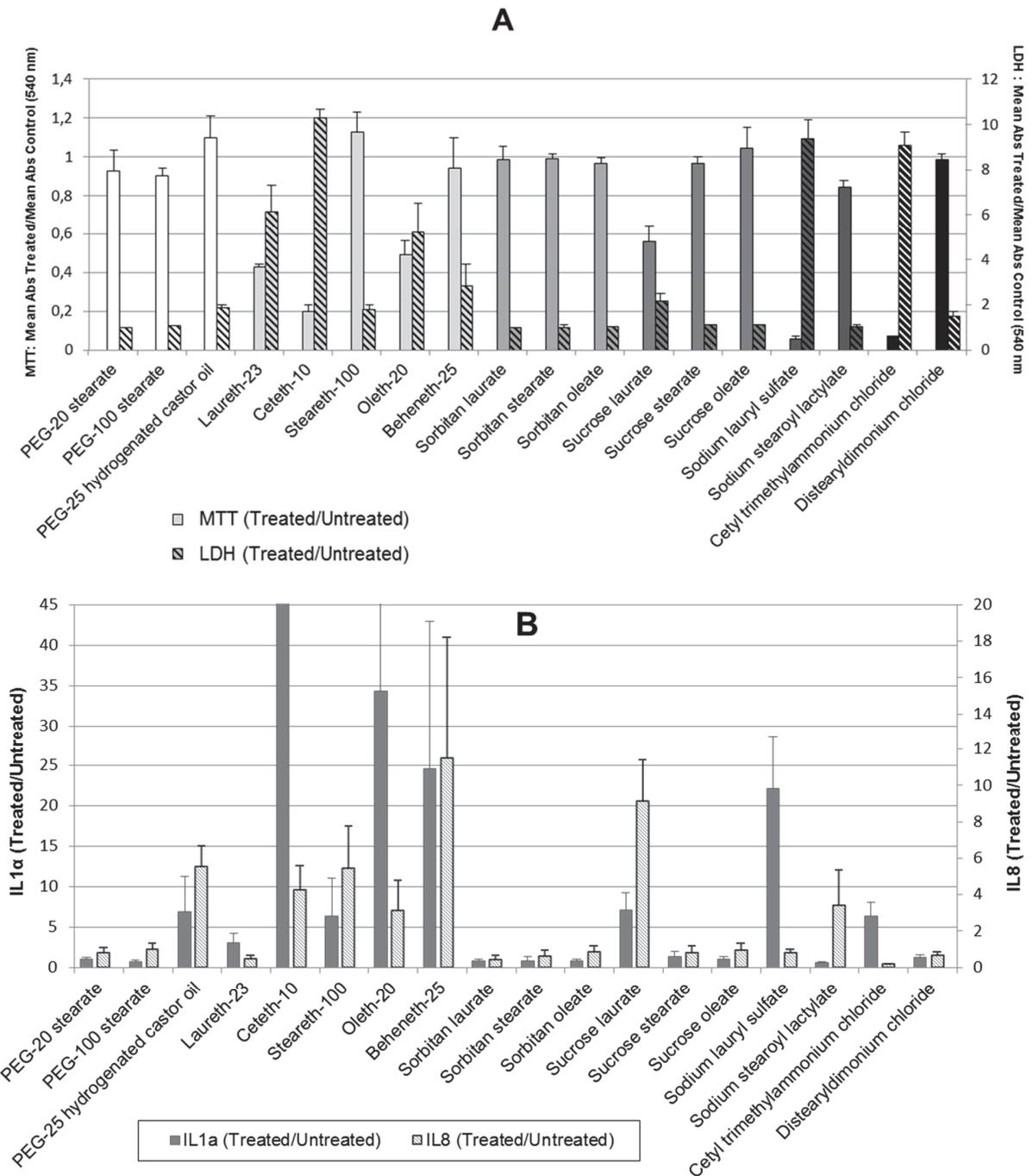


Figure 4. Influence of the type of surfactant on RHE viability (normal bars) or membrane alteration (hatched bars) (A) and extracellular release of IL-1 $\alpha$  (dark bars) and IL-8 (grey bars) (B). To a better visibility, a cut-off at 45 for IL-1 $\alpha$  was applied.

### 3.6. Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) has been performed by using the four cytotoxicity parameters (MTT, LDH, IL-1 $\alpha$  and IL-8) as initial variables. The two main principal components PC1 and PC2 were retained in order to obtain a reliable 2D representation of the surfactants' behavior which in turn may highlight similar or different cytotoxic profiles (Figure 5). PC1 and PC2 explained 61.1% and 28.6% of the variance, respectively. MTT and LDH variables appeared highly correlated; the orientations of their loading vectors pointed to opposite directions, which meant a negative correlation. Indeed both MTT and LDH are cell viability descriptors that rank the cytotoxicity in opposite ways. The MTT test titrates the formazan produced by cellular reductases [22], so that a high MTT figure indicates a low cytotoxicity. The LDH test measures the release of lactate dehydrogenase caused by an alteration of the cell membrane; a high LDH indicates a damage of the cell membrane that allowed enzymes to leak from the cytosol [27]. The IL-8 extracellular release variable was not correlated with MTT and LDH parameters, as its corresponding loading vector was nearly orthogonal to the others. PC1 is related to MTT, LDH and IL-1 $\alpha$  parameters while PC2 essentially reflects IL-8 extracellular release. There were actually three independent parameters out of the four since MTT and LDH were strongly correlated.

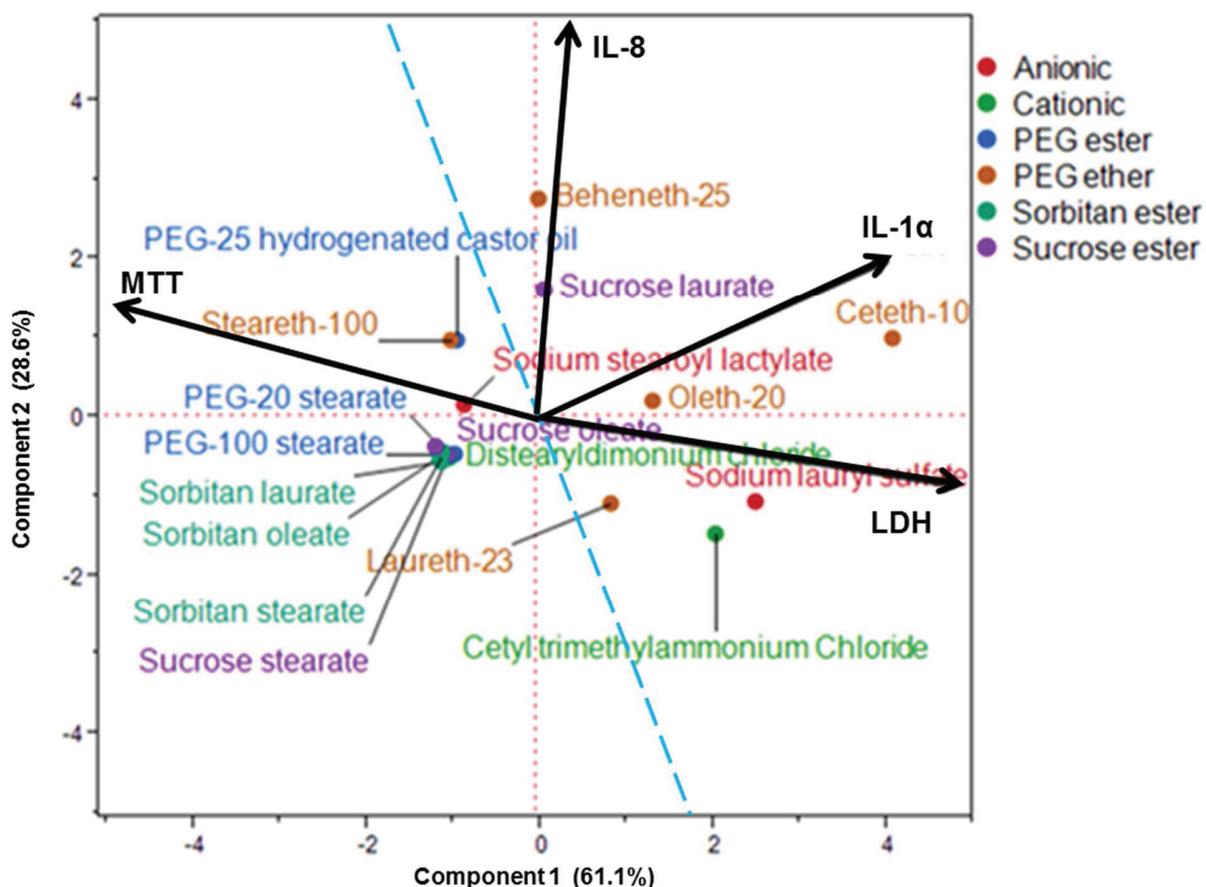


Figure 5. Score plot and loading vectors obtained by PCA of surfactant cytotoxicity profile using the two main principal components PC1 and PC2.

The PC1/PC2 score plot showed a cluster of surfactants having a low toxicity and a small group of seven surfactants responsible for low cell viability and for interleukin release. The latter group comprised two ionic surfactants (SLS and CTAC), a sucrose ester (Sucrose laurate) and four PEG ethers (Ceteth-10, Oleth-20, Laureth-23 and Beheneth-25). The blue dotted line separates two domains in Figure 5: surfactants considered as toxic and surfactants considered as mild.

To understand how different surfactants show such different behaviors, the relationship between surfactant physicochemical parameters and their cytotoxicity profiles was investigated using Pearson's correlation coefficient,  $R$ . As non-ionic and ionic surfactants have very different physicochemical properties, they were studied separately. The corresponding correlation matrices have been calculated. The critical value of Pearson's correlation coefficient above which  $R$  indicated a statistically significant correlation was 0.532 (for 95% confidence level and 12 degrees of freedom) for non-ionic surfactants and 0.95 (for 95% confidence level and 2 degrees of freedom) for ionic surfactants. As shown in the Table 5 pertaining to non-ionic

surfactants, there was no significant correlation between the descriptors of surfactant physicochemical properties and cytotoxicity for non-ionic surfactants. MTT and LDH were negatively correlated, as has already been inferred from the PCA. IL-1 $\alpha$  was also correlated with MTT and LDH, which was not obvious in the PCA. Some physicochemical parameters of the surfactants were correlated: HLB was correlated with d50 and negatively correlated with Span. Indeed, the HLB number has been introduced as an empirical parameter for the selection of the optimal non-ionic emulsifier. The order parameters of the binary and ternary phase diagrams were correlated, showing that they were intrinsic properties of the surfactants that were not influenced by the presence of oil.

Table 5. Correlation matrix between physicochemical parameters and cytotoxicity parameters for non-ionic surfactants. Correlation coefficients above the significance threshold  $R = 0.532$  are marked in grey.

	<i>Cytotoxicity parameters</i>				<i>Physicochemical parameters</i>					
	<i>MTT</i>	<i>LDH</i>	<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<i>IL-8</i>	<i>CMC</i>	<i>HLB</i>	<i>Span</i>	<i>d50</i>	<i>S binary</i>	<i>S ternary</i>
<i>MTT</i>	1									
<i>Cytotoxicity parameters</i>										
<i>LDH</i>	<b>-0.883</b>	1								
<i>IL-1<math>\alpha</math></i>	<b>-0.706</b>	<b>0.876</b>	1							
<i>IL-8</i>	-0.097	0.162	0.303	1						
<i>Physicochemical parameters</i>										
<i>CMC</i>	-0.135	0.018	-0.264	0.057	1					
<i>HLB</i>	0.162	-0.302	-0.428	-0.154	0.012	1				
<i>Span</i>	0.302	-0.094	-0.046	0.154	0.16	<b>-0.645</b>	1			
<i>d50</i>	0.233	-0.101	-0.209	0.037	0.028	<b>0.73</b>	-0.295	1		
<i>S binary</i>	0.241	-0.223	-0.103	-0.304	-0.225	-0.303	0.099	-0.433	1	
<i>S ternary</i>	0.192	-0.262	-0.206	-0.299	-0.316	-0.097	-0.122	-0.345	<b>0.737</b>	1

The correlation matrix of ionic surfactants is shown in Table 6. The CMC was not included because the anionic surfactant SSL and the cationic surfactant DC were not soluble in water; only two surfactants were remaining (SLS and CTAC). In contrast to non-ionic surfactants, there were correlations between physicochemical parameters and cytotoxicity. The order parameters in the ternary systems (emulsions) were correlated with MTT and negatively correlated with LDH. HLB was correlated with IL-1 $\alpha$  release; this result mostly indicated that SLS which has a very high HLB was responsible for a high IL-1 $\alpha$  release. Again MTT and LDH were negatively correlated and Span was correlated with the order parameter in the ternary phase diagram. At variance with non-ionic surfactants, HLB was not correlated with d50 and Span of the emulsions; indeed the HLB scale is known to give poor predictions of emulsion stability for ionic surfactants.

Table 6. Correlation matrix between physicochemical parameters and cytotoxic parameters for ionic surfactants. Correlation coefficients above the significance threshold  $R = 0.95$  are marked in grey.

		Cytotoxicity parameters				Physicochemical parameters				
		MTT	LDH	IL-1 $\alpha$	IL-8	HLB	Span	d50	S binary	S ternary
Cytotoxicity parameters	MTT	1								
	LDH	<b>-0.987</b>	1							
	IL-1 $\alpha$	-0.765	0.784	1						
	IL-8	0.511	-0.635	-0.372	1					
Physicochemical parameters	HLB	-0.653	0.636	<b>0.957</b>	-0.088	1				
	Span	0.921	-0.949	-0.563	0.754	-0.361	1			
	d50	0.709	-0.59	-0.502	-0.239	-0.601	0.441	1		
	S binary	0.742	-0.839	-0.641	0.943	-0.392	0.872	0.056	1	
	S ternary	<b>0.993</b>	<b>-0.999</b>	-0.766	0.609	-0.624	<b>0.95</b>	0.62	0.816	1

#### 4. Discussion

The descriptors that have already been used in previous works have also been used in the present study: the CMC, the alkyl chain length and the degree of ethoxylation of the polar head. The CMC is defined for water-soluble surfactants only, and the ethoxylation degree pertains to non-ionic surfactants only. Descriptors that apply to the full surfactant data set are needed.

The HLB number is one of them since its value is easily found in well-documented tables for all the most common surfactant molecules [42]. The predictive character of the HLB number is good when dealing with the stabilization of emulsions by non-ionic surfactants; it is often in failure for ionic surfactants and/or when it is applied to other applications than emulsions. The crystalline surfactants cannot be described correctly by the HLB number. Therefore, the HLB number was retained as a descriptor because of its universal bearing; but it may be of poor help in the present work because of its limitation as an empirical parameter devoted to emulsions.

One general property of surfactants is the curvature of the interface that they form as they self-assemble into supramolecular structures. It is difficult to get a quantitative account of this property. In particular, both the balanced surfactants and the crystalline surfactants self-assemble as flat interfaces (zero curvature) although they are definitely different. The order parameter of the surfactant molecules at an interface allows such a discriminative description.

Finally, since the toxicity behavior of surfactant in emulsions is affected by the presence of oil, and it is well-established that the properties of surfactants depend on the presence and the nature of oil, two supplementary descriptors of the properties of surfactants have been introduced: the size of oil-in-water emulsion droplets and the width of their size distribution assessed from light scattering measurements on emulsions prepared by the same standard emulsification process. The d50 was taken as the mean size of droplets and the Span =  $(d90 - d10)/d50$  was taken as a descriptor for the width of the size distribution.

#### 4.1. General discussion

The statistical analysis using PCA was an attempt to use the full data set of the surfactants characterized by the same descriptors. One remarkable outcome of the PCA is that surfactants can be split into two distinct classes which could be termed as the “mild surfactants” and the “irritant surfactants”. Indeed Figure 5 definitely shows two well-defined clusters of data points (separated by a blue dashed line in Figure 5).

For the structure-activity relationships, it turned out that the analysis should be split into two, one for ionic surfactants and the other for non-ionic surfactants, because the data set contained a much larger number of non-ionic surfactants and the information pertaining to ionic surfactants was hidden by the “noise” created by the larger number of non-ionic surfactants. The choice of the surfactant series has been made on the basis of the frequency of their utilization in cosmetic products where non-ionic surfactants indeed predominate. Such splitting of ionics and non-ionics did not allow the analysis of the influence of the type of surfactant on skin toxicity. Although a rigorous statistical analysis has never been done, it is well-established that ionic and non-ionic surfactants are very different and that ionic surfactants show stronger irritancy than non-ionics.

The outcomes of the statistical analysis might look disappointing because many trends that are felt visible, are below the statistical significance calculated by the correlation matrix. In particular the correlation matrix of non-ionic surfactants did not disclose correlations between toxicity data and surfactant descriptors. It is worth mentioning that this result conveys new useful information. Previous literature reports on structure-toxicity relationships disclosed such relationships because a unique series of homologous surfactants has been studied. In the present study, very different non-ionic surfactants, PEG ethers, PEG esters, sorbitan esters, and sucrose esters, were gathered together and such correlations were no longer visible. This is an apparent contradiction only. It is meaning that the conclusions reached from a specific series of homologous surfactants should not be taken as a general trend valid for all non-ionic surfactants.

The correlation matrix disclosed the relevance of the order parameter for ionic surfactants. Since the crystalline surfactants ( $S = 1$ ) were of very low solubility in water, a question is whether the crystalline state or the low solubility is the actual relevant parameter. The present surfactant series contains non-ionic surfactants that self-assemble as a solid crystalline phase ( $S = 1$ ) better than liquid crystalline mesophases, and that have a sufficient solubility in water for the CMC can be measured and a micellar solution can be observed in a wide enough concentration range. The correlation matrix of non-ionic surfactants did not reveal the same correlation

between toxicity and the order parameter as for ionic surfactants. It is however worth noticing that the correlation between skin toxicity and order parameter of ionic surfactants concerned the order parameter in the emulsion (water/oil/surfactant ternary system). The striking difference between ionic and non-ionic surfactant is that the ionic surfactants that are crystalline in the water/surfactant binary system remain crystalline in the ternary system, whereas the presence of oil as a third component turned the crystalline phase of binary water/non-ionic surfactants mixtures into liquid crystalline mesophases. There is no non-ionic surfactant having  $S = 1$  in the ternary system, so that the present data set does not allow a definite conclusion regarding the precise meaning the order parameter as a surfactant descriptor. The advantageous feature of  $S$  as a descriptor is the possibility of a description of the full surfactant series (ionic, non-ionic, crystalline) with a single parameter.

In the following, analysis of reduced series of surfactants have been done in order to draw more specific structure-activity relationships valid for limited data sets and have a comparison of the present data with earlier reports of the literature. Ionic and non-ionic surfactants are presented in two subsequent sections.

#### 4.2. Influence of physicochemical properties on skin toxicity: Ionic surfactants

As a first general outcome, SLS and CTAC appeared to have a high toxic effect on keratinocytes. Moreover, as their ratios IL-8/IL-1 $\alpha$  were lower than 1, and that they were responsible for a release of interleukins higher than the threshold of 3 times the control, they could be considered as irritant according to Coquette et al. [37]. This result was expected from previous studies showing that SLS and cationic surfactants like CTAC have irritant potency. It has been proposed on this basis that SLS could be used as a positive control for irritancy tests [23,38,39,48,49,50]. It has been demonstrated in several instances by *in vitro/in vivo* tests on skin that cationic surfactants were more toxic than anionic ones and that non-ionic surfactants were not toxic for the skin [4,16,17]. The irritant potency of ionic surfactants has been explained by their ability to bind to keratin and lead to membrane swelling. The presence of charges on the polar head of an ionic surfactant molecule may favor binding to proteins, in particular to keratin. The nature of the polar head group appeared as a significant factor governing the irritant potency [5,6]. Both anionic and cationic surfactants show irritancy because proteins have cationic and anionic aminoacids in their structure. Owing to the high isoelectric point of most proteins, their overall negative charge at physiological pH makes electrostatic interactions with cationic surfactants stronger than with anionics. A large volume of the polar head group limit the

electrostatic interactions with SC proteins as a result of steric hindrance that take the oppositely charged groups apart, thus resulting in a lower surfactant irritancy.

#### Structure-activity relationships

CMC values are another physicochemical parameter highlighted in the literature for its link with irritant potency. As the monomer is the active species, an increase of the CMC could be correlated to an increase of surfactant irritancy. To illustrate this fact, Corazza et al. presented results on skin irritancy of SLS, compared with a mixture of SLS and non-ionic surfactants. The mixture had a lower CMC than pure SLS, and also a lower irritating potency [9]. The results obtained with SLS and CTAC were in agreement with Corazza et al. as the CMC values for these two surfactants were at least 10 times higher than those of the others studied (Table 2). SSL and DC are not soluble in deionized water so their CMC values could not be determined in order to check against this conclusion. However, no significant correlation between CMC values and cytotoxicity could be established for the other non-ionic surfactants. Hence, it was necessary to define new parameters in order to explain the differences observed in cytotoxicity results for ionic surfactants. The order parameters were chosen as features of the surfactant behavior in binary and ternary phase systems. The binary phase diagrams show how surfactant molecules organize in water with respect to their concentration [51]: micellar solutions, cubic, hexagonal and lamellar mesophases, and crystalline. In a further study the surfactant behavior in ternary phase systems was studied by adding oil. Friberg [3] studied the behavior of an emulsion on skin after water evaporation using ternary diagrams. He explained the softness and the radiant aspect of a hydrated skin in terms of an anisotropic organization of the lipids of the SC in the liquid crystalline phase. However, nothing was mentioned as to the impact of this surfactant organization on the skin.

Most of the surfactants are arranged in micellar structures in ternary phase systems, although there are some crystalline structures formed using some ionic surfactants (Tables 3 and 7).

Table 7. Relationship between alkyl chain length of ionic surfactants and their organization in binary and ternary systems.

<b>Surfactants</b>	<b>Alkyl chain length</b>	<b>Crystalline phase in water</b>	<b>Crystalline phase in emulsion</b>
Sodium lauryl sulfate	12 carbons	Micellar solution (S = 0.4)	Micellar solution (S = 0.4)
Sodium stearyl lactylate	18 carbons	Crystallized phase (S = 1)	Crystallized phase (S = 1)
Distearyldimonium chloride	18 carbons	Lamellar phase (S = 0.6)	Crystallized phase (S = 1)
Cetyl trimethylammonium chloride	16 carbons	Micellar solution (S = 0.4)	Micellar solution (S = 0.4)

The order parameters were calculated to quantify these organizations. The apolar chain length of a surfactant appears to have an impact on its organization in water and in an emulsion. When

the chain is short (12 carbons for SLS or 16 carbons for CTAC) the surfactant is less organized, forming only micellar solutions. SSL and DC, with longer hydrophobic tails (both having 18 carbons) form organized phases such as lamellar and crystalline. A strong correlation was observed between the order parameters and the cell viability, showing that the more organized the surfactant is in water and in an emulsion, the less toxic it is. In fact the better tolerated surfactants were mainly organized in crystalline structures. This organization could also explain the differences observed in the toxicity of ionic surfactants. SSL and DC, were not toxic according to the cytotoxicity results, both have a crystalline organization in solution and in an emulsion ( $S = 1$ ) as opposed to SLS and CTAC which were organized in micellar structures. It seems that the crystalline structure hinders the interaction with skin proteins or lipids, resulting in low toxicity. However, from a formulation point of view, this crystalline organization resulted in heterogeneous emulsions.

However, our results appear to contradict previous studies as two other ionic surfactants, the anionic SSL and the cationic DC, appeared to be non-toxic, particularly clearly shown when giving consideration to cell viability and interleukin releases. It can therefore be assumed that the charges on the polar head group are not systematically responsible for skin cytotoxicity and that the ionic/non-ionic nature is not a key parameter in an explanation of cytotoxicity potency. The cytotoxicity results for anionic surfactants showed that SLS was responsible for a high mortality (5% of viable cells compared to the control) and a high extracellular release of IL-1 $\alpha$ . The IL-8 release was low (IL-8/IL-1 $\alpha$  = 0.037). On the contrary, the other anionic surfactant, SSL, did not alter the viability (85% of viable cells); it neither produced IL-1 $\alpha$  release but resulted in a high IL-8 release (IL-8/IL-1 $\alpha$  = 5.85). There were also some inconsistency between the cationic surfactants results: CTAC caused a high mortality (7% relative viability), and a significant IL-1 $\alpha$  release whereas DC resulted in a very high viability (99%). None of them induced a high IL-8 release.

#### 4.3. Influence of physicochemical properties on skin toxicity: Non-ionic surfactants

A large number of non-ionic surfactants were included in the present study. This is a somewhat new approach as the previous studies reported in the literature has been generally focused on the toxicity of ionic surfactants, in comparison with one non-ionic surfactant taken as a reference for mildness [4,52]. Further studies on non-ionic surfactants were generally considered useless because they were thought non-toxic. At variance with this point of view, the present results showed that some of the non-ionic surfactants were actually more toxic than some ionic

surfactants. In our study, Ceteth-10 and Laureth-23 resulted in very low cell viability. Though PEG ethers are considered non-toxic, it appeared that they have a similar level of toxicity as the most toxic ionic surfactants. All PEG ethers caused high IL-1 $\alpha$  and/or IL-8 release; beheneth-25 produced the highest IL-8 release of all surfactants.

Non-ionic surfactants are also known to be potential penetration enhancers due to their interaction with the SC resulting in an alteration of the barrier function of the skin. According to the literature, these interactions depend on the chemical structure of the surfactant, and especially its alkyl chain length, and the nature of the chemical bond between its polar head and apolar chains. Moreover, the size and the charges of the polar head are generally cited as influential parameters [5]. In their study of the penetration enhancement potential of sucrose esters, Ayala et al. [53] showed that a sucrose ester with a linear C12 chain was the best absorption enhancer when compared with other sucrose esters with longer chains. As surfactants with a C12-C14 alkyl chain have also higher irritant and wetting properties, it would seem that the alteration of the skin barrier leading to a higher permeability can also be related to higher skin toxicity. This result is in accordance with a study by Cázares-Delgadillo et al. [54] who reported that a sucrose ester with a 12 carbon chain was more efficient in penetrating an ionized form of lidocaine than a C18-1 alkyl chain. However the opposite effect was observed for the penetration of non-ionized lidocaine. The nature of the molecule tested in permeability experiments certainly impacts on penetration enhancer efficiency. Walters et al. [55] reached the same conclusion using PEG ethers. They showed that the highest penetration of methyl nicotinate and nicotinic acid was obtained with Laureth-10 whereas that of ibuprofen was optimum for Oleth-2. However, the similar effect of using a C12 alkyl chain length was shown by French and Pouton [56], who obtained a maximum fluidizing of lipid bilayers using surfactants in the range C12E3-C12E5. Bárány et al. [1] studied the influence of PEG ether and PEG ester surfactant formulated in an emulsion on the skin barrier *in vivo*. Their results showed that the TEWL values (a sensitive measure of barrier damage) significantly increased for five emulsifiers (PEG-9 stearate, PEG-2 stearate, Steareth-2, Steareth-21 and Steareth-10) but with no corresponding increase in blood flow. In their work no correlation was found to exist between the TEWL and blood flow values, indicating skin barrier impairment without an inflammatory response. The authors explained that this damage did not manifest itself as redness or increased skin blood flow, but that it could increase the bioavailability of other substances due to fluidization or removal of lipid components of the SC [2]. Skin lipids removal was not studied in the present work but it is intended that it will be investigated in a further study. By comparing PEG ethers and PEG esters, the influence of the nature of the chemical bond between the head

group and the alkyl chain has been shown. In our study, the results revealed that PEG ethers were more toxic than PEG esters especially with regard to MTT and, in particular, Laureth-23, Ceteth-10 and Oleth-20 were responsible for cell mortality twice as high as for PEG esters used at the same concentration. Hofland et al. [57] reached the same conclusion using another method with surfactant vesicles and cultured keratinocytes. They studied the influence of alkyl chain length and the nature of the chemical bond between the polar head group and the alkyl chain on the proliferation of keratinocytes. Using PEO ether surfactants with different chain lengths, they showed that the alkyl chain length had a minor effect on the keratinocytes proliferation. The comparison of Oleyl-EO5 ester and Oleyl-EO5 ether showed the strong influence of the nature of the bond formed. The concentration of the ether surfactant that inhibited cell proliferation by 50% was 10-fold lower than that for the ester surfactants (Hofland et al., 1991). Park et al. [58] showed, using a series of PEO ether surfactants, that the ratio of chain length to polar head group volume was the most important parameter for permeation enhancer potency. They found by measuring the penetration of ibuprofen in rat skin, that for a certain C12 chain length with a varying number of PEO, 6 EO and 3 EO were the most efficient, but the use of 25 EO and 40 EO did not result in any penetration enhancement. In our results, PEG-20 stearate and PEG-100 stearate showed the same behavior on the skin. This can be related to the volume of the polar head which was large in both cases (> 20 EO) so that its effect on the lipid bilayer would be low whereas the use of a stearate with short length PEG would lead to other results.

Several investigations have studied the influence that alkyl chain length, and the presence or absence of unsaturation on the chain, has on the irritant potency of surfactants. The conclusions indicate that surfactants with a C12-C14 alkyl chain have higher irritant and wetting properties than those with longer or shorter alkyl chains. The presence of unsaturation in an alkyl chain appears to have no influence on these properties [4,21,59]. However, these conclusions were obtained using only anionic surfactants. In our research, the influence of chain length was studied using poly(oxyethylene) sorbitan esters, the alkyl chain length varying from C12 to C18. This variation had no impact on cytotoxicity; both cell viability and interleukin release being almost identical in every experiment. Neither did the presence of unsaturation in the oleic chain indicated by the use of Poly(oxyethylene) sorbitan oleate which did not affect the cytotoxicity results. Poly(oxyethylene) sorbitan esters appear to be mild, as they did not induce high cell mortality (> 50%) nor produced an important release of IL-1 $\alpha$  and IL-8 (> 5 times/untreated RHE). For sucrose esters, the carbon chain length seems to influence the toxicity. The relative toxicity of Sucrose laurate was indicated by medium cell viability (56%) and high IL-8 release. As

sucrose laurate is the only one which responsible for a release of interleukins higher than the threshold of 5 times compare to the control and yield a ratio IL-8/IL-1 $\alpha$  higher than one, it can therefore be deduced that this surfactant had a sensitizing effect. According to Coquette et al. [37], in contrast, the other sucrose esters did not induce any toxicity, as had already been reported by Desai and Lowicki [60].

All these structure/activity relationships have, in the main, been based on the fact that the entity responsible for irritancy and for barrier disruption was the surfactant monomer, which can easily penetrate the skin and bind to proteins. Therefore, if a surfactant has a low CMC value, the monomer concentration in solution is low, and its irritant potency is decreased. The impact of CMC values on irritant potency has been widely studied though mostly with ionic surfactants [4,5,9,18,52,61]. However, micelles can also contribute to skin toxicity since they can solubilize the lipids of the SC, disturbing the barrier and favoring binding to proteins and/or lipids [62]. The concomitant action of two phenomena involving monomers and micelles deserves a closer discussion of the influence of the CMC. From our results, the correlation matrix for non-ionic surfactants showed that CMC had no impact on the cytotoxicity of the surfactant. So the CMC is not considered as a key factor in explaining the differences in toxicity among non-ionic surfactants.

## 5. Conclusion

Although there have been a large body of literature addressing the irritancy properties of surfactants, a definite view over the topic is far to be reached. Structure-activity relationships are also not established on solid grounds. This is in part due to the high complexity of the several phenomena, washing of SC lipids by detergency, fluidization of SC lipids by a penetration enhancer action, interactions with proteins of corneocytes. Each type of action depends of different molecular parameters of the surfactants. Another origin of the difficult assessment of surfactant toxicity is the lack of general studies including a large collection of surfactants of various types, combined with the lack of universal molecular descriptors alid for ionic and non-ionic surfactants, for water-soluble and crystalline surfactants. The present study has been aimed at filling this gap through an evaluation of several skin toxicity markers for a large number of various surfactants. This required the implementation of a PCA as a statistical tools and the definition of universal molecular descriptors. Two new physicochemical parameters (the order parameters in binary and ternary systems) were determined in order to attempt to explain the cytotoxicity of surfactants.

As a main outcome of this study, the PCA allowed sorting the surfactants into two well-separated categories that can be called as "mild" and "irritant". The general statement of non-ionic surfactant mildness was questioned, showing that the charge on the polar head group of the ionic surfactant was not the only parameter to be considered. The impact of the chemical linkage between the polar head group and the alkyl chain has been highlighted. Some previous physicochemical parameters used to describe irritancy mechanisms of the skin such as CMC, were shown not relevant for non-ionic surfactants.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Johnson & Johnson for their financial support. We are grateful to Pierre Lantéri and Yohann Clément for their help with the statistical analyses. We would also like to thank Hélène Wong and José Serrano for their collaboration to this project.

### **References**

- [1] Bárány, E., Lindberg, M., Lodén, M., 2000. Unexpected skin barrier influence from non-ionic emulsifiers. *Int. J. Pharm.* 195, 189-195.
- [2] Imokawa, G., 1997. Surfactant mildness, in: Rieger, M. M., Rhein, L. D., (Eds), *Surfactants in Cosmetics. Surfactant science series*, Marcel Dekker, New York, pp. 427-471.
- [3] Friberg, S. E., 1990. Micelles, microemulsions, liquid crystals, and the structure of stratum corneum lipids. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 41, 155-171.
- [4] Effendy, I., Maibach, H. I., 1995. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis.* 33, 217-225.
- [5] Ananthapadmanabhan, K. P., Moore, D. J., Subramanyan, K., Misra, M., Meyer, F., 2004. Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatol. Ther.* 17, 16-25.
- [6] Faucher, J. A., Goddard, E. D., 1978. Interaction of keratinous substrates with sodium lauryl sulfate: I. Sorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 29, 323-337.
- [7] Abraham, W., 1997. Surfactant effects on skin barrier, in: Rieger, M. M., Rhein, L. D. (Eds), *Surfactants in Cosmetics. Surfactant Science Series*, Marcel Dekker, New York, pp. 473-487.
- [8] Frujtier-Pölloth, C., 2005. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology* 214, 1-38.
- [9] Corazza, M., Lauriola, M. M., Zappaterra, M., Bianchi, A., Virgili, A., 2010. Surfactants, skin cleansing protagonists. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 24, 1-6.

- [10] Tupker, R. A., Bunte, E. E., Fidler, V., Wlechers, J. W., Coenraads, P. J., 1999. Irritancy ranking of anionic detergents using one-time occlusive, repeated occlusive and repeated open tests. *Contact Dermatitis* 40, 316-322.
- [11] Directive, E. C., 1994. 93/35/EEC of 14 June, 1993 amending for the 6th time Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Off. J. Eur. Comm. L.* 151, 32-36.
- [12] Ponc, M., Boelsma, E., Gibbs, S., Mommaas, M., 2004. Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol. Physiol.* 15, 4-17.
- [13] Commission Regulation (EU) No 640/2012 of 6 July 2012 amending, for the purpose of its adaptation to technical progress, Regulation (EC) No 440/2008 laying down test methods pursuant to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). *Official Journal L193*, 20/07/2012, p. 17.
- [14] Ponc, M., Gibbs, S., Pilgram, G., Boelsma, E., Koerten, H., Bouwstra, J., Mommaas, M., 2001. Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* 14, 63-71.
- [15] Schmook, F. P., Meingassner, J. G., Billich, A., 2001. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* 215, 51-56.
- [16] Lansdown, A. B. G., Grasso, P., 1972. Physico-chemical factors influencing epidermal damage by surface active agents. *Br. J. Dermatol.* 86, 361-378.
- [17] Korting, H. C., Herzinger, T., Hartinger, A., Kerscher, M., Angerpointner, T., Maibach, H. I., 1994. Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *J. Dermatol. Sci.* 7, 119-129.
- [18] Hall-Manning, T. J., Holland, G. H., Rennie, G., Revell, P., Hines, J., Barratt, M. D., Basketter, D. A., 1998. Skin irritation potential of mixed surfactant systems. *Food Chem. Toxicol.* 36, 233-238.
- [19] Tupker, R. A., Willis, C., Berardksca, E., Lee, C. H., Fartasch, M., Atinrat, T., Serup, J., 1997. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. *Contact Dermatitis* 37, 53-69.
- [20] Wilhelm, K. P., Freitag, G., Wolff, H. H., 1994. Surfactant-induced skin irritation and skin repair: Evaluation of the acute human irritation model by noninvasive techniques. *J. Am. Acad. Dermatol.* 30, 944-949.

- [21] Wilhelm, K. P., Samblebe, M., Siegers, C. P., 1994. Quantitative in vitro assessment of N-alkyl sulphate-induced cytotoxicity in human keratinocytes (HaCaT). Comparison with in vivo human irritation tests. *Br. J. Dermatol.* 130, 18-23.
- [22] Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- [23] Kobiela, T., Lelen-Kaminska, K., Stepulak, M., Lekka, M., Malejczyk, M., Arct, J., Majewski, S., 2013. The influence of surfactants and hydrolyzed proteins on keratinocytes viability and elasticity. *Skin Res. Technol.* 19, 200-208.
- [24] Tornier, C., Roquet, M., de Brugerolle de Fraissinette, A., 2010. Adaptation of the validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) skin corrosion test method to 0.5 cm<sup>2</sup> tissue sample. *Toxicol. In Vitro* 24, 1379-1385.
- [25] Bigliardi, P. L., Herron, M. J., Nelson, R. D., Dahl, M. V., 1994. Effects of detergents on proliferation and metabolism of human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 3, 89-94.
- [26] Gay, R., Swiderek, M., Nelson, D., Ernesti, A., 1992. The living skin equivalent as a model in vitro for ranking the toxic potential of dermal irritants. *Toxicol. In Vitro* 6, 303-315.
- [27] Decker, T., Lohmann-Matthes, M. L., 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods* 115, 61-69.
- [28] Faller, C., Bracher, M., 2004. Reconstructed skin kits: reproducibility of cutaneous irritancy testing. *Skin Pharmacol. Physiol.* 15, 74-91.
- [29] Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L. J. M., Roeck-Holtzhauer, Y. D., 1999. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J. Appl. Toxicol.* 19, 163-165.
- [30] Osborne, R., Perkins, M. A., 1994. An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food Chem. Toxicol.* 32, 133-142.
- [31] Welss, T., Basketter, D. A., Schröder, K. R., 2004. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.
- [32] Müller-Decker, K., Fürstenberger, G., Marks, F., 1994. Keratinocyte-derived proinflammatory key mediators and cell viability as in vitro parameters of irritancy: A possible alternative to the Draize skin irritation test. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 127, 99-108.
- OECD, 2010, Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.

- [33] Coquette, A., Berna, N., Poumay, Y., Pittelkow, M. R., 2000. The keratinocyte in cutaneous irritation and sensitization, in: Kydonieus, A. F., Wille, J. J. (Eds), Biochemical modulation of skin reaction. CRC Press, New York, pp. 125-143.
- [34] Dinarello, C. A., 1998. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* 16, 457-499.
- [35] Baggiolini, M., Loetscher, P., Moser, B., 1995. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.* 17, 103-108.
- [36] Mohamadzadeh, M., Müller, M., Hultsch, T., Enk, A., Saloga, J., Knop, J., 1994. Enhanced expression of IL-8 in normal human keratinocytes and human keratinocyte cell line HaCaT in vitro after stimulation with contact sensitizers, tolerogens and irritants. *Exp. Dermatol.* 3, 298-303.
- [37] Coquette, A., Berna, N., Vandebosch, A., Rosdy, M., De Wever, B., Poumay, Y., 2003. Analysis of interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and interleukin-8 (IL-8) expression and release in in vitro reconstructed human epidermis for the prediction of in vivo skin irritation and/or sensitization. *Toxicol. In Vitro* 17, 311-321.
- [38] Jongh, C. M., Jakasa, I., Verberk, M. M., Kezic, S., 2006. Variation in barrier impairment and inflammation of human skin as determined by sodium lauryl sulphate penetration rate. *Br. J. Dermatol.* 154, 651-657.
- [39] Perkins, M. A., Osterhues, M. A., Farage, M. A., Robinson, M. K., 2001. A noninvasive method to assess skin irritation and compromised skin conditions using simple tape adsorption of molecular markers of inflammation. *Skin Res. Technol.* 7, 227-237.
- [40] Griffin, W. C., 1955. Calculation of HLB values of nonionic surfactants. *Am. Perfumer. Essent. Oil. Rev.* 65, 26-29.
- [41] Berridge, M. V. and Tan, A. S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474-482.
- [42] Shinoda, K., Kunieda, H., 1983. Phase properties of emulsions: PIT and HLB, in: Becher, P., (Éd.), *Encyclopedia of emulsion technology*. Marcel Dekker, New York, Vol 1, Chap 5, pp 337-367.
- [43] de Gennes, P. G., Prost, J., 1993. *The physics of liquid crystals*, 2<sup>nd</sup> Ed, Clarendon Press, Oxford, pp. 41-59.
- [44] Gruen, D. W. R., 1985. The standard picture of ionic micelles. *Prog. Colloid Polym. Sci.* 70, 6-16.

- [45] Edholm, O., 1982. Order parameters in hydrocarbon chains. *Chem. Phys.* 65, 259-270.
- [46] Ben-Shaul, A., Gelbart, W. M., 1985. Theory of chain packing in amphiphilic aggregates. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 36, 179-211.
- [47] Lindman, B., Wennerström H., 1980. Micelles. Amphiphile aggregation in aqueous solution. *Top. Curr. Chem.* 87, 1-83.
- [48] Wigger-Alberti, W., Krebs, A., Elsner, P., 2000. Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application. *Br. J. Dermatol.* 143, 551-556.
- [49] Judge, M. R., Griffiths, H. A., Basketter, D. A., Whitte, I. R., Rycroft, R. J. G., McFadden, J. P., 1996. Variation in response of human skin to irritant challenge. *Contact Dermatitis* 34, 115-117.
- [50] Fulmer, A. W., Kramer, G. J., 1986. Stratum corneum lipid abnormalities in surfactant-induced dry scaly skin. *J. Invest. Dermatol.* 86, 598-602.
- [51] Mitchell, D. J., Tiddy, G. J., Waring, L., Bostock, T., McDonald, M. P., 1983. Phase behaviour of polyoxyethylene surfactants with water. Mesophase structures and partial miscibility (cloud points). *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1*, 79, 975-1000.
- [52] Rhein, L. D., 1997. In vitro interactions: biochemical and biophysical effects of surfactants on skin, in: Rieger, M. M., Rhein, L. D., (Eds), *Surfactants in Cosmetics*. Surfactant Science Series. Marcel Dekker, New York, pp. 397-425.
- [53] Ayala-Bravo, H. A., Quintanar-Guerrero, D., Naik, A., Kalia, Y. N., Cornejo-Bravo, J. M., Ganem-Quintanar, A., 2003. Effects of sucrose oleate and sucrose laureate on in vivo human stratum corneum permeability. *Pharm. Res.* 20, 1267-1273.
- [54] Cázares-Delgadillo, J., Naik, A., Kalia, Y. N., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., 2005. Skin permeation enhancement by sucrose esters: A pH-dependent phenomenon. *Int. J. Pharm.* 297, 204-212.
- [55] Walters, K. A., Bialik, W., Brain, K. R., 1993. The effects of surfactants on penetration across the skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* 15, 260-270.
- [56] French, E. J., Pouton, C. W., 1991. Nonionic surfactants as penetration enhancers: Correlation to lipid bilayer fluidity. In: *Prediction of Percutaneous Penetration 2* (Scott, R.C., Guy, R.H., Hadgraft, J., Boddé, H.E., (Eds), IBC Technical Services, London, pp. 183-200.
- [57] Hofland, H. E. J., Bouwstra, J. A., Ponec, M., Bodde, H. E., Spies, F., Verhoef, J., Junginger, H. E., 1991. Interactions of nonionic surfactant vesicles with cultured keratinocytes and human skin in vitro: a survey of toxicological aspects and ultrastructural changes in stratum corneum. *J. Control. Release* 16, 155-167.

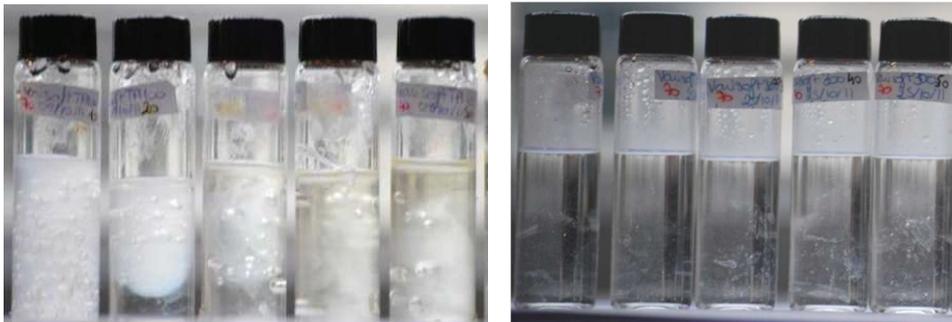
- [58] Park, E. S., Chang, S. Y., Hahn, M., Chi, S. C., 2000. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* 209, 109-119.
- [59] Kotani, M., Masamoto, Y., Watanabe, M., 1994. An alternative study of the skin irritant effect of an homologous series of surfactants. *Toxicol. In Vitro* 8, 229-233.
- [60] Desai, N. B., Lowicki, N., 1985. New sucrose esters and their applications in cosmetics. *Cosmet. Toiletries* 100, 55-59.
- [61] Froebe, C. L., Simion, F. A., Rhein, L. D., Cagan, R. H., Kligman, A., 1990. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatology* 181, 277-283.
- [62] Ananthapadmanabhan, K. P., Yu, K. K., Meyers, C. L., Aronson, M. P., 1996. Binding of surfactants to stratum corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 47, 185-200.

## Résultats complémentaires

### *Organisation des tensioactifs en phase aqueuse ou en émulsion*

Des diagrammes de phase binaire (eau/tensioactif) et ternaire (eau/huile/tensioactif) ont été réalisés pour l'ensemble des 38 tensioactifs. Pour chaque diagramme, une valeur du paramètre d'ordre  $S$  a été attribuée en tenant compte de la première phase organisée rencontrée à la plus faible concentration en tensioactifs, afin de quantifier l'organisation des tensioactifs dans l'eau ou en émulsion.

- 1) L'observation des flacons composant les diagrammes se fait dans un premier temps à l'œil nu. On peut déjà remarquer des différences de phase, comme dans l'exemple ici entre les deux cationiques, le Varisoft TA100 (Distearyldimmonium chloride) et le Varisoft 300 (CTAC). (Figure1)



*Figure1. Exemple de diagrammes binaires observés à l'œil nu.*

- 2) Puis les flacons sont placés entre des polariseurs croisés qui permettent de différencier des phases micellaires ou cubiques isotrope, qui vont être opaques et des phases plus organisées comme des phases hexagonales ou lamellaires anisotropes et biréfringentes qui vont briller entre polariseurs croisés (Figure 2)

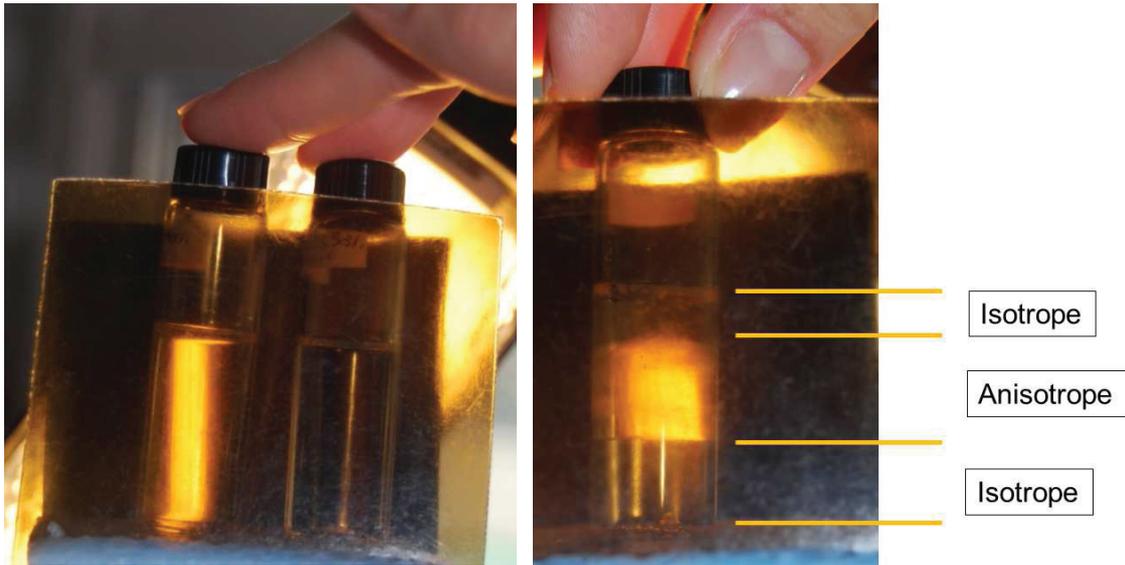


Figure 2. Exemple de diagrammes binaires observés entre polariseurs croisés.

- 3) Enfin pour avoir confirmation de la nature des phases, une observation au microscope optique avec un système de polarisation est effectuée, des composants caractéristiques des phases sont alors distingués comme expliqué précédemment.

Les résultats suite à l'observation des diagrammes binaires et ternaires à 70°C et 25°C sont représentés en Annexe 7. On constate une grande variabilité d'organisation entre les différents tensioactifs allant de la phase micellaire isotrope à une phase cristalline très organisée. Les résultats manquants pour les diagrammes ternaires à 70°C de certains tensioactifs sont dû au fait que ces derniers, sensibles à la chaleur ont été dégradés avant que le système ait atteint son équilibre.

### **Toxicité cutanée**

La toxicité cutanée de l'ensemble des 38 tensioactifs a été déterminée à travers les méthodes d'évaluation de la viabilité cellulaire, de l'altération de la membrane cellulaire et de la libération de marqueurs d'inflammation immédiate ou retardée comme celles présentées précédemment.

### **Viabilité cellulaire**

Les résultats des tests MTT et LDH sur l'ensemble des tensioactifs, classés par famille, sont présentés sur la Figure 3. La ligne noire représente la valeur seuil en dessous de laquelle pour le MTT ou au-dessus de laquelle pour le LDH, les tensioactifs sont responsables de 50% de dommages cellulaires ou plus.

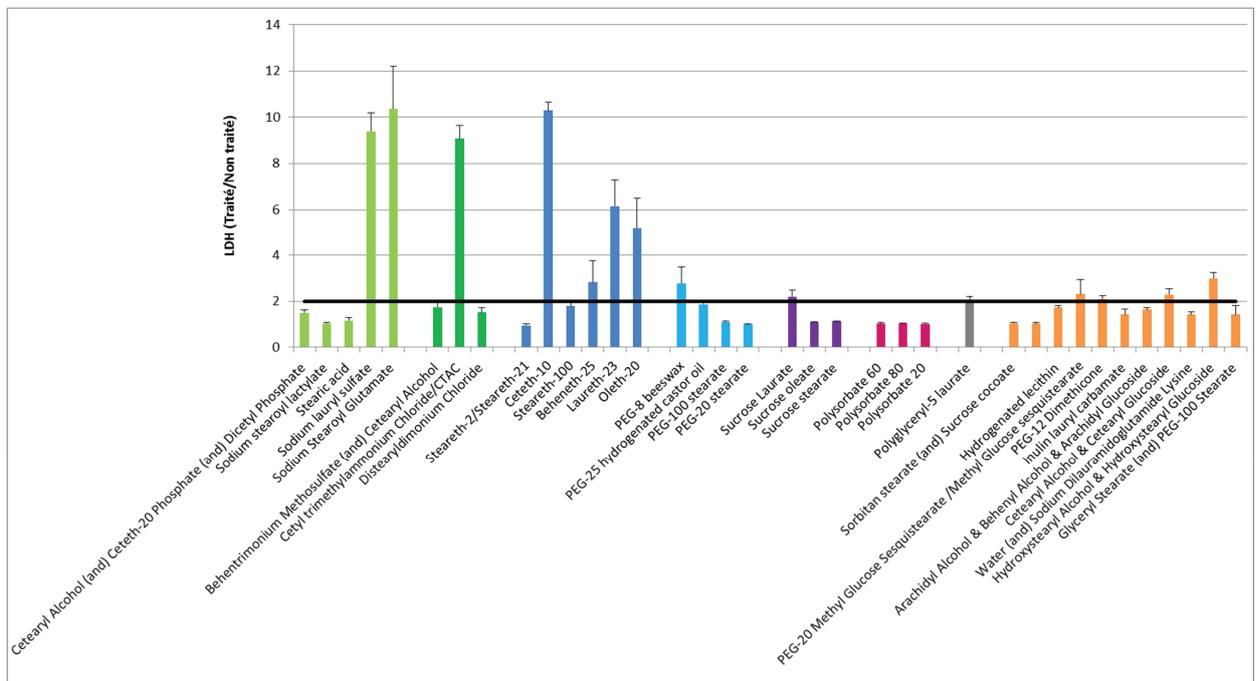
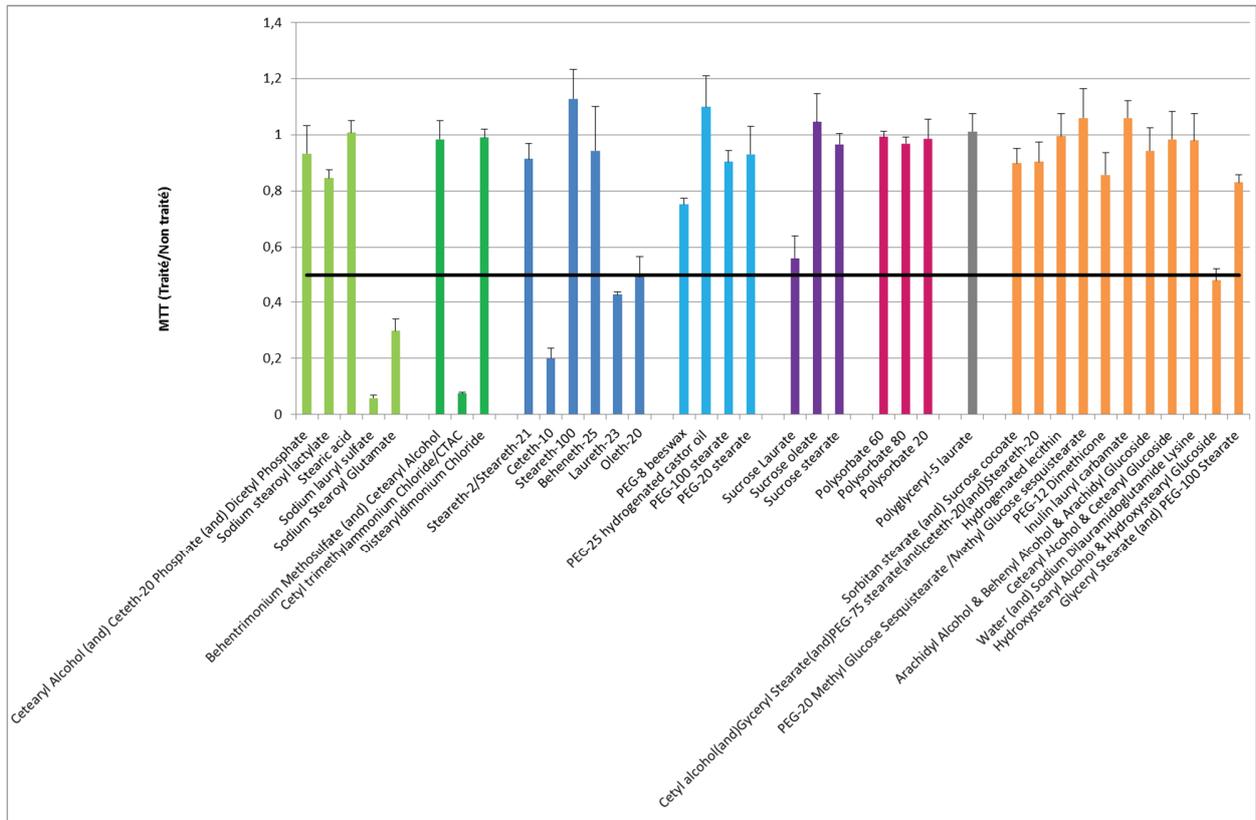


Figure 3. Résultats des tests de viabilité cellulaire et d'altération membranaire pour les 38 tensioactifs testés

On remarque là aussi que les résultats de MTT et LDH sont corrélés négativement.

Sur les 38 tensioactifs étudiés, 6 sont responsables de plus de 50% de dommages cellulaires, au regard du test MTT et LDH :

- Varisoft 300 Cetyl trimethylammonium Chloride
- Texapon K12 Sodium lauryl sulfate
- Eumulgin SG Sodium stearyl glutamate
- Lipocol L23 Laureth-23
- Lipocol O20 Oleth-20
- Brij C10 Ceteth-10

La famille de tensioactifs contenant le plus d'individus cytotoxique est celle des éthers de PEG, malgré leur valeur de CMC faibles (§ Chapitre I).

Concernant la famille des cationiques, considérés dans la littérature comme très irritants, seul un sur trois ressort comme toxique de cette évaluation, le Varisoft 300 (CTAC), comme développé précédemment, ceci peut-être expliqué par l'organisation des tensioactifs dans la phase continue de l'émulsion, le CTAC étant le seul cationique à ne pas faire de phases cristallines.

Cette remarque s'applique également aux tensioactifs anioniques, tous les tensioactifs bien tolérés forment des phases organisées cristallines pour la majorité, lamellaire pour le Crodafos CS20A (Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate (and) Dicetyl Phosphate). Le sodium lauryl sulfate ne présentant pas de phases cristallines et quant à lui responsable d'une forte mortalité cellulaire. Le cas de l'Eumulgin SG (Sodium stearyl glutamate), formant des phases cristalline et montrant quand même une forte toxicité au niveau de la viabilité cellulaire est à modéré du fait qu'il est utilisé à 3%, concentration 3 fois supérieure à la concentration maximale d'utilisation recommandé par le fournisseur.

Le bilan des tensioactifs ioniques, en mettant de côté l'Eumulgin SG, montre que les tensioactifs capables de former des phases organisées sont bien tolérés.

De façon plus générale, la représentation de la viabilité cellulaire (MTT) en fonction de l'organisation du tensioactif en phase aqueuse à 25°C (valeur du paramètre d'ordre), sur l'ensemble des tensioactifs étudié, montre que les tensioactifs capables de former des **phases**

crystallines, très ordonnées sont **peu toxique**, laissant une viabilité cellulaire supérieure à 70%, à l'exception du Simulgreen 18-2 (Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside) (Figure 4).

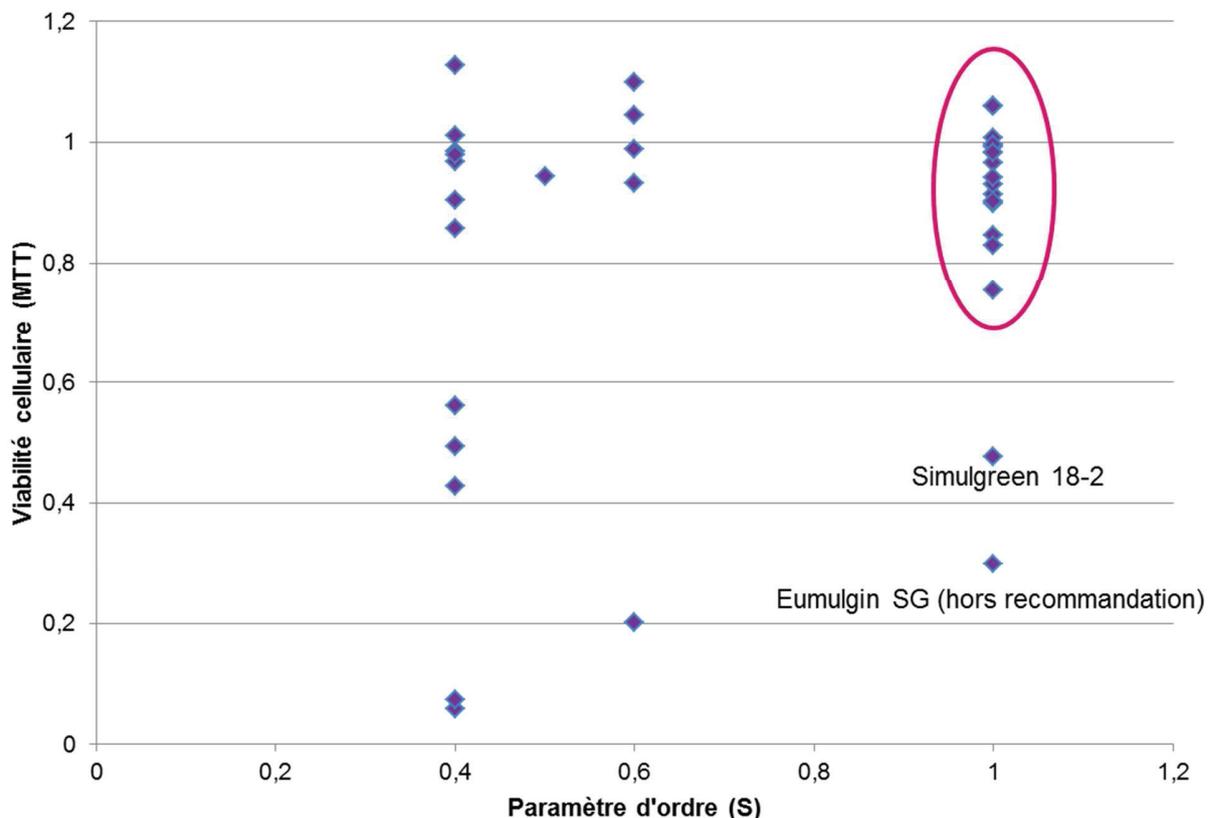
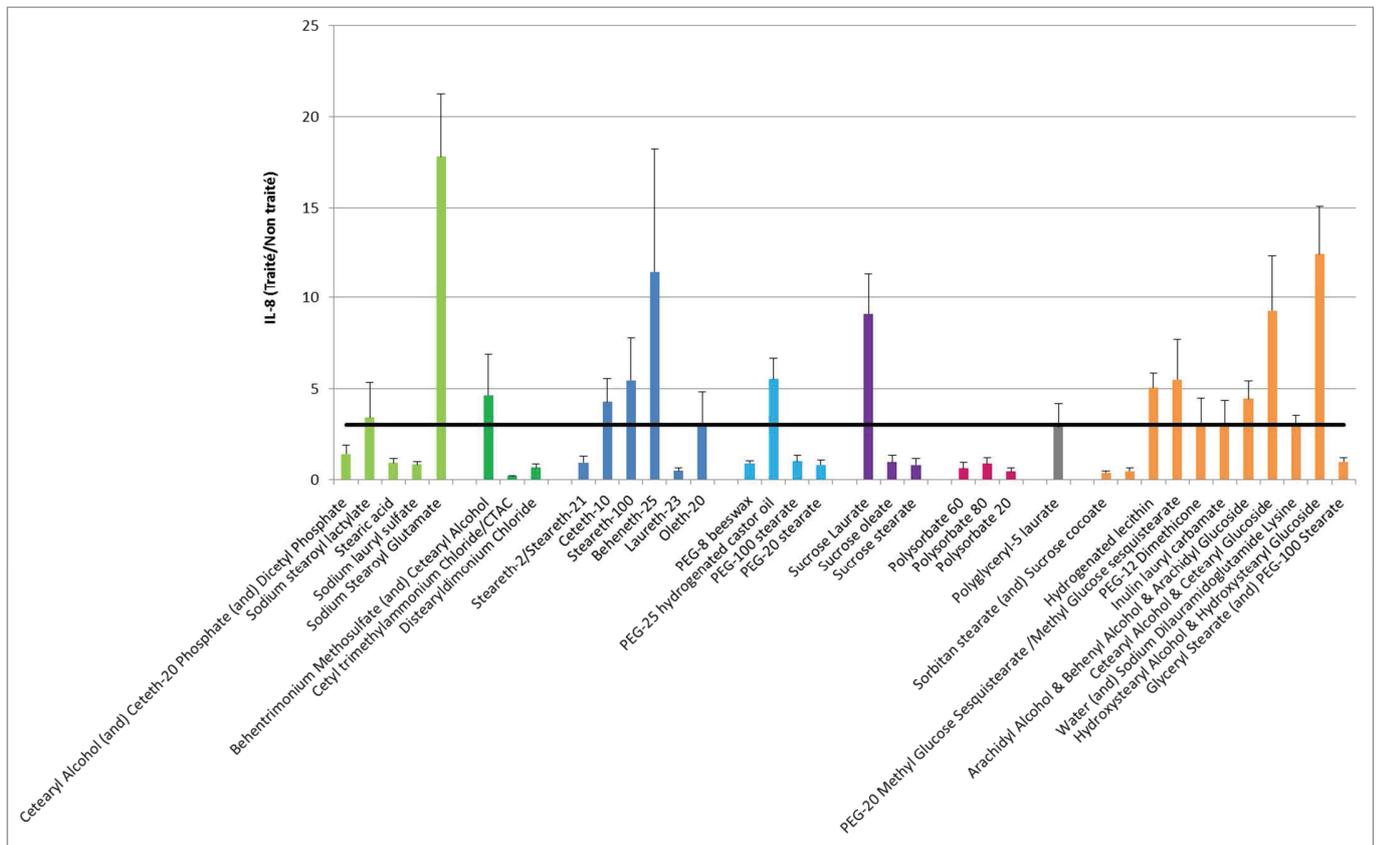
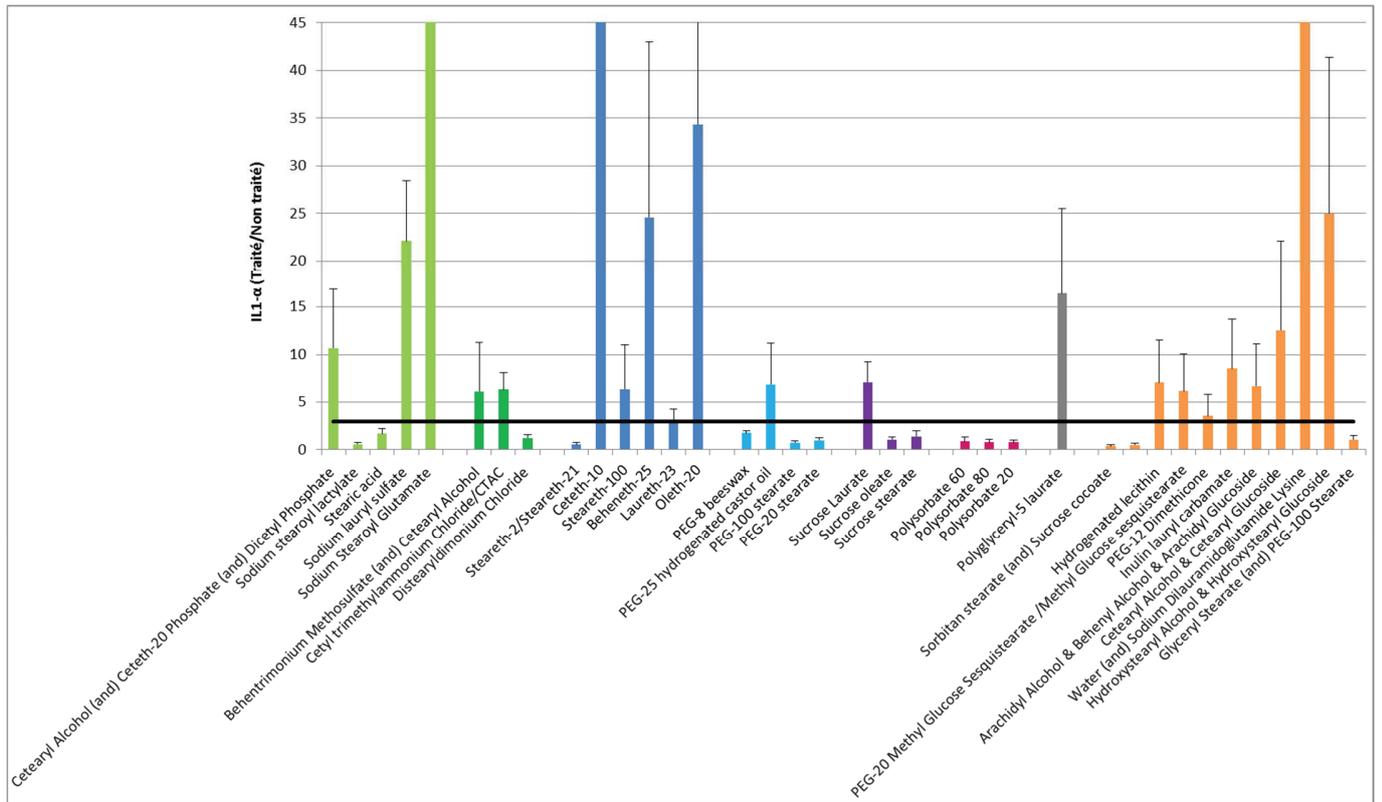


Figure 4. Représentation de la viabilité cellulaire suite à un traitement de tensioactifs en fonction de l'organisation du tensioactif en phase aqueuse à 25°C.

## Inflammation

Les résultats de libération de marqueurs d'inflammations sur l'ensemble des 38 tensioactifs, classés par famille sont présentés dans la Figure 5.

La ligne noire correspond à la valeur seuil déterminée précédemment. Les tensioactifs responsables d'une libération de marqueurs d'inflammation 3 fois supérieure à celle du contrôle présentent un effet significatif concernant l'inflammation cutanée.



*Figure 5. Résultats des tests de libération de marqueurs d'inflammation immédiate et retardée pour les 38 tensioactifs testés*

Toutes les familles de tensioactifs ont un ou plusieurs individus responsables de libération significatives d'interleukines excepté les ester de sorbitan polyoxyéthylénés, qui sont la famille la moins toxique concernant l'ensemble des paramètres de toxicité in vitro étudiés.

Les familles ayant le plus d'individus responsables de libération significatives d'interleukines sont les éthers de PEG, les ioniques, comme pour la mortalité cellulaire. Il y a également les tensioactifs non ioniques présentant des structures complexes ou étant sous forme de mélange.

## **Conclusion**

Le screening toxicologique de nombreuses molécules tensioactives ayant des propriétés physicochimiques très différentes a permis d'approfondir les connaissances concernant l'impact de la structure d'un tensioactif sur sa toxicité cutanée. Ainsi, le classement des tensioactifs en fonction de leur toxicité : cationique = anionique > non ionique a été remis en question. Les non ioniques de la famille des éthers de PEG se montrant plus toxiques que certains tensioactifs ioniques. La liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyl, en comparant la toxicité des éthers et des esters de PEG a montré une véritable influence sur le comportement du tensioactif sur les cellules de la peau. Ce classement basé sur la capacité des tensioactifs à former des micelles, et donc fonction de la CMC a également été mis en doute tenant compte des résultats pour les tensioactifs non ioniques ou aucune corrélation n'a été établie entre la CMC et la toxicité. Deux nouveaux paramètres physicochimiques, concernant l'organisation des tensioactifs en phase aqueuse ou en émulsion ont donc été déterminés pour expliquer la toxicité des tensioactifs ioniques en particuliers.



## Chapitre III. Les tensioactifs ont un effet à plusieurs niveaux sur la barrière cutanée

**Contexte:** Le stratum corneum est responsable des propriétés barrière de la peau. Le rôle des lipides intercornéocytaires et plus spécifiquement, leur organisation structurale dans le contrôle de la perméabilité du stratum corneum sont connus. Les tensioactifs ont la capacité de solubiliser les corps gras apportant ainsi les propriétés de détergence aux produits nettoyants. Au contact de la peau, ces tensioactifs vont pouvoir interagir avec les lipides du SC, influant sur la fonction barrière de la peau. L'objectif de ce travail est d'améliorer les connaissances concernant l'effet de plusieurs classes de tensioactifs sur la fonction barrière de la peau et ce à 3 niveaux différents : polarité de la surface cutanée, quantification et organisation structurale des lipides.

**Méthodes:** L'influence du traitement d'explant de peau humaine par six solutions de TA non ioniques et 4 solutions de TA ioniques sur les propriétés physicochimiques de la peau a été étudiée. En surface, la variation de la polarité et de l'énergie de surface de la peau suite au traitement a été évaluée grâce à des mesures d'angle de contact. Puis l'influence du tensioactif sur l'organisation de la matrice lipidique a été observée par des mesures en spectroscopie infrarouge. Enfin le potentiel extracteur du tensioactif sur les lipides a été évalué par dosage en HPLC-ELDS.

**Résultats:** Un tensioactif anionique (SDS) et un cationique (CTAC) augmentent la polarité de la peau car ils s'insèrent dans la matrice lipidique et la fluidifient après avoir extrait des lipides de surface (sébum) ainsi que des lipides de la matrice. Ce sont ceux qui présentent l'effet le plus important à tous les niveaux (surface, extraction et modification de l'organisation des lipides). Un autre tensioactif cationique présente seulement un effet détergent, supprimant uniquement une partie des triglycérides de surface et augmentant ainsi la polarité de la peau, mais ne s'insérant pas dans la matrice lipidique. Plusieurs tensioactifs non ioniques perturbent l'organisation des lipides matriciels, augmentant la polarité de la peau sans pour autant provoquer une extraction lipidique. Enfin deux tensioactifs non ioniques ne présentent aucun effet sur la barrière cutanée.

**Conclusions:** La polarité de la peau, l'organisation des lipides de la matrice et la composition lipidique de la peau sont trois niveaux d'étude de la barrière cutanée permettant de mieux appréhender l'effet du tensioactif sur la fonction barrière et les mécanismes d'interaction.

# Surfactants have multi-fold effect on skin barrier function

**Emmanuelle Lémery<sup>1,2</sup>, Stéphanie Briançon<sup>1</sup>, Yves Chevalier, Thierry Oddos<sup>2</sup>, Annie Gohier<sup>2</sup>, Olivier Boyron<sup>3</sup>, Marie-Alexandrine Bolzinger<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Université de Lyon F-69008, Lyon, France; Université Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, F-69008, Lyon, France; UMR CNRS 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), F-69622, Villeurbanne, France.

<sup>2</sup> Johnson & Johnson Santé Beauté France, Campus de Maigremont, 27100 Val de Reuil, France.

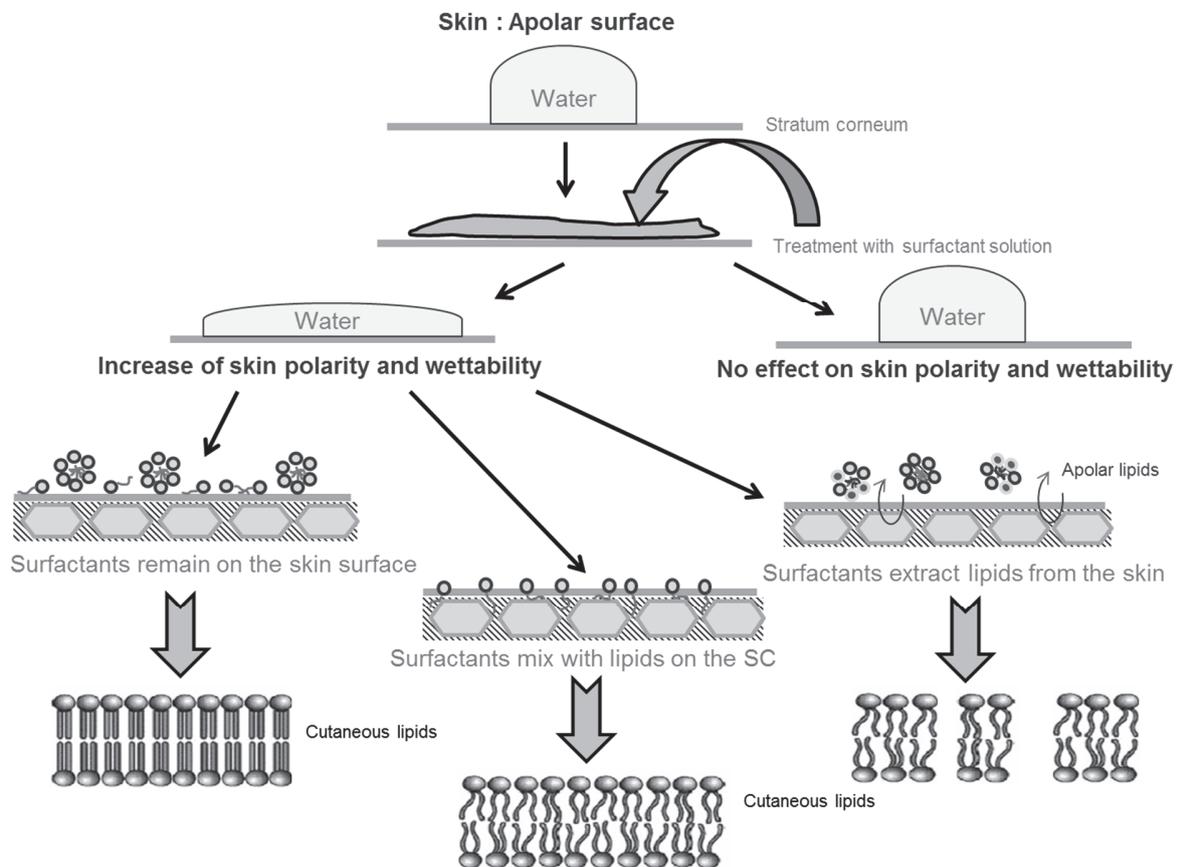
<sup>3</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, CPE Lyon, CNRS UMR 5265, Laboratoire de Chimie Catalyse Polymères et Procédés (C2P2), F-69616, Villeurbanne (France).

\*Corresponding author. E-mail address: marie.bolzinger@univ-lyon1.fr (M-A. Bolzinger). Postal address: Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, Faculté de Pharmacie, 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France. Tel.: +33 (0) 4 78 77 71 12, Fax: +33 (0) 4 78 78 56 47.

**Soumis dans European Journal of Dermatology**



## Graphical abstract



## Abstract

**Background:** The Stratum Corneum (SC) is responsible for the barrier properties of the skin and the role of intercorneocyte skin lipids, particularly their structural organization, in controlling SC permeability is admitted. Upon contacting the skin, surfactants interact with the SC components leading to barrier damage.

**Objective:** To improve the knowledge on the effect of several classes of surfactant on the skin barrier function at three different levels.

**Methods:** The influence of treatments of human skin explants with six nonionic and four ionic surfactant solutions on the physicochemical properties of skin was investigated. Skin surface wettability and polarity were assessed through contact angle measurements. Infrared spectroscopy allowed monitoring the SC lipid organization. The lipid extraction potency of surfactants was evaluated thanks to HPLC-ELSD assays.

**Results:** One anionic and one cationic surfactants increased the skin polarity by removing the sebaceous and epidermal lipids and by disturbing the organization of the lipid matrix. Another cationic surfactant displayed a detergency effect without disturbing the skin barrier. Several

nonionic surfactants disturbed the lipid matrix organization and modified the skin wettability without any extraction of the skin lipids. Finally two nonionic surfactants did not show any effect on the investigated parameters and on the skin barrier.

*Conclusions:* The polarity, the organization of the lipid matrix, and the lipid composition of the skin allowed describing finely how surfactants can interact with the skin and disturb the skin barrier function.

*Keywords:* contact angle, infrared spectroscopy, lipid extraction, skin barrier function, surfactants

## **Introduction**

Surfactants, due to their surface activity, are widely used in topical products to stabilize dispersions such as emulsions or microemulsions but also for their detergent properties in cleansing products and finally as enhancers to promote drug absorption in the skin [1,2]. Frequent exposure of skin to surfactants may damage the stratum corneum (SC) barrier and can induce skin dryness and inflammation. The stratum corneum is made of corneocytes imbedded in a continuous lipid matrix. Corneocytes are flat non-viable cells filled with keratins and water surrounded by a densely packed envelope [3].

Though the molecular organization of the lipids in the SC is still not definitely established, it is clear that the transport of substances through SC is strongly influenced by the state of the lipids. All lipid phases consist in a lamellar organization made of stacks of lipid bilayers; the alkyl chains of the lipids are packed in different lateral organizations. The most permeable phase is the fluid phase made of lipids in their molten state. Two solid phases having crystalline alkyl chains have been reported, the orthorhombic phase (OR) and the hexagonal phase (HEX). According to the current view of the lipids organization in the SC at 32°C, the crystalline lateral chain packing predominates where the orthorhombic and hexagonal structures coexist [4-7]. Such crystalline organization of the lipids ensures the skin barrier function [8]. However, an open question is whether the barrier efficiency of SC is related to the extents of the orthorhombic and hexagonal phases [9-11]. The OR phase seems essential to the skin barrier function. Boncheva et al. highlighted a correlation between transepidermal water loss (TEWL) and the presence of the OR phase. However Groen and Bouwstra did not reach the same conclusion in their study of the benzoic acid permeation [10, 11].

Despite these contradictory results, it is recognized that the lipid organization controls the skin absorption of exogenous substances, and that any disorganization may cause an alteration of the skin barrier. Depending on their ability to enter the skin, surfactants, can alter the lipid organization and then may have a "penetration enhancer" activity.

Surfactants can also interact with the skin proteins leading to the swelling of the cell membrane and even cellular lysis resulting in cytotoxic effects. Most of the studies on surfactant-induced damages to SC focused on the potential of harsh surfactants such as sodium lauryl sulfate (SDS) to bind to keratin filaments [12-16]. However, several researchers reported that irritation by surfactants may involve both surfactant binding to keratin and disruption of lipids organization [17-20]. A recent study on the effect of SDS on the SC lipids by means of infrared spectroscopy showed that the lipid matrix organization was modified towards an increase of the fluidity [21], whereas there was no change in the amide I and amide II spectral region which is sensitive to the proteins structure.

The interactions of surfactants with the lipids in the SC are caused by three possible mechanisms: i/ removal the surface lipids by the detergent action of surfactants, ii/ disorganization of the SC lipids by mixing with surfactants, and iii/ solubilization and extraction of lipids from the SC into the surfactants solution. Attempts to explain surfactant-induced lipid changes face experimental difficulties because these changes are weak and their detection requires accurate quantifications.

The sebum contains surface lipids mainly composed of triglycerides, wax esters, squalene, cholesterol and some free fatty acids. Abrams et al. stated that the alteration of the barrier function as revealed by changes in the transepidermal water loss (TEWL) cannot be linked to the removal of sebum [22]. Conversely, Gorcea et al. indicated that the film of sebaceous lipids contributed to the homeostatic regulation of the barrier function [23].

The second mechanism related to the disordering or fluidizing of the SC lipid structure received much attention. The surfactants mix with the SC lipids and alter the stratum corneum lipid structure [19, 24, 25]. Friberg et al. showed that such an effect depended on the type of surfactant following the order anionic > cationic > nonionic surfactant, the later having no significant effect [24]. However, nonionic surfactants with a lauryl chain are known to enhance drug absorption through the intercellular pathway [26, 2].

Solubilization and extraction of the stratum corneum lipids has been described by a mechanism involving two successive events: penetration of the monomeric entity of the surfactant and insertion in the lipid bilayer followed by micellar solubilization. Indeed, Froebe et al. showed that anionic surfactants removed the SC lipids when the surfactant concentration exceeded the CMC in solution, suggesting a solubilization process by micelles. Only cholesterol, free fatty acids and fatty esters were removed by surfactants [27]. A similar micellar solubilization scheme has been proposed for the solubilization of liposome models [28]. An alteration in the biosynthesis process

of the lipids was also observed, responsible for a ratio modification in the different lipid classes of the intercellular matrix [29].

Considering that all previous works addressed a single mechanism and a limited number of surfactant molecules, the purpose of this study was to reach a more comprehensive view over the effect of surfactants on the skin barrier function at those three different levels. The present study addresses the effect of surfactants on physicochemical characteristics of the SC including a wide series of surfactants, (including non-ionic, cationic and anionic surfactants). First, the polarity of the skin was investigated because the surfactants influence the skin surface wettability by different ways (i) a detergent effect (ii) an adsorption of the surfactants on the skin surface or an absorption into the lipid matrix which remains even after repeated washes, and finally (iii) an extraction of the stratum corneum lipids [30-32]. Second, the effect of the surfactants on the lipid organization was studied by infrared spectroscopy in ATR mode (IR-ATR) after application of surfactant solutions. Finally the quantitative analysis of the SC lipids by HPLC (using an ELSD detector) allowed the evaluation of the detergent effect at the skin surface and the extraction potential of surfactants. Several classes of lipids were quantified among which the triglycerides and squalene produced by the sebaceous glands, ceramides and cholesterol belonging to the composition of the intercellular lipids of SC [33, 34].

## **2 Materials and methods**

### 2-1 Surfactants

Two anionic surfactants, two cationic surfactants and 6 non-ionic surfactants were studied. All surfactants were used as received.

Anionic: Sodium lauryl sulfate/SLS (Texapon K12 P) from BASF (St. Augustin, Germany) and Sodium stearyl lactylate/SSL (Dermofeel SL) from Lucas Meyer Cosmetics (Champlan, France).

Cationic: Distearyldimonium chloride/DC (Varisoft TA 100) and Cetyl trimethyl ammonium chloride/CTAC (Varisoft 300) from Evonik Industries AG (Essen, Germany)

Non-ionic: PEG-100 stearate (Lipopeg 100S) and Laureth-23 (Lipocol L23) from Lipo Chemicals Inc., (Paterson, NJ), PEG-12 Dimethicone (Gransurf 61) from Grant Industries Inc. (New Jersey, USA), Hydrogenated lecithin (Emulmetik 320) from Lucas Meyer Cosmetics (Paris, France), PEG-25 hydrogenated castor oil (Croduret 25) and Polyoxyethylene sorbitan laurate (Tween 20) from Croda France (Trappes, France).

Surfactants were dissolved in deionized water at a temperature comprised between 50 and 70°C to ensure total dissolution. All solutions were prepared at 3% w/w surfactant concentration.

## 2-1 Human skin sample preparation

Excised skin samples from human breast, thigh and abdomen were purchased at the Laboratoire des Substituts Cutanés (Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France), or were provided by (Clinique de L'Europe Rouen France).. They were obtained after surgical intervention with the full consent of each patient, both male and female patients (9 donors of age range 24–56 years). All human donors were anonymous. Skin samples were collected within 12 h after surgery. Skin samples were kept at 4°C during their transportation to the laboratory. The hypodermis was removed from the skin.

## 2-2 Surface free energy analysis by contact angle measurements

### *Skin treatment*

The skin samples were mounted on Franz-type static glass diffusion cells (Laboratoire Verre Labo Mula, Corbas, France) with a diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup>. 50 µL of each surfactant solution at 3% concentration were poured into the donor compartment. The receptor compartment was filled with deionized water. The diffusion cells were maintained during 20 to 22 h at 40°C in a water bath in order to get a skin surface temperature of 32 ± 1°C.

After incubation, Franz cells were dismantled. The skin explants were rinsed with deionized water and gently wiped 3 times with absorbent paper to eliminate the residual solution. Water treatment was used for the control sample.

### Contact angle measurements

The contact angles and interfacial tension were measured using a Drop Shape Analysis System DSA10Mk2 (Krüss GmbH, Germany). A drop of standard liquid (volume 5–6 µL) was carefully deposited on the skin surface with a syringe. The drop shape was recorded with a high-speed framing camera and analyzed for the contact angle. The contact angle was defined as the angle between the skin surface and the tangent to the surface of the drop. Each experiment was repeated in sixuplicate.

### Surface free energy calculation

The surface free energy of solids was split into its dispersive and polar components according to Owens, Wendt, Rabel and Kaelble. It is assumed that the interaction energy between two molecules apart from the interface is the geometric mean of the interactions between identical molecules (in the pure liquids). This standard method allows the calculation of the surface free

energy of a solid from the measurement of its contact angle with several liquids. Such a methodology provides an evaluation of the wetting properties and the polarity of the skin. The surface free energy of each phase (liquid and solid) is separated into its two components:

- the dispersive component  $\gamma_l^d$  and  $\gamma_s^d$
- the polar component  $\gamma_l^p$  and  $\gamma_s^p$

$$\gamma_{s-l} = \gamma_s + \gamma_l - 2\sqrt{\gamma_s^d \sigma_l^d} - 2\sqrt{\gamma_s^p \sigma_l^p} \quad (1)$$

The contact angle  $\theta$  is given by the Young's equation

$$\gamma_s = \gamma_{s-l} + \gamma_l \cos \theta \quad (2)$$

After some simple algebra, the measured contact angle is expressed as a function of the two components  $\gamma_s^d$  and  $\gamma_s^p$  of the surface free energy of skin. A linearized relationship allowing an easy determination of  $\gamma_s^d$  and  $\gamma_s^p$  by a linear regression reads

$$\frac{(1+\cos \theta)\gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad (3)$$

Contact angles of several liquid drops are measured in order to plot this expected linear relationship. The assumptions of the theory are considered valid if the data points give a fair linear behavior. Then the slope is  $\sqrt{\gamma_s^p}$  and y-intercept is  $\sqrt{\gamma_s^d}$ . The total surface free energy is the sum of the two contributions,  $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$ .

This method has already been applied to determine the dispersive and polar components of the free energy of skin before and after treatment with surfactant solutions and diethyl ether (Mavon et al. 1997). The following standard liquids were used: deionized water, diiodomethane (99%) from Alfa Aesar (Schiltigheim, France), glycerol (99.5%), tritolyl phosphate (99%) and formamide (99.5%) from Thermo Fisher Scientific (Geel, Belgium), *n*-dodecane from Fluka (St Quentin Fallavier, France). The densities of the standard liquids are given in Table 1, together with the mean values of the three parameters of the skin surface, total surface free energy, and its dispersive and polar components.

Table 1. Dispersive and polar components of the surface tension and density at 25°C of the standard liquids.

Liquid	Dispersive component (mN.m <sup>-1</sup> )	Polar component (mN.m <sup>-1</sup> )	Surface tension (mN.m <sup>-1</sup> )	Density (g.cm <sup>-3</sup> )
Water	19.9	52.2	72.1	0.997
Glycerol	21.2	41.5	62.7	1.2636
Diiodomethane	47.4	2.6	50	3.3254
Tritolyl phosphate	39.2	1.7	40.9	1.16
Formamide	23.5	33.4	56.9	1.1334
Dodecane	25.4	0	25.4	0.7733

### 2-3 Evaluation of the lipid matrix structure by IR-ATR spectroscopy

#### *Skin treatment*

Each skin sample was treated with 50 µL of surfactant solution at 3% for 1 h at room temperature. The samples were rinsed and gently wiped 3 times before the ATR-IR analysis. 4 or 5 samples of skin were used for each surfactant solution.

#### *ATR-IR analysis*

All spectra were collected with a spectral resolution of 2 cm<sup>-1</sup> and an average of 64 scans using a Nicolet IS50 FTIR (ThermoFischer Scientific) equipped with a DLaTGS detector and an attenuated total reflection (ATR) diamond crystal accessory. The whole instrument was maintained dry and free of carbon dioxide by a permanent flow of dry nitrogen.

The skin samples were placed, SC-side down, onto the diamond ATR crystal, held in place with the flat sapphire anvil, and the IR spectrum from the skin samples was collected. The same pressure was applied on top of samples (torque setting of 0.5 N.m corresponding to a pressure of 1.5 kbar applied over the diamond surface) so as to ensure a reproducible contact between the sample and the ATR crystal.

#### *Data treatment*

The position of the CH<sub>2</sub> symmetric stretching band was determined in the spectra previously baseline-corrected. In the scissoring region (1480-1460 cm<sup>-1</sup>), second derivatives of the spectra were calculated without smoothing. The second-derivative spectra were baseline-corrected between the endpoints of the scissoring region, and normalized to identical minima and maxima.

The bandwidth at 50% of the peak height (denoted as FW-50) was then determined according to Boncheva [9].

### *Data analysis*

Several zones of interest in the spectrum were selected. A first band at 2849-2855  $\text{cm}^{-1}$  corresponding to symmetric stretching vibration of  $\text{CH}_2$  is sensitive to the lipid chain lateral packing and conformational order. This band shifts to higher wavenumbers as the lipid chains get more disordered. The transitions from OR phase to HEX and to LIQ phase can be detected in this way. A shift from 2849.8 to 2850.5  $\text{cm}^{-1}$  indicates the lipid transition from orthorhombic to hexagonal packing. A further shift from 2850.7 to 2854.2  $\text{cm}^{-1}$  is characteristic of a transition to a disordered liquid state [35].

The scissoring vibrations of  $\text{CH}_2$  found between 1462 and 1473  $\text{cm}^{-1}$  are also sensitive to the same transitions. The transition from two bands to a single one indicates the transition between the OR phase and the HEX phase. This later band shifts to higher wavenumber at the transition to the LIQ phase. The scissoring bandwidth at 50% of the peak height, FW-50, was also determined as a descriptor of the lipid organization. A low FW-50 indicates a disorganized lipid matrix [9, 36-38].

## 2-4 Lipid extraction: evaluation by HPLC/ELSD system

### *Solvents and standards*

Isopropanol (VWR, France), *n*-butanol (Merck, Darmstadt, Germany) and *n*-hexane (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium) of HPLC grade were used as mobile phase without further purification. Other solvents, dichloromethane, chloroform and methanol (Fisher Scientific, France) used for the extraction and purification were of analytical grade. Tristearin, cholesterol, cholesteryl palmitate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), ceramides II [NS], IIIa [NP], IIIb, and VI [AP] were kindly given by Evonik (Essen, German), lignoceric acid, oleic acid and tricosanoic acid were purchased from Interchim (France).

### *Skin treatment and extraction of lipids*

The skin samples were mounted on Franz-type static glass diffusion cells (Laboratoire Verre Labo Mula, Corbas, France) with a diffusion area of 2.54  $\text{cm}^2$ . 50  $\mu\text{L}$  of each surfactant solution at 3% concentration were poured into the donor compartment. The diffusion cells were

maintained during 20 to 22 h at 40°C in a water bath in order to get a skin surface temperature of  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . After incubation, the diffusion cells were dismantled. Skin explants were rinsed with deionized water and gently wiped 3 times with absorbent paper to eliminate all traces of solution. The stratum corneum and the epidermis (SC+E) were separated by maintaining the skin sample into hot water (60°C) for 45 s.

Lipids were extracted from the SC+E into several successive baths of 2 mL chloroform/methanol mixtures (2:1-1:1-1:2) and 100% methanol for 30 min intervals at room temperature in ultrasonic tub. All baths were gathered together and evaporated. The dry extract was dissolved into 500  $\mu\text{L}$  of dichloromethane/methanol mixture (2:1), filtered and put into vials for HPLC measurement.

The surfactant solution which was in contact with the skin for 22 h was not analyzed by HPLC-ELSD because the concentration of lipids in the solution was below the limit of detection.

#### *HPLC-ELSD analysis*

The lipid extracts were analyzed using high pressure liquid chromatography with a 5  $\mu\text{m}$  Halo Penta-HILIC 4.6 x 150 mm (Advanced Materials Technology, USA) followed by a Lichrosphere 100 DIOL, 5  $\mu\text{m}$ , Hibart RT 250-4 column, (Merck, Darmstadt, Germany). The HPLC set up from Waters (Saint Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters 717 autosampler injector, a Waters 600 pump with gradient controller and an ELSD detector (2424 ELS Detector Waters, USA). The temperature of the drift tube was set at 70°C, nebulizer cooling and pressure at 50 psi. A combination of two vessels were used: A hexane and B, hexane/isopropanol/n-butanol (77.5 : 12.5 : 10; v/v/v). The flow rate was kept constant at 1.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  throughout the program. The elution gradient was delivered from 95% of A and 5% of B to 55% of A and 45% of B to finish by 98% of A and 2% of B. This gradient allowed the separation of the squalene, cholesterol ester, triglycerides (TG), cholesterol (CHOL), and Ceramides (CER) (a first group composed of Cer II, Cer IIIa and IIIb and a second group composed of Cer VI).

The signal of the photomultiplier was recorded under a gain of 1, and integrated using the software Empower Pro 2 (Waters, USA), (adapted from Norlén) [39].

To ensure high accuracy, calibration curves for each class of lipids were run daily. Coefficients of correlation were calculated for all calibration curves to ensure linearity in the concentration ranges used (Squalene: 600-6  $\mu\text{g}$ , Cholesterol ester: 1300-13  $\mu\text{g}$ , TG: 1550-15.5  $\mu\text{g}$ , CHOL: 2300-2.3  $\mu\text{g}$ , CER 1<sup>st</sup> group: 495-0.495  $\mu\text{g}$ , Ceramide VI: 165-0.165  $\mu\text{g}$ ),  $R$  (mean) = 0.996. The limit of detection for each class of lipids were (Squalene: 14  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Cholesterol ester: 115  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; TG: 60  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; CHOL: 540  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; CER (1<sup>st</sup> group: 580  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Ceramides VI: 165  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Five skin samples were used for each surfactant. The average amount of lipids in the SC + Epidermis (E) and the relative percentages of the different lipid classes recovered in the SC + E pieces after each surfactant treatment were determined.

For each experiment, the means of all data are indicated with their standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by using the unpaired Student's *t*-test. The level of significance was  $p < 0.05$ .

### 3 Results

#### 3-1 Surface free energy analysis by contact angle measurements

The values of the dispersive and the polar components of the skin after a treatment by surfactants are given in Fig.1.

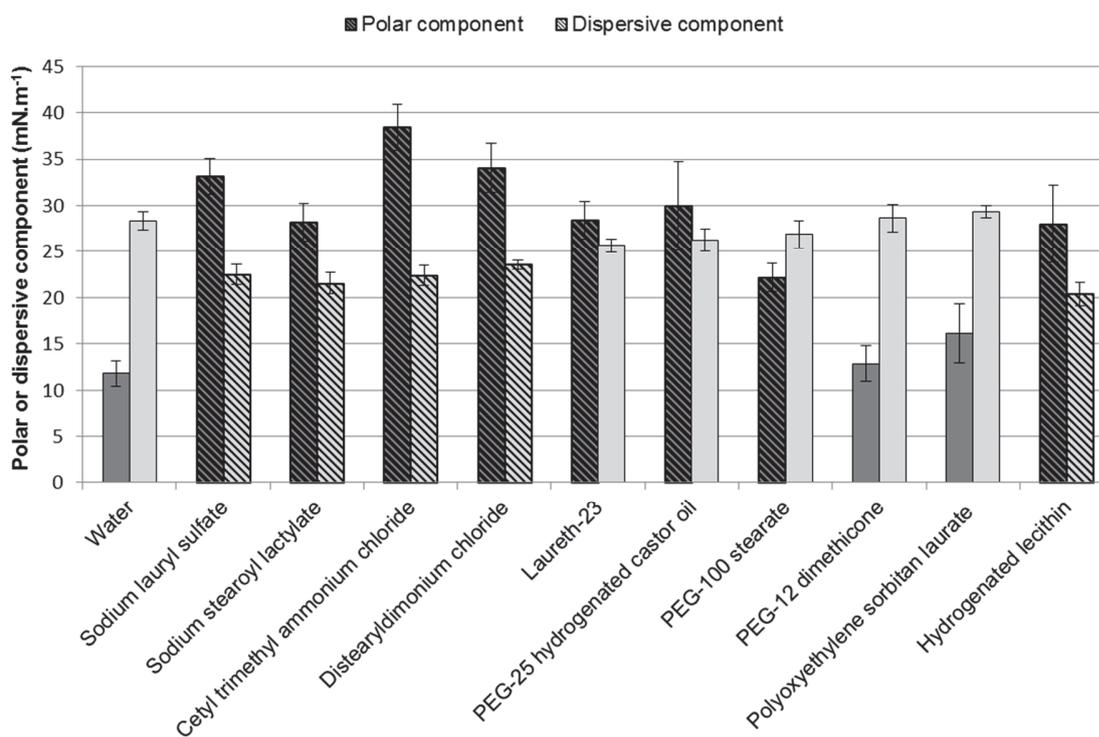


Fig. 1. Polar and dispersive components of the skin surface according to surfactant treatment. The dashed columns correspond to values having a statistically significant difference with the control (water treatment) ( $p < 0.05$ ).

The skin treated with water (control sample) presented a low surface free energy ( $40.15 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) with a polar component ( $11.8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ) nearly 3 times lower than the dispersive component ( $28.35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). The skin is naturally an apolar surface.

Only two non-ionic surfactants, the PEG-12 dimethicone and the Polyoxyethylene sorbitan laurate did not modify either the polar or the dispersive component. They had no effect on the skin surface properties. The PEG-100 stearate had an intermediate effect as it increased significantly the polar component of the skin but the dispersive component remained lower than the value of the control.

Considering the polarity of the skin surface shown in Fig. 2, four non-ionic surfactants (PEG-100 stearate, Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil and Hydrogenated lecithin) and all the ionic surfactants had an impact on skin surface properties. The polar component became larger than the dispersive component. The polarity of the skin increased from  $29.2 \pm 0.07 \%$  for the control to more than  $45.2 \pm 0.05 \%$  after treatment with PEG-100 stearate and  $62.9 \pm 0.06 \%$  after treatment with CTAC. Those surfactants turned the skin surface more hydrophilic.

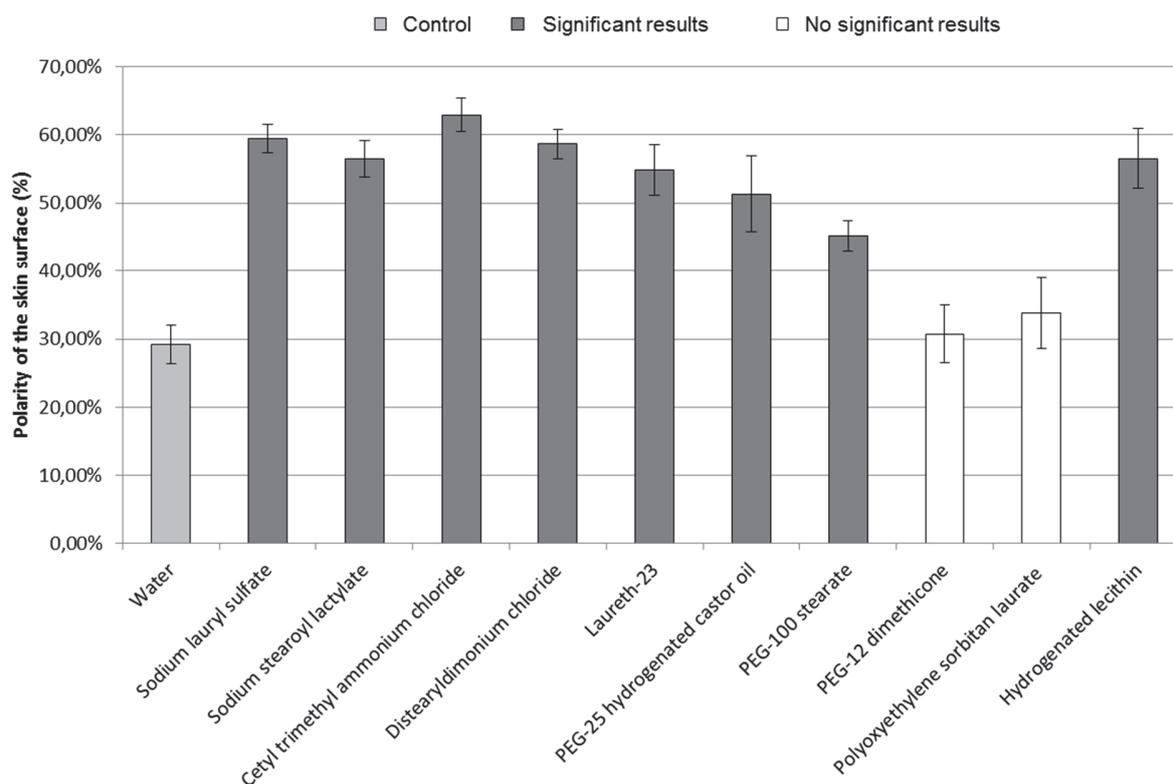


Fig. 2. Polarity of the skin surface according to the surfactant treatment. Grey bar mark the control, dark grey bars mark significantly different of the control and white bars mark no significant results ( $p < 0.05$ ;  $n = 6$ ).

### 3-2 Evaluation of the lipid matrix organization by IR-ATR

The  $\nu\text{CH}_2$  stretching mode region ( $2840\text{--}2960\text{ cm}^{-1}$ ) was used to evaluate both conformational order and lateral organization. The mean of the wavenumber values of this band was calculated for each surfactant. Fig. 3 illustrates the effect of the surfactant treatment on the shift of the  $\nu\text{CH}_2$  stretching band.

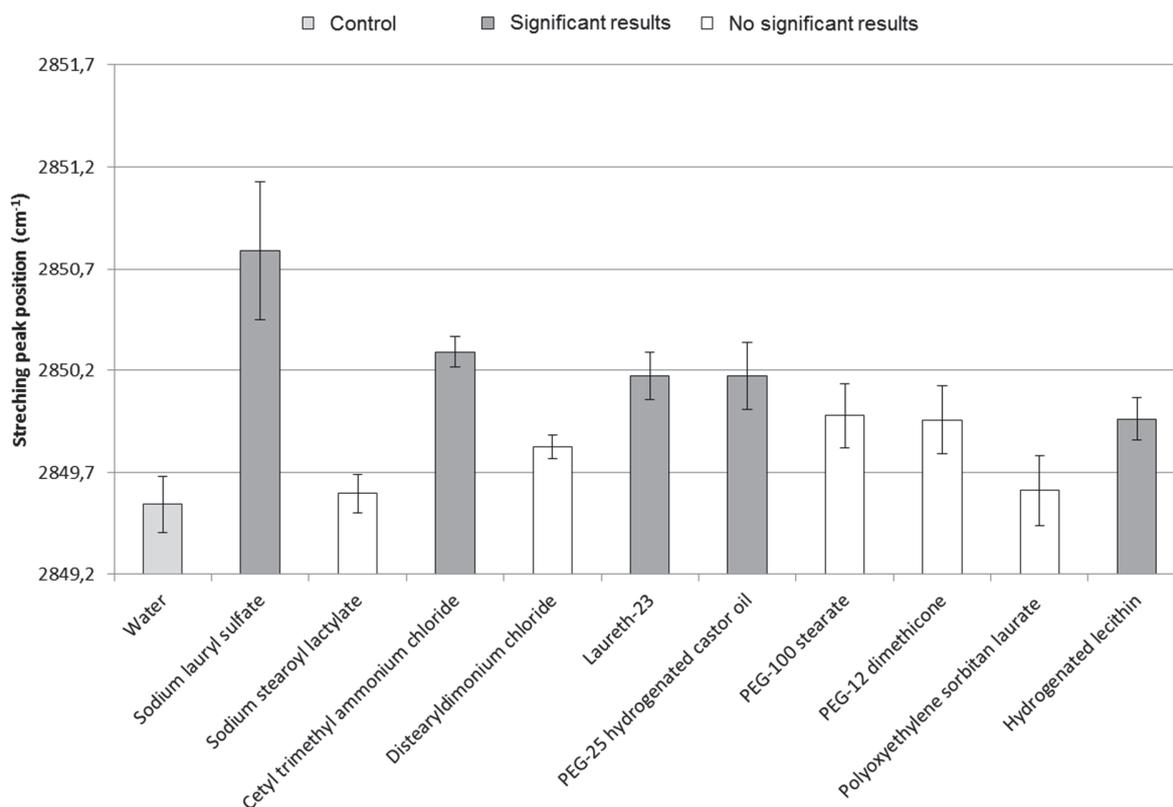


Fig. 3. IR-ATR symmetric stretching frequency versus surfactant treatment. Grey bar mark the control, dark grey bars mark significantly different of the control and white bars mark no significant results ( $p < 0.05$ ;  $n = 4$  or  $5$ ).

The two ionic surfactants, SLS and CTAC, were responsible for a band shift larger than  $0.7 \text{ cm}^{-1}$ , meaning that those surfactants fluidized the lipid organization. The lipids underwent a phase transition from the orthorhombic phase to the less organized hexagonal phase.

Since the wavenumbers after treatment remained lower than  $2854 \text{ cm}^{-1}$  for each surfactant, the transition to liquid crystalline phase did not occur.

Three non-ionic surfactants (Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil and Hydrogenated lecithin) displayed a significant shift of the  $\nu\text{CH}_2$  stretching band value compared to the control. Nevertheless, such shift remained lower than  $0.7 \text{ cm}^{-1}$ , meaning that the transition from OR to HEX phase did not reach completion. Those five surfactants disturbed the lipid matrix by fluidizing it. The other surfactants did not disturb the lipid organization.

For SLS and CTAC, the  $\text{CH}_2$  scissoring band ( $1410\text{--}1480 \text{ cm}^{-1}$ ) reflecting the nature of lateral packing between the ceramide molecules (orthorhombic, hexagonal or disordered) was also

studied. The measurements of the FW-50 confirmed the disruption of the lipid matrix (Boncheva, Damien, and Normand 2008). Fig. 4 shows an example of the second-derivative spectra calculated from absorbance spectra collected after surfactant treatments.

FW-50 value for the control was  $11.58 \text{ cm}^{-1}$ . FW-50 was reduced to  $7.85 \text{ cm}^{-1}$  and  $8.21 \text{ cm}^{-1}$  after exposure to SDS and CTAC respectively. These results confirmed the effect of those two surfactants on the bilayers which underwent a partial transition to the HEX phase.

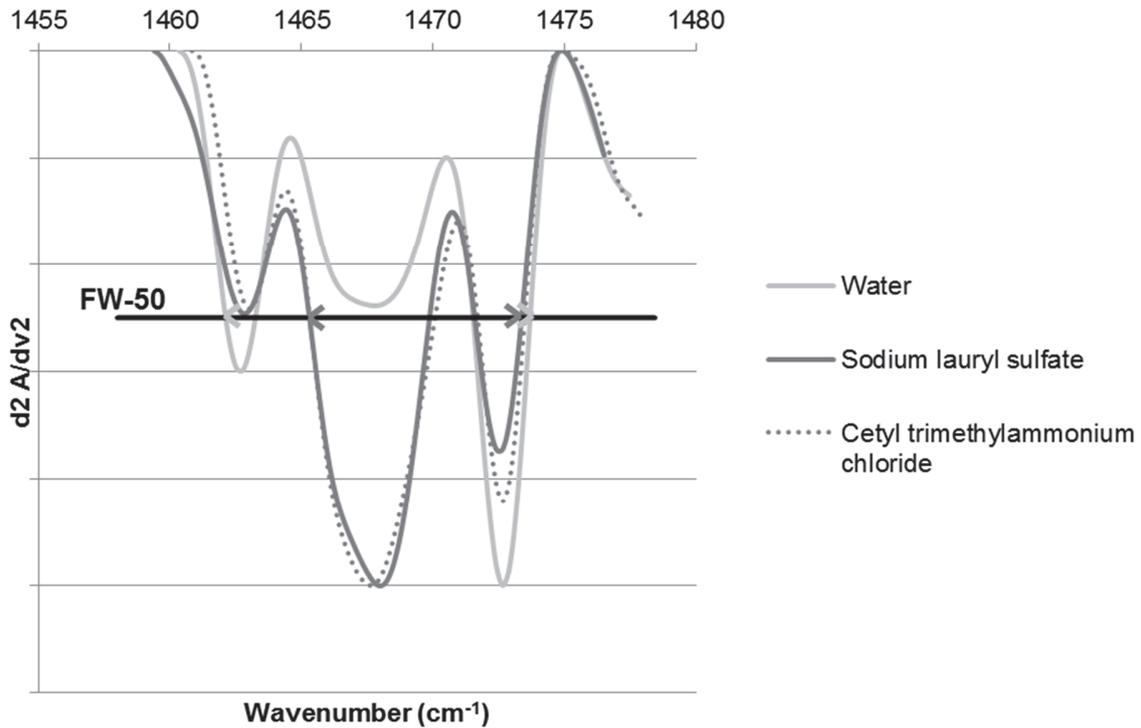


Fig. 4. Second-derivative spectra calculated from absorbance spectra collected after surfactant or water treatments. The second-derivative spectra were normalized to identical minima and maxima and in addition baseline-corrected. The scissoring bandwidths measured at 50% of the peak height, FW-50, is measured along the black line limited by bright grey arrows for the control and by dark grey arrows for the surfactant treated skin.

### 3-3 Lipid extraction evaluation by HPLC/LSD system

The total amounts of lipids still in the epidermis after 22 h exposure to a surfactant solution are reported on the Fig. 5.

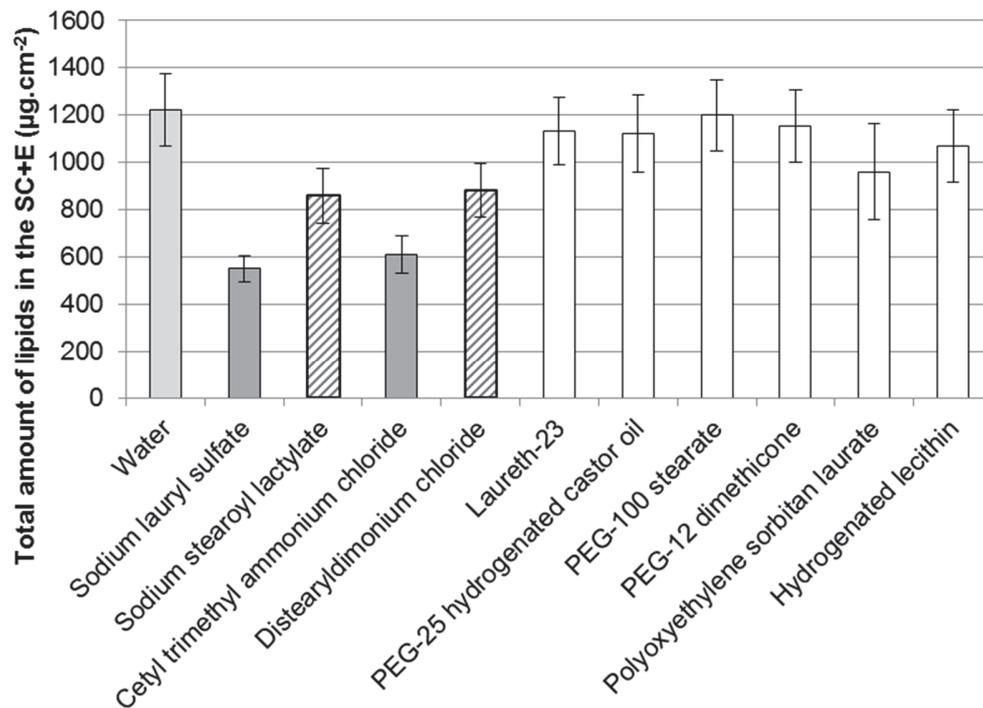
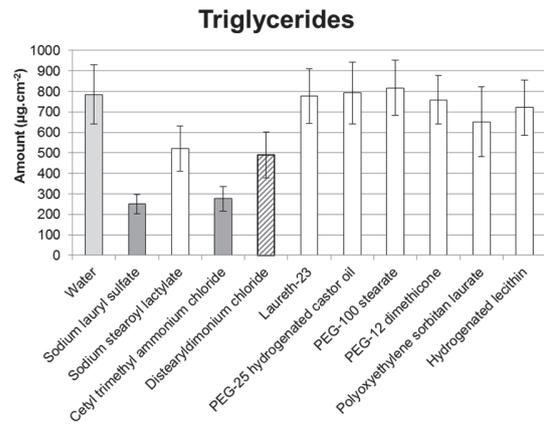
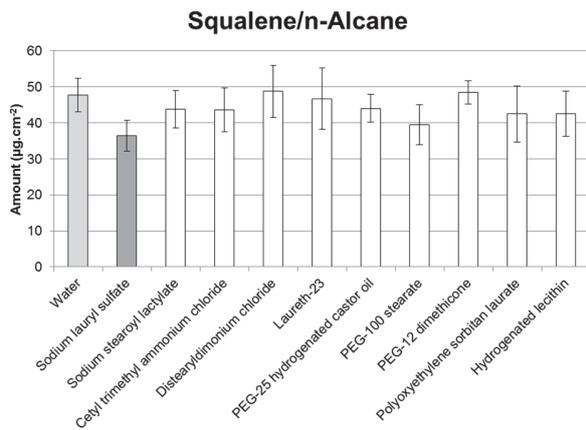


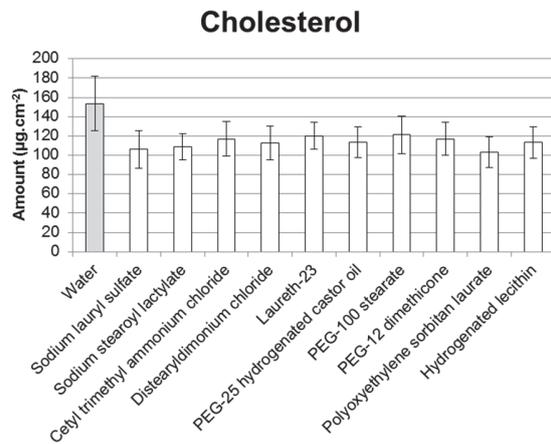
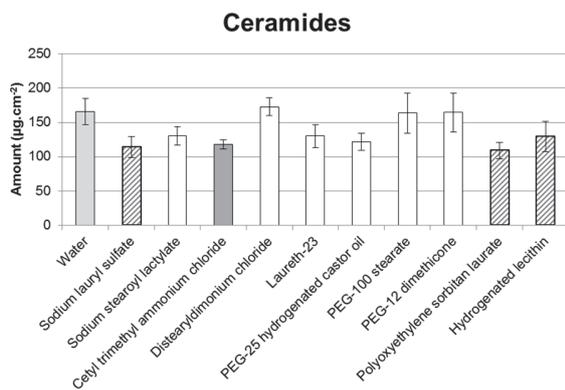
Fig. 5. Total amount of lipids in the epidermis after 20 h exposure to the surfactant solution ( $n = 5$ ). Grey bars mark results significantly different of the control ( $p < 0.05$ ); hatched bars mark noteworthy results ( $p < 0.1$ ).

For the 4 ionic surfactants (SLS, CTAC, SSL and DC), the total amount of lipids still in the epidermis was much lower compared to the control (skin treated by water). They had significant extraction potency of the skin lipids. SLS and CTAC caused the largest extraction of lipids. The non-ionic surfactants did not dissolve the SC lipids.

Detailed extraction of the different lipid classes (sebaceous film or epidermal lipids) are reported in Fig. 6.



a/ detergency: contribution of surfactants to the defatting of the skin (sebaceous lipids)



b/ extraction of epidermal lipids:

Fig. 6. Amount of lipids in the skin after 22 h treatment with each surfactant ( $n = 5$ ). Grey bars represent significant results ( $p < 0.05$ ); hatched bars represent noteworthy results ( $p < 0.1$ ).

Squalene and TG were taken as marker of the sebaceous lipids and the lipid film on the skin surface. The ceramides and cholesterol were taken as markers of the integrity of the lipid matrix though some amount of cholesterol is produced by the sebaceous glands [33, 34].

Concerning the lipid film at the skin surface, SLS was responsible for a significant decrease of squalene and *n*-alkane. One anionic and one cationic surfactant (SLS and CTAC) were responsible for a significant decrease of triglycerides in the epidermis. The other cationic surfactant (DC) had also an impact on the TG, less important but still noticeable.

Concerning the epidermal lipids, no significant extraction of cholesterol by surfactants was noticed. Only effects on ceramides extraction were observed. The CTAC was responsible for a significant decrease of ceramides amount. The SLS and two nonionic surfactants (Polyoxyethylene sorbitan laurate and hydrogenated lecithin) had lower extraction potency on ceramides.

Finally SLS and CTAC were responsible for a decrease of 17-19% of triglycerides in the epidermis. This targeted extraction of triglycerides modified the proportion of the other lipid classes, and particularly increased that of ceramides (6%) leading to a more polar skin surface. The other cationic surfactant (DC) had also an impact on the surface lipids of the skin, responsible for a TG decrease of 10%, leading to a relative increase of CER (6%).

As triglycerides are neutral lipids and ceramides polar ones, a ratio TG/CER was calculated for each surfactant treatment in order to check whether the changes of skin polarity can be attributed to the extraction of lipids (Table 2).

Table 2. Ratios of triglycerides on ceramides in the epidermis after surfactant treatment.

	<b>Ratio TG/CER</b>
<b>Water</b>	<b>5,14</b>
<b>Sodium lauryl sulfate</b>	2,50
<b>Cetyl trimethyl ammonium chloride</b>	2,50
<b>Laureth-23</b>	7,01
<b>PEG-25 hydrogenated castor oil</b>	7,61
<b>Polysorbate 20</b>	6,64
<b>PEG-100 stearate</b>	5,75
<b>Hydrogenated lecithin</b>	6,60
<b>PEG-12 dimethicone</b>	5,09
<b>Distearyldimmonium chloride</b>	2,88
<b>Sodium stearyl lactylate</b>	4,28

Under physiological conditions, epidermis contains 5 times more triglycerides than ceramides. A majority of apolar lipids are present on the skin surface. SLS, CTAC and DC treatments reduced this ratio by half. The other surfactants did not modify the TG/CER ratio.

#### 4. Discussion

Since the past decades, thanks to several investigations on normal and diseased skins, the role of the SC lipids in the skin barrier function and the skin permeability has been highlighted. In particular, the interactions between penetration enhancers and SC intercellular lipids is of crucial importance for the effectiveness of these molecules [8, 40, 41]. The barrier properties are linked to the lipid organization and an alteration of their structure can change the permeability of the skin. The phase transitions induced by surfactants result in “structural defects representing small, mobile free volumes in the hydrocarbon phase of the membrane” as written by Suhonen et al., leading to an increased fluidity [42].

In the present study, we investigated the mechanisms by which several surfactants with different structures interacted with the skin with a special focus on the lipoidal pathway. Surface free energy of the skin and especially the skin polarity are important parameters to be considered for gaining a better understanding of the surfactant effect on the skin barrier. As skin lipids are the major molecules responsible for the wetting properties and the polarity of the skin, any change in the parameters describing the physicochemical properties of the skin surface suggests a modification of the content or the organization of the SC lipids. Several lipid classes were monitored as markers of the integrity of the sebaceous film (TG and squalene) and the epidermal lipids (CER and CHOL). In complement, the lipid organization was investigated by means of IR spectroscopy.

Independently of their chemical properties, all surfactants induced an increase of the polar component of the skin except PEG-12 dimethicone and Polysorbate-20. The most important result is that the three surfactants that induced a removal of triglycerides (three ionic surfactants) also induced a higher wettability change compared to the other surfactants (Fig. 6 and Table 1). The degreasing effect (i.e. the ability of surfactants to solubilize and remove stratum corneum lipids) might be involved in this damaging effect. The triglycerides are apolar lipids, their specific extraction modifies the balance between all the lipid classes. The ceramides content in “normal” skin is 5 times lower than triglycerides, explaining partly the apolar characteristic of the control skin surface. The three ionic surfactants SLS, CTAC and DC modified the balance in favor of the ceramides after removal of the triglycerides. Ceramides amount became less than 3 times lower than triglycerides after the surfactant treatment. As ceramides are polar lipids, the reduction of apolar lipids in favor of polar ones could partly explain the increase of the skin polarity after SLS, CTAC and DC treatments. This result is not in accordance with previous papers which reported that a clean degreased skin surface (soap washed, water rinsed, and towel dried) reduced the

skin wettability [30, 43, 44]. Mavon et al. reached the same conclusion after a pre-treatment by ether but even attributed the wettability of the skin surface to the sebaceous lipids [30]. Our results are in accordance with Rosenberg et al. who demonstrated that the wetting by water was enhanced after the application of surfactants, with the following ranking: cationic > anionic > nonionic [31]. However the authors attributed their results to the difficulty of removing all the surfactants (more difficult with cationics than nonionics) from the skin surface rather than lipid extraction.

The increase of the skin polarity after surfactant treatment is far from being explained only by the sole triglyceride extraction. Some non-ionic surfactants and one anionic surfactant (Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil, PEG-100 stearate, Hydrogenated lecithin and SSL) increased the skin polarity without any extraction of the skin lipids. Surfactant intercalation between SC lipids was proposed as the first stage of lipid damage rather than extraction [45]. Indeed, these surfactants can mix with the lipid matrix and fluidize the lipid chains.

The IR results showed that SDS and CTAC had a significant effect on the lipid matrix organization. Some nonionic surfactants (Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil and Hydrogenated lecithin) also loosened the lipid matrix organization by inducing the transition from OR phase to HEX phase, but to a smaller extent. The increase of the skin polarity due to these surfactants can be explained by their ability to mix with the skin lipids, even without removing the sebaceous film at the skin surface. Such surfactants that decreased the lipid ordering (conformation and organization), made the SC more permeable to exogenous molecules. Some non-ionic surfactants, especially PEG ethers were described as potential penetration enhancers, altering the barrier function of the skin [26].

Among the surfactants able to mix with the lipid matrix, some of them could also extract the epidermal lipids. The extraction of the epidermal lipids by harsh surfactants like SLS was previously studied by some researchers but a consensus is still missing, probably because of the lack of homogeneity of the experimental protocols of the various investigations. Froebe et al. found no significant extraction of TG or CER but a decrease of the cholesterol level after several short-time exposures of the skin to a 2% SLS solution, which is in contradiction with our results showing that SLS was responsible for a decrease of TG and CER with no modification of the cholesterol level [27]. In their in vivo study where a repeated exposition to a 4% SLS solution was applied, Fulmer and Kramer observed no modification of the TG, CER and CHOL levels but noticed some unexplained shifts in the composition of the ceramides although the total amount of ceramides was kept constant; they also observed an increase of free cholesterol compared to esterified cholesterol [46]. Such results could be explained by the effect of surfactants on the

lamellar body responsible for lipid synthesis as observed by Fartash et al. [29]. Conversely, and in accordance with the present study, Imokawa et al. [47] and Rawlings et al. [48] reported a decrease of ceramides together with a very low decrease of TG and cholesterol. In accordance with the present study, Lévêque et al. observed an increase of the ceramide proportion in a mammary SC, after 24 h immersion into 1% SLS solution; they also reported a decrease of the cholesterol proportion while TG remained unchanged [18]. The discrepancies in the conclusions reached by several research teams can be explained by the variable experimental conditions: several exposure methods, several extraction processes, and several different analysis techniques that might have missed the detection of some compounds because of their different detection limits. This illustrates the difficulties of assessment of the real extraction potency of epidermal lipids by surfactants. In our study, SLS was not the only surfactant responsible for epidermal lipids extraction. CTAC, after mixing with the lipid matrix caused a significant decrease of the ceramides. A lower effect on ceramides was observed for hydrogenated lecithin. Polyoxyethylene sorbitan laurate did not mix with the lipid matrix after 1 h exposure (results from IR analysis); the decrease of ceramides observed after treatment with this surfactant can be explained by the difference of exposure time applied before the infrared spectroscopy experiment (1 h) and the HPLC-ELSD analysis (22 h).

To summarize the disclosures of the present study on skin barrier (Table 3), SLS and CTAC were the most active surfactants that operated by the three mechanisms: in addition to their well-known detergency effect, they strongly modified the skin wettability, extracted skin lipids such as ceramides and also disturbed the epidermal lipids. Such results are consistent with those reported by Mao et al. who demonstrated that SLS can penetrate the skin, remove skin lipids and disorganize the SC lipids packed in orthorhombic phases [19]. SLS can insert into the matrix and even form mixed micelles with the skin lipids [19, 24, 49].

The cationic surfactant DC modified the skin wettability and induced a skin defatting effect while neither modifying the skin lipid organization nor extracting epidermal lipids. This surfactant had a detergency effect and remained on the skin surface.

The nonionic surfactants, Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil and Hydrogenated lecithin were able to mix with the lipid matrix without removing the hydrolipidic film or the epidermal lipids. PEG-100 stearate and the anionic surfactant SSL were retained on the skin surface, increasing the skin polarity without any further interaction with the lipids.

Finally, some surfactants had no effect on the lipoidal pathway such as poly(oxyethylene)-20 sorbitan laurate or PEG-12 dimethicone, meaning that they are not able to penetrate the skin.

The lower skin irritation by PEG stearates with large PEG headgroups [50] suggested that the bulky PEG headgroup inhibited the penetration of these surfactants into the SC lipid matrix.

Table 3. Effect of surfactants on the skin barrier at three different levels. A darker the box marks a stronger the effect of surfactants.

	Skin surface polarity	Lipid matrix disorganization	Lipid extraction	Conclusion
<b>Sodium lauryl sulfate</b>				Detergent, mix with the lipid matrix and extraction of epidermal lipids
<b>Sodium stearyl lactylate</b>			Total	Remain on skin surface
<b>Cetyl trimethyl ammonium chloride</b>				Detergent, mix with the lipid matrix and extraction
<b>Distearyldimonium chloride</b>			Total + TG	Detergent and remain on skin surface
<b>Laureth-23</b>				Mix to the lipid matrix without defatting the skin surface
<b>Polyoxyethylene sorbitan laurate</b>			Ceramides	No effect on skin barrier
<b>PEG-100 stearate</b>				Remain on skin surface
<b>PEG-12 dimethicone</b>				No effect on skin barrier
<b>PEG-25 hydrogenated castor oil</b>			Total	Mix to the lipid matrix without defatting the skin surface
<b>Hydrogenated lecithin</b>			Ceramides	Mix to the lipid matrix without defatting the skin surface

## Conclusion

The effects of surfactants on the lipoidal pathway were investigated by three techniques. Two ionic surfactants (SLS and CTAC) considered as very toxic were responsible for an increase of the skin polarity explained both by the removal of the sebaceous and epidermal lipids and by the perturbations of the organization of the lipid matrix. One cationic surfactant (DC) displayed a detergency effect without disturbing the skin barrier. Some nonionic surfactants disturbed the lipid matrix organization and modified the skin wettability without any extraction of the skin lipids. This result may explain the role of such surfactants as penetration enhancers. A nonionic surfactant (PEG-100 stearate) and an anionic surfactant (SSL) were retained on the skin surface without any further interaction with the skin lipids, modifying only the surface properties of the skin. Finally, two nonionic surfactants (PEG-12 dimethicone and polyoxyethylene sorbitan laurate) did not have any effect on the investigated parameters. Studying the skin barrier function by considering three skin parameters, the polarity, the lipid composition of the skin and the organization of the lipid matrix, showed that surfactant could act through several physicochemical mechanisms to disturb the skin barrier function.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Johnson & Johnson for their financial support. We are grateful to Jocelyne Pelletier for her help with the HPLC-ELSD analyses.

## References

1. Ananthapadmanabhan, K.P., Moore, D.J., Subramanyan, K., Misra, M., Meyer, F., 2004. Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatol. Ther.* 17, 16–25.
2. Williams, A.C., Barry, B.W., 2012. Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 128–137.
3. Elias, P.M., 1983. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 80, 44s–49s.
4. Pilgram, G.S.K., Van Pelt, A.M.E., Bouwstra, J.A., Koerten, H.K., 1999. Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J. Invest. Dermatol.* 113, 403–409.
5. Norlén, L., 2001. Skin barrier structure and function: the single gel phase model. *J. Invest. Dermatol.* 117, 830–836.
6. Bouwstra, J.A., Ponc, M., 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Sphingolipids, Apoptosis and Disease* 1758, 2080–2095.
7. Gooris, G.S., Bouwstra, J.A., 2007. Infrared spectroscopic study of stratum corneum model membranes prepared from human ceramides, cholesterol, and fatty acids. *Biophys. J.* 92, 2785–2795.
8. Feingold, K.R., 2007. Thematic review series: Skin Lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res.* 48, 2531–2546.
9. Boncheva, M., Damien, F., Normand, V., 2008. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1344–1355.
10. Damien, F., Boncheva, M., 2010. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 130, 611–614.
11. Groen, D., Poole, D.S., Gooris, G.S., Bouwstra, J.A., 2011. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1529–1537.
12. Ananthapadmanabhan, K.P., Yu, K.K., Meyers, C.L., Aronson, M.P., 1996. Binding of surfactants to stratum corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 47, 185–200.
13. Blake-Haskins, J.C., Scala, D., Rhein, L.D., Robbins, C.R., 1986. Predicting surfactant irritation from the swelling response of a collagen film. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 37, 199–210.
14. Corazza, M., Lauriola, M., Zappaterra, M., Bianchi, A., Virgili, A., 2010. Surfactants, skin cleansing protagonists. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 24, 1–6.
15. Otzen, D., 2011. Protein–surfactant interactions: A tale of many states. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1814, 562–591.
16. Wilhelm, K.-P., Cua, A.B., Wolff, H.H., Maibach, H.I., 1993. Surfactant-induced stratum corneum hydration in vivo: Prediction of the irritation potential of anionic surfactants. *J. Invest. Dermatol.* 101, 310–315.

17. de Jongh, C.M., Jakasa, I., Verberk, M.M., Kezic, S., 2006. Variation in barrier impairment and inflammation of human skin as determined by sodium lauryl sulphate penetration rate. *Br. J. Dermatol.* 154, 651–657.
18. Lévêque, J.L., de Rigal, J., Saint-Leger, D., Billy, D., 1993. How does sodium lauryl sulfate alter the skin barrier function in man? A multiparametric approach. *Skin Pharmacol. Physiol.* 6, 111–115.
19. Mao, G., Flach, C.R., Mendelsohn, R., Walters, R.M., 2012. Imaging the Distribution of Sodium Dodecyl Sulfate in Skin by Confocal Raman and Infrared Microspectroscopy. *Pharm. Res.* 29, 2189–2201.
20. Nokhodchi, A., Shokri, J., Dashbolaghi, A., Hassan-Zadeh, D., Ghafourian, T., Barzegar-Jalali, M., 2003. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. *Int. J. Pharm.* 250, 359–369.
21. Walters, Russel M., Guangru Mao, Euen T. Gunn, and Sidney Hornby. 2012. Cleansing formulations that respect skin barrier integrity. *Dermatol. Res. Pract.* 2012: 495917
22. Abrams, K., Harvell, J.D., Shriner, D., Wertz, P., Maibach, H., Maibach, H.I., Rehfeld, S.J., 1993. Effect of organic solvents on in vitro human skin water barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 101, 609–613.
23. Gorcea, M., Hadgraft, J., Moore, D.J., Lane, M.E., 2013. In vivo barrier challenge and initial recovery in human facial skin. *Skin Res. Technol.* 19, e375–e382.
24. Friberg, S.E., Goldsmith, L., Suhaimi, H., Rhein, L.D., 1987. Surfactants and the stratum corneum lipids. *Colloids Surf.* 30, 1–12.
25. Maza, A. de la, Coderch, L., Lopez, O., Baucells, J., Parra, J.L., 1997. Permeability changes caused by surfactants in liposomes that model the stratum corneum lipid composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1–8.
26. Walters, K.A., Bialik, W., Brain, K.R., 1993. The effects of surfactants on penetration across the skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* 15, 260–271.
27. Froebe, C.L., Simion, F.A., Rhein, L.D., Cagan, R.H., Kligman, A., 1990. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatology* 181, 277–283.
28. Kragh-Hansen, U., le Maire, M., Møller, J.V., 1998. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. *Biophys. J.* 75, 2932–2946.
29. Fartasch, M., 1997. Ultrastructure of the epidermal barrier after irritation. *Microsc. Res. Tech.* 37, 193–199.
30. Mavon, A., Zahouani, H., Redoules, D., Agache, P., Gall, Y., Humbert, P., 1997. Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: A study on two anatomical sites. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 8, 147–155.
31. Rosenberg, A., Williams, R., Cohen, G., 1973. Interaction forces involved in wetting of human skin. *J. Pharm. Sci.* 62, 920–922.
32. Somasundaran, P., 2006. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. CRC Press.
33. Pappas, A., 2009. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* 1, 72–76.
34. Smith, K.R., Thiboutot, D.M., 2008. Thematic review series: Skin lipids. sebaceous gland lipids: friend or foe? *J. Lipid Res.* 49, 271–281.
35. Caussin, J., Gooris, G.S., Janssens, M., Bouwstra, J.A., 2008. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1472–1482.
36. Mendelsohn, R., Flach, C.R., Moore, D.J., 2006. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging.

- Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Vibrational Microscopic Imaging: Towards Molecular Pathology 1758, 923–933.
37. Merle, C., Baillet-Guffroy, A., 2009. Physical and chemical perturbations of the supramolecular organization of the stratum corneum lipids: In vitro to ex vivo study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 1092–1098.
  38. Moore, D.J., Mendelsohn, R., 1999. Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)* 208, 16–22.
  39. Norlén, L., Nicander, I., Lundsjö, A., Cronholm, T., Forslind, B., 1998. A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 508–516.
  40. Humbert, P., 2003. Conséquences fonctionnelles des perturbations des lipides cutanés. *Pathol. Biol., Mini-symposium - Colloque sur les Lipides de la peau - Lyon - mars 2002* 51, 271–274.
  41. Rawlings, A.V., Matts, P.J., Anderson, C.D., Roberts, M.S., 2008. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 5, e127–e136.
  42. Suhonen, T.M., Bouwstra, J.A., Urtti, A., 1999. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *J. Controlled Release* 59, 149–161.
  43. Ginn, M.E., Dunn, S.C., Jungermann, E., 1970. Contact angle studies on viable human skin: II. Effect of surfactant ionic type in pretreatment. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47, 83–85.
  44. Khyat, A.E., Mavon, A., Leduc, M., Agache, P., Humbert, P., 1996. Skin critical surface tension. *Skin Res. Technol.* 2, 91–96.
  45. Ananthapadmanabhan, K.P., Mukherjee, S., Chandar, P., 2013. Stratum corneum fatty acids: their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 337–345.
  46. Fulmer, A.W., Kramer, G.J., 1986. Stratum corneum lipid abnormalities in surfactant-induced dry scaly skin. *J. Invest. Dermatol.* 86, 598–602.
  47. Imokawa, G., Akasaki, S., Minematsu, Y., Kawai, M., 1989. Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch. Dermatol. Res.* 281, 45–51.
  48. Rawlings, A.V., Watkinson, A., Rogers, J., Mayo, A.-M., Hope, J., Scott, I.R., 1994. Abnormalities in stratum-corneum structure, lipid-composition, and desmosome degradation in soap-induced winter xerosis. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 45, 203–220.
  49. Moore, P.N., Puvvada, S., Blankschtein, D., 2003. Challenging the surfactant monomer skin penetration model: Penetration of sodium dodecyl sulfate micelles into the epidermis. *J. Cosmet. Sci.* 54, 29–46.
  50. Bárány, E., Lindberg, M., Lodén, M., 2000. Unexpected skin barrier influence from nonionic emulsifiers. *Int. J. Pharm.* 195, 189–195.

## Chapitre IV. L'impact des tensioactifs sur la barrière cutanée, une évaluation à plusieurs niveaux, quel lien avec la toxicité cutanée ?

**Contexte :** Les tensioactifs sont capables d'engendrer des réactions cutanées telles que la dermatite irritante de contact, régulièrement observée dans les maladies professionnelles où le contact avec les tensioactifs est fréquent. Le Stratum Corneum (SC), principal responsable de la fonction barrière de la peau contient des lipides intercornéocytaires dont le rôle dans le contrôle de la perméabilité de la peau est admis. Des progrès dans les techniques d'observation de la barrière cutanée permettent d'apprécier l'impact de certaines molécules, dont les tensioactifs sur la peau, au niveau moléculaire et structural. Les tensioactifs peuvent interagir avec les composants du SC, lipides et protéines, et entraîner des perturbations de la barrière cutanée pouvant expliquer les réactions d'irritation et d'inflammation observées. L'objectif de l'étude était d'approfondir les connaissances sur l'effet de plusieurs catégories de tensioactifs sur la barrière cutanée à trois niveaux différents et de relier ces effets à la toxicité du tensioactif.

**Méthodes :** Les effets de 4 tensioactifs ioniques et 5 non ioniques ont été évalués après traitement d'explants de peau humaine par des solutions à 3% de tensioactif. Les propriétés de surface de la peau ont été évaluées grâce à des mesures d'angles de contact. La spectroscopie infrarouge a été choisie pour contrôler l'organisation des lipides du SC. L'extraction lipidique par les tensioactifs a été mesurée par des dosages d'HPLC-ELSD. La toxicité cutanée a été évaluée, sur des épidermes humains reconstruits, par mesure de viabilité cellulaire et de libération de marqueurs d'inflammation après traitement par des émulsions à 3% de tensioactifs.

**Résultats :** Deux tensioactifs ioniques ont augmenté la polarité de la peau en extrayant des lipides sébacés et épidermiques et en perturbant l'organisation lipidique de la matrice, ces tensioactifs ont également présenté une toxicité in vitro. Un autre tensioactif cationique était seulement détergent, sans s'insérer dans la matrice lipidique et ne provoquant pas de mortalité cellulaire ou d'inflammation. Plusieurs tensioactifs non ioniques se sont mélangés aux lipides matriciels, perturbant la fonction barrière et ont modifié la polarité de la peau sans aucune extraction lipidique. Ils ont tous été responsables de toxicité cutanée. Enfin deux tensioactifs non ioniques n'ont montré aucun effet sur la barrière cutanée ou sur la toxicité cutanée.

**Conclusion :** La toxicité des tensioactifs a pu être reliée à une altération de l'organisation de la matrice lipidique, les effets sur la polarité de surface de la peau ne sont eux pas corrélés à la toxicité.

# Importance of the intercellular pathway in the toxicity of surfactants

**E. Lémery<sup>1,2</sup>, S. Briançon<sup>1</sup>, Y. Chevalier, T. Oddos<sup>2</sup>, A. Gohier<sup>2</sup>, O. Boyron<sup>3</sup>, J. Pelletier<sup>1</sup>, M.-A. Bolzinger<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Université de Lyon F-69008, Lyon, France; Université Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie, F-69008, Lyon, France; UMR CNRS 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), F-69622 Villeurbanne, France.

<sup>2</sup> Johnson & Johnson Santé Beauté France. Campus de Maigremont, F-27100 Val de Reuil, France.

<sup>3</sup> Université de Lyon, Université. Lyon 1, CPE Lyon, CNRS UMR 5265, Laboratoire de Chimie Catalyse Polymères et Procédés (C2P2), F-69616 Villeurbanne, France.

## Soumis dans Contact Dermatitis

### Abstract

*Background:* Cleansers and emulsions may elicit skin condition like irritant contact dermatitis or inflammation because of the presence of surfactants in the formulations. They are mainly caused by surfactants interactions with either skin lipids or skin proteins in the stratum corneum. It is known that surfactant can cause barrier damage and therefore skin irritation role, by impairing the structural organization of intercorneocyte skin lipids, increasing stratum corneum (SC) permeability.

*Objective:* To improve the knowledge on the effect of several classes of surfactant on the skin lipids barrier and link it with skin toxicity.

*Methods:* The effects of five nonionic and four ionic surfactants were evaluated after treatment of human explant with surfactant solutions. Skin surface wettability and polarity were assessed through contact angle measurements. Infrared spectroscopy allowed monitoring the SC lipid organization. The lipid extraction potency of surfactants was evaluated thanks to HPLC-ELSD assays. The skin toxicity was assessed by means of four in vitro assays, MTT and LDH test of cell viability, and detection of the inflammation markers IL-1 $\alpha$  and IL-8 on RHE treated by simple emulsion.

*Results:* We observed that some surfactants were not toxic but can modify skin polarity and for one of them, a cationic surfactant, displayed a detergency effect. Two nonionic surfactants did

not show any effect on the investigated parameters. Other surfactants ionic and nonionic were toxic because they mixed with the lipid matrix disturbing the barrier function with or without extraction of epidermal lipids. The skin toxicity of surfactant is not linked to the class of surfactant but with their impact on skin barrier.

*Conclusion:* The most important parameter explaining skin toxicity of surfactants seemed to be their ability to mix with the lipids and disturb the lipid matrix organization more than their lipids extraction potency or their effect on skin polarity.

*Keywords:* contact angle, infrared spectroscopy, in vitro skin toxicity, lipid extraction, skin barrier function, surfactants

## **1. Introduction**

Due to their ability to stabilize cosmetic formulations such as emulsions or to remove dirt, sweat, sebum, and oils from the skin surface, surfactants are widely used ingredients in cosmetic and hygiene products. It is well-documented that cleansers and emulsions may elicit skin condition like irritant contact dermatitis or inflammation because of the presence of surfactants in the formulations (Bárány et al., 2000; Boelsma et al., 1996). Clinical signs associated with these skin reactions vary from redness and dryness of the skin to chronic dermatitis associated with thickening and cracking. As example, hairdressers, health professionals or food industry workers are subjected to hand dermatitis caused by surfactants caused by their continuous, unprotected, exposure to surfactants in detergents or soaps (Agner, 1991; Bauer et al., 1996; Halkier-Søsenen and Thesirup-Pedersen, 1993; Maltén, 1981; Perrenoud et al., 2001; Saary et al., 2005, Rhein, 1997).

The origins of such skin conditions are the interactions of surfactants with either skin lipids or skin proteins in the stratum corneum. Interactions with endogenous materials of skin depend on the physicochemical properties of surfactants, especially their electrical charge and their amphiphilic properties (Imokawa et al., 1975; Wilhelm., 1994; Maza et al., 1997; Prottey and Ferguson, 1975; Rhein et al., 1986). On the one hand, they may denature key proteins and enzymes within the SC and bind to keratin filaments. On the other hand, interactions with the stratum corneum lipid species lead to skin barrier damage (Ananthapadmanabhan et al., 2004; de Jongh et al., 2006; Effendy and Maibach, 1995; Tupker et al., 1989; Wickett and Visscher, 2006; Wilhelm et al., 1993). The alteration of the skin barrier properties leads to increased penetration of further irritant species to deeper epidermal layers. This mechanism gives a clue to understanding how the skin barrier function damage is linked to skin irritation and inflammation

(Corazza et al., 2010; Walters et al., 2012). Indeed, several experimental reports showed a close relationship between the weakening of the skin barrier and the expression of cytokines and inflammation markers (Nickoloff and Naidu, 1994; Wilmer et al., 1994). For example, cytokine release to varying concentrations of the irritant and/or time of exposure is strongly related to the maintenance of the stratum corneum barrier function (Ponec and Kempenaar, 1995).

Previous studies mainly focused on the skin irritancy effect of ionic surfactants such as alkyl sulfates or soaps. Irritancy was better linked to protein damage rather than interaction with the lipids of the SC. The charge of the polar head group was pointed out as responsible for interaction with the proteins in the SC, leading to a swelling of the cell membrane and toxicity expressed by cellular lysis and release of inflammation markers (Ananthapadmanabhan et al., 2004; Faucher and Goddard, 1978; Imokawa and Hattori, 1985; Wilhelm et al., 1993). Comparatively the intercellular pathway was less investigated concerning skin irritation even if several researchers reported that irritation induced by surfactants may involve both disorganization of lipids increasing the SC permeability and denaturation of keratin (de Jongh et al., 2006; Lévêque et al., 1993; Mao et al., 2012; Nokhodchi et al., 2003; Purohit et al., 2014; Walters et al., 2012).

The exact mechanisms by which surfactants act on the epidermal lipids and then lead to skin toxicity is still under debate, partly because the precise organization of the lipid domains as orthorhombic, hexagonal or fluid crystalline phases is still under investigation. Two different mechanisms involving surfactants have been proposed: the penetration of surfactants into the intercellular lipid matrix of the SC disturbs its organization by mixing with the SC lipids and/or the surfactants solubilize and extract components of the endogenous lipids in the SC or at the skin surface (Boncheva et al., 2008; Bouwstra and Ponec, 2006; Damien and Boncheva, 2010; Groen et al., 2011; Walters et al., 2012; Wickett and Visscher, 2006). Two main classes of lipids are present in the skin: the surface lipids mostly derived from the sebaceous glands comprising triglycerides (TG, 45-50%), wax esters (25%), squalene (12%), cholesterol (CHOL, < 5%) and free fatty acids (FFA, 10%), and the lipids of the intercellular matrix predominantly composed of ceramides (CER), free fatty acids (FFA) and cholesterol (CHOL) in equal proportions (30-35% each) (Pappas, 2009).

Such effects of surfactants have been well-documented for harsh ionic surfactants like sodium lauryl sulfate. However since the eighties, mild surfactants are currently used instead of alkylsulfonates and alkylsulfates to decrease irritancy. The behavior in the skin of these mild surfactants is less documented (Ananthapadmanabhan et al., 2004, 1996; Blake-Haskins et al., 1986; Corazza et al., 2010; Effendy and Maibach, 1995; Otzen, 2011; Wilhelm et al., 1993).

The objective of this study was to better understand properties of current surfactants widely used in creams, ointments or cleansers for their mildness. The links between their effects on the surface and epidermal lipids and their in vitro toxicity was particularly addressed.

Effects of skin exposure to 9 ionic and nonionic surfactants on the skin barrier were evaluated at three different levels: the modification of the surface properties of skin, the lipid extraction and the disorganization of the lipid matrix by absorption of the surfactant inside SC. The polarity of the skin surface was first investigated as it can be modified by several possible phenomena: a detergency effect, the adsorption of the surfactants on skin surface, and the absorption into the lipid matrix and, finally by extraction of lipids (Mavon et al., 1997; Rosenberg et al., 1973; Somasundaran, 2006). The quantitative analysis of SC lipids remaining inside skin after exposure to a surfactant solution was performed in order to evaluate which lipid classes are mostly extracted in relation to the type of surfactant. Squalene and TG amounts were quantified by HPLC-ELSD as markers of the sebaceous lipids and then of the detergency effect of each surfactant. CHOL and CER were used as markers of the epidermal lipids (Norlén et al., 1998). The lipid organization in the SC was investigated through ATR-FTIR spectroscopy of the skin. The infrared spectrum is sensitive to the lateral chain packing and the conformational order of the lipids; it was therefore used to investigate the fluidizing effect of surfactants (Boncheva et al., 2008). Skin toxicity was evaluated through in vitro tests on Human Reconstructed Epidermis; both irritancy (detection of interleukins) and cytotoxicity (MTT, LDH) tests were performed.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Surfactants**

Nine surfactants having different physicochemical properties were selected.

Four ionic surfactants:

- two anionic surfactants: Sodium lauryl sulfate (SLS, Texapon K12 P) from BASF (St. Augustin, Germany) and Sodium stearyl lactylate (SSL, Dermofeel SL) from Lucas Meyer Cosmetics (Champlan, France).
- two cationic surfactants: Distearyltrimonium chloride (DC, Varisoft TA 100) and Cetyl trimethyl ammonium chloride (CTAC, Varisoft 300), both from Evonik Industries AG (Essen, Germany).

Five non-ionic surfactants: Laureth-23 (Lipocol L23) from Lipo Chemicals Inc. (Paterson, NJ), Polyoxyethylene sorbitan laurate (Tween 20) and PEG-25 hydrogenated castor oil (Croduret 25) from Croda France SAS (Trappes, France), PEG-12 Dimethicone (Gransurf 61) from Grant

Industries Inc. (New Jersey, USA), and Hydrogenated Lecithin (Emulmetik 320) from Lucas Meyer Cosmetics (Champlan, France).

All surfactants were used as received without further treatment such as purification.

## 2.2. Assessment of toxicity to skin

In vitro skin toxicity experiments were conducted on Reconstructed Human Epidermis (RHE) exposed to a simple o/w emulsion stabilized by the above surfactants.

### 2.2.1. Emulsion preparation

O/W emulsions (200 g total mass) were prepared using a Rayneri Turbotest, model 33/ 300. They all contained 3% of surfactant, 20% of caprylic/capric triglycerides (Miglyol 812 N) from Sasol Germany GmbH (Witten, Germany), 0.5% of xanthan gum (Keltrol CG) from CP Kelco US Inc. (Atlanta, USA), and 76.5% of deionized water. This concentration of surfactant was above the CMC for each surfactant; the surfaces of oil droplets were all saturated by adsorbed surfactants and residual micelles and monomers of excess surfactant were present in the aqueous phase. Oil-soluble surfactants were added to the oil phase which was heated at 75°C; then poured into hot deionized water (75°C) containing the thickening agent while stirring at 400 rpm. The emulsion was subsequently stirred at 800 rpm while cooling until it reached room temperature. The pH was adjusted to between 5 and 7 using an aqueous solution of sodium hydroxide or citric acid when necessary in order to be free of the influence of pH variations on skin toxicity. Water-soluble surfactants were added to hot deionized water (at a temperature between 50 and 75°C, depending on supplier recommendations). The thickening agent was then added and the aqueous solution stirred at 400 rpm. Oil was heated at the same temperature as the aqueous solution. It was then poured into the aqueous solution and stirred at 800 rpm until the mixture reached room temperature. For the same reasons as mentioned above, the pH was adjusted to between 5 and 7 with the addition of an aqueous solution of sodium hydroxide or of citric acid as necessary.

No preservative was added to the emulsions because their presence could alter the toxicity results. The emulsions were therefore used rapidly (within 3 days) after their preparation.

### 2.2.2. Cytotoxicity studies in vitro

Cytotoxicity tests were conducted on Reconstructed Human Epidermis (RHE) tissues. Upon delivery, RHE devices were transferred into 3 mL of RHE aqueous growth medium, free from antibiotics and hydrocortisone, and used immediately in surfactant exposure experiments. For each surfactant, three Reconstructed Human Epidermis (RHE) tissues were exposed to 10  $\mu$ L of emulsion containing 3% of surfactant deposited at the center of the skin sample and left on the RHE during all the incubation duration. Four untreated RHE inserts were used as controls. Each sample was placed in 3 mL of aqueous growth medium and incubated at 37°C, in the presence of 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity, for 72 h.

*Cell viability: MTT method:*

A solution of MTT at 5 mg.mL<sup>-1</sup> in PBS was prepared. 500  $\mu$ L of the diluted solution (to 500  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) was transferred into each well and the RHEs were immersed in the wells. After three hours incubation at 37°C and in the presence of 5% CO<sub>2</sub>, to dissolve the purple formazan product, the mixtures containing the RHEs were shaken for 30 min with isopropanol at room temperature. The absorbance of the resulting solutions was measured at a wavelength of 540 nm with a microplate reader (Berridge and Tan, 1993).

The cell viability was determined from the relationship:

$$x = \frac{\text{mean of Absorbance values of treated skin (n=3)}}{\text{mean of Absorbance values of untreated skin (n=4)}}$$

*Inflammation*

Collected RHE growth medium was analyzed for interleukin-1 (IL-1 $\alpha$ ) known to be a primary inflammation marker and the delayed inflammation marker interleukin-8 (IL-8), using the Fluorokine MAP Human Base Kit A and analyzed on the Bioplex-200 (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France), a flow cytometry using a Luminex Multi-Analyte Profiling technology. The same equation as mentioned above (Eq 1) was used to evaluate the effect of surfactants on IL-1 $\alpha$  and IL-8 releases.

### 2.3. Evaluation of the skin barrier function

Experiments were performed on human skin explants treated with aqueous surfactant solutions at 3% then heated between 50 to 70°C according to the surfactant. The concentration for each surfactant was much higher than CMC.

#### 2.3.1. Human skin sample preparation

Excised skin samples from human breast, thigh and abdomen were purchased at the Laboratoire des Substituts Cutanés (Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France), or were provided by Clinique de l'Europe (Rouen, France). They were obtained after surgical intervention with the full consent of each patient, both male and female patients (9 donors of age range 24–56 years). All human donors were anonymous. Skin samples were collected within 12 h after surgery. Skin samples were kept at 4°C during their transportation to the laboratory. The hypodermis was removed from the skin.

### 2.3.2. Surface free energy measurements by contact angle measurements

#### *Skin exposure to surfactants*

The skin samples were mounted on Franz-type static glass diffusion cells (Laboratoire Verre Labo Mula, Corbas, France) with a diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup>. 50 µL of each aqueous surfactant solution at 3% were poured into the donor compartment. The receptor compartment was filled with deionized water. The diffusion cells were maintained during 20 to 22 h at 40°C in a water bath in order to get a skin surface temperature of 32 ± 1°C.

After incubation, Franz cells were dismantled. The skin explants were rinsed with deionized water and gently wiped 3 times with absorbent paper to eliminate the residual solution. Water treatment was used for the control sample.

#### Contact angle measurements

The contact angles and interfacial tension were measured using a Drop Shape Analysis System DSA10Mk2 (Krüss GmbH, Germany). A drop of standard liquid (volume 5–6 µL) was carefully deposited on the skin surface with a syringe. The drop shape was recorded with a high-speed framing camera and analyzed for the contact angle. The contact angle was defined as the angle between the skin surface and the tangent to the surface of the drop. Each experiment was repeated in sixplicate.

#### Surface free energy calculation

The surface free energy of solids was split into its dispersive and polar components according to Owens, Wendt, Rabel and Kaelble. It is assumed that the interaction energy between two molecules apart from the interface is the geometric mean of the interactions between identical molecules (in the pure liquids). This standard method allows for the calculation of the surface free energy of a solid from the measurement of its contact angle with several liquids. Such a

methodology provides an evaluation of the wetting properties and the polarity of the skin. The surface free energy of each phase (liquid and solid) is separated into its two components:

- the dispersive component  $\gamma_l^d$  and  $\gamma_s^d$
- the polar component  $\gamma_l^p$  and  $\gamma_s^p$

$$\gamma_{s-l} = \gamma_s + \gamma_l - 2\sqrt{\gamma_s^d \sigma_l^d} - 2\sqrt{\gamma_s^p \sigma_l^p} \quad (1)$$

The contact angle  $\theta$  is given by the Young's equation

$$\gamma_s = \gamma_{s-l} + \gamma_l \cos \theta \quad (2)$$

After some simple algebra, the measured contact angle is expressed as a function of the two components  $\gamma_s^d$  and  $\gamma_s^p$  of the surface free energy of skin. A linearized relationship allowing an easy determination of  $\gamma_s^d$  and  $\gamma_s^p$  by a linear regression reads

$$\frac{(1+\cos \theta)\gamma_l}{2\sqrt{\gamma_l^d}} = \sqrt{\gamma_s^p} \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad (3)$$

Contact angles of several liquid drops are measured in order to plot this expected linear relationship. The assumptions of the theory are considered valid if the data points give a fair linear behavior. Then the slope is  $\sqrt{\gamma_s^p}$  and  $y$ -intercept is  $\sqrt{\gamma_s^d}$ . The total surface free energy is the sum of the two contributions,  $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$ .

This method has already been applied to determine the dispersive and polar components of the free energy of skin before and after treatment with surfactant solutions and diethyl ether (Mavon et al., 1997). The following standard liquids were used: deionized water, diiodomethane (99%) from Alfa Aesar (Schiltigheim, France), glycerol (99.5%), tritolyl phosphate (99%) and formamide (99.5%) from Thermo Fisher Scientific (Geel, Belgium), *n*-dodecane from Fluka (St Quentin Fallavier, France). The densities of the standard liquids are given in Table 1, together with the mean values of the three parameters of the skin surface, total surface free energy, and its dispersive and polar components.

#### 2.3.4. Evaluation of the lipid matrix structure by IR-ATR spectroscopy

##### *Skin exposure to surfactants*

Each skin sample was treated with 50  $\mu\text{L}$  of surfactant solution at 3% for 1 h at room temperature. The samples were rinsed and gently wiped 3 times before the ATR-IR analysis. 4 or 5 samples of skin were used for each surfactant solution.

#### *ATR-IR analysis*

All spectra were collected with a spectral resolution of  $2\text{ cm}^{-1}$  and an average of 64 scans using a Nicolet IS50 FTIR (ThermoFischer Scientific) equipped with a DLaTGS detector and an attenuated total reflection (ATR) diamond crystal accessory. The whole instrument was maintained dry and free of carbon dioxide by a permanent flow of dry nitrogen.

The skin samples were placed, SC-side down, onto the diamond ATR crystal, held in place with the flat sapphire anvil, and the IR spectrum from the skin samples was collected. The same pressure was applied on top of samples (torque setting of 0.5 N.m corresponding to a pressure of 1.5 kbar applied over the diamond surface) so as to ensure a reproducible contact between the sample and the ATR crystal.

#### *Data treatment*

The position of the  $\text{CH}_2$  symmetric stretching band was determined in the spectra previously baseline-corrected. In the scissoring region ( $1480\text{-}1460\text{ cm}^{-1}$ ), second derivatives of the spectra were calculated without smoothing. The second-derivative spectra were baseline-corrected between the endpoints of the scissoring region, and normalized to identical minima and maxima. The bandwidth at 50% of the peak height (denoted as FW-50) was then determined according to Boncheva et al. (2008).

#### *Data analysis*

Several zones of interest in the spectrum were selected. A first band at  $2849\text{-}2855\text{ cm}^{-1}$  corresponding to symmetric stretching vibration of  $\text{CH}_2$  is sensitive to the lipid chain lateral packing and conformational order. This band shifts to higher wavenumbers as the lipid chains get more disordered. The transitions from OR phase to HEX and to LIQ phase can be detected in this way. A shift from  $2849.8$  to  $2850.5\text{ cm}^{-1}$  indicates the lipid transition from orthorhombic to hexagonal packing. A further shift from  $2850.7$  to  $2854.2\text{ cm}^{-1}$  is characteristic of a transition to a disordered liquid state (Caussin et al., 2008).

The scissoring vibrations of  $\text{CH}_2$  found between  $1462$  and  $1473\text{ cm}^{-1}$  are also sensitive to the same transitions. The transition from two bands to a single one indicates the transition between

the OR phase and the HEX phase. This later band shifts to higher wavenumber at the transition to the LIQ phase. The scissoring bandwidth at 50% of the peak height, FW-50, was also determined as a descriptor of the lipid organization. A low FW-50 indicates a disorganized lipid matrix (Boncheva et al., 2008; Mendelsohn et al., 2006; Merle and Baillet-Guffroy, 2009; Moore and Mendelsohn, 1999).

### 2.3.5. Lipid extraction: evaluation by HPLC/ELSD

#### *Solvents and standards*

Isopropanol (VWR, France), *n*-butanol (Merck, Darmstadt, Germany) and *n*-hexane (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium) of HPLC grade were used as mobile phase without further purification. Other solvents, dichloromethane, chloroform and methanol (Fisher Scientific, France) used for the extraction and purification were of analytical grade. Tristearin, cholesterol, cholesteryl palmitate were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), ceramides II [NS], IIIa [NP], IIIb, and VI [AP] were kindly given by Evonik (Essen, German), lignoceric acid, oleic acid and tricosanoic acid were purchased from Interchim (France).

#### *Skin exposure to surfactants and extraction of lipids*

The skin samples were mounted on Franz-type static glass diffusion cells (Laboratoire Verre Labo Mula, Corbas, France) with a diffusion area of 2.54 cm<sup>2</sup>. 50 µL of each surfactant solution at 3% concentration were poured into the donor compartment. The diffusion cells were maintained during 20 to 22 h at 40°C in a water bath in order to get a skin surface temperature of 32 ± 1°C. After incubation, the diffusion cells were dismantled. Skin explants were rinsed with deionized water and gently wiped 3 times with absorbent paper to eliminate all traces of solution. The stratum corneum and the epidermis (SC+E) were separated by maintaining the skin sample into hot water (60°C) for 45 s.

Lipids were extracted from the SC+E into several successive baths of 2 mL chloroform/methanol mixtures (2:1-1:1-1:2) and 100% methanol for 30 min intervals at room temperature in ultrasonic tub. All baths were gathered together and evaporated. The dry extract was dissolved into 500 µL of dichloromethane/methanol mixture (2:1), filtered and put into vials for HPLC measurement. The surfactant solution which was in contact with the skin for 22 h was not analyzed by HPLC-ELSD because the concentration of lipids in the solution was below the limit of detection.

### *HPLC-ELSD analysis*

The lipid extracts were analyzed using high pressure liquid chromatography with a 5  $\mu\text{m}$  Halo Penta-HILIC 4.6 x 150 mm (Advanced Materials Technology, USA) followed by a Lichrosphere 100 DIOL, 5  $\mu\text{m}$ , Hibart RT 250-4 column, (Merck, Darmstadt, Germany). The HPLC set up from Waters (Saint Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters 717 autosampler injector, a Waters 600 pump with gradient controller and an ELSD detector (2424 ELS Detector Waters, USA). The temperature of the drift tube was set at 70°C, nebulizer cooling and pressure at 50 psi. A combination of two vessels were used: A hexane and B, hexane/isopropanol/*n*-butanol (77.5 : 12.5 : 10; v/v/v). The flow rate was kept constant at 1.4 mL.min<sup>-1</sup> throughout the program. The elution gradient was delivered from 95% of A and 5% of B to 55% of A and 45% of B to finish by 98% of A and 2% of B. This gradient allowed the separation of the squalene, cholesterol ester, triglycerides (TG), cholesterol (CHOL), and Ceramides (CER) (a first group composed of Cer II, Cer IIIa and IIIb and a second group composed of Cer VI).

The signal of the photomultiplier was recorded under a gain of 1, and integrated using the software Empower Pro 2 (Waters, USA) (adapted from Norlén, 1998).

To ensure high accuracy, calibration curves for each class of lipids were run daily. Coefficients of correlation were calculated for all calibration curves to ensure linearity in the concentration ranges used (Squalene: 600-6  $\mu\text{g}$ , Cholesterol ester: 1300-13  $\mu\text{g}$ , TG: 1550-15.5  $\mu\text{g}$ , CHOL: 2300-2.3  $\mu\text{g}$ , CER 1<sup>st</sup> group: 495-0.495  $\mu\text{g}$ , Ceramide VI: 165-0.165  $\mu\text{g}$ ),  $R$  (mean) = 0.996. The limit of detection for each class of lipids were (Squalene: 14 ng.mL<sup>-1</sup>; Cholesterol ester: 115 ng.mL<sup>-1</sup>; TG: 60 ng.mL<sup>-1</sup>; CHOL: 540 ng.mL<sup>-1</sup>; CER (1<sup>st</sup> group: 580 ng.mL<sup>-1</sup>; Ceramides VI: 165 ng.mL<sup>-1</sup>).

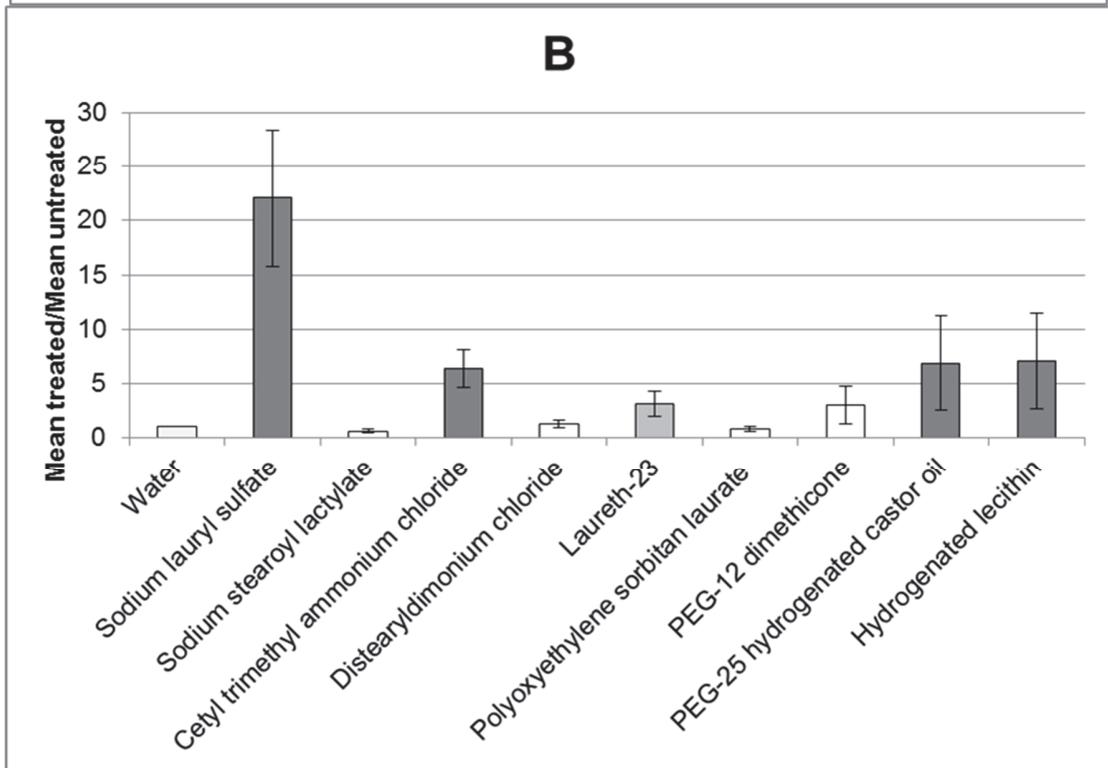
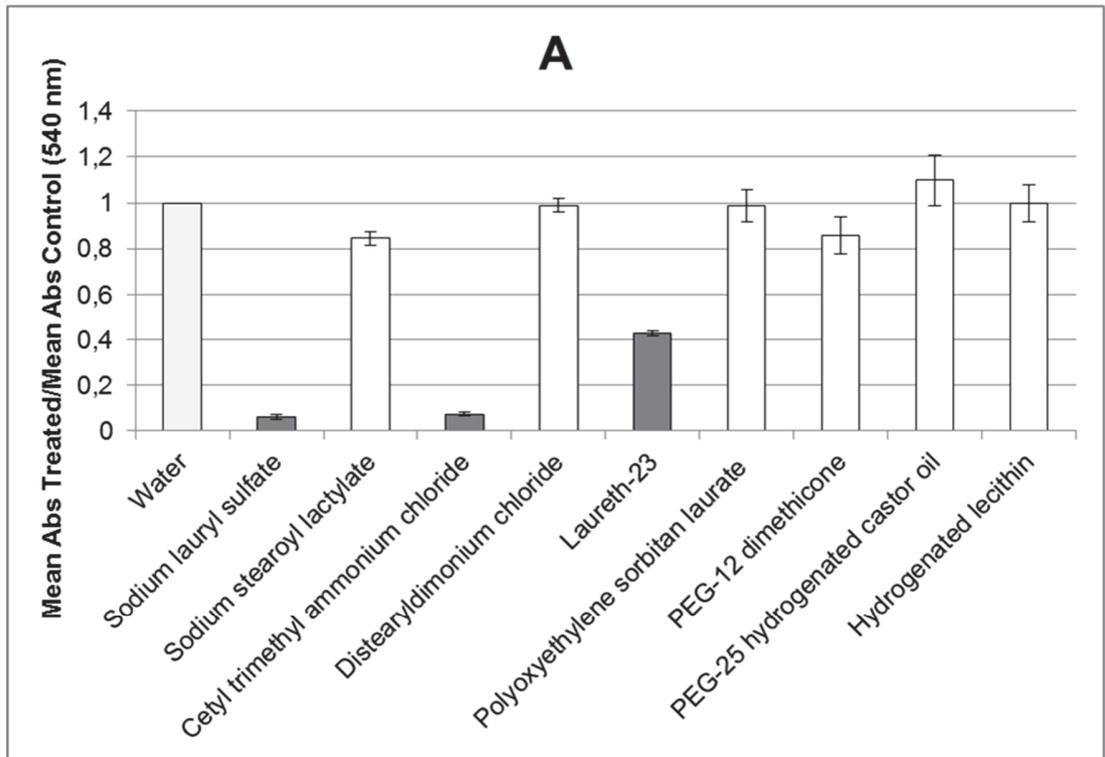
Five skin samples were used for each surfactant. The average amount of lipids in the SC + Epidermis (E) and the relative percentages of the different lipid classes recovered in the SC + E pieces after each surfactant treatment were determined.

For each experiment, the means of all data are indicated with their standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by using the unpaired Student's *t*-test. The level of significance was  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1. In vitro evaluation of toxicity to skin**

The toxicity of surfactants was evaluated in vitro by using reconstructed human epidermis through 2 parameters, the cell viability, and the release of inflammation markers (IL-1 $\alpha$  and IL-8). The results are reported in Fig 1.



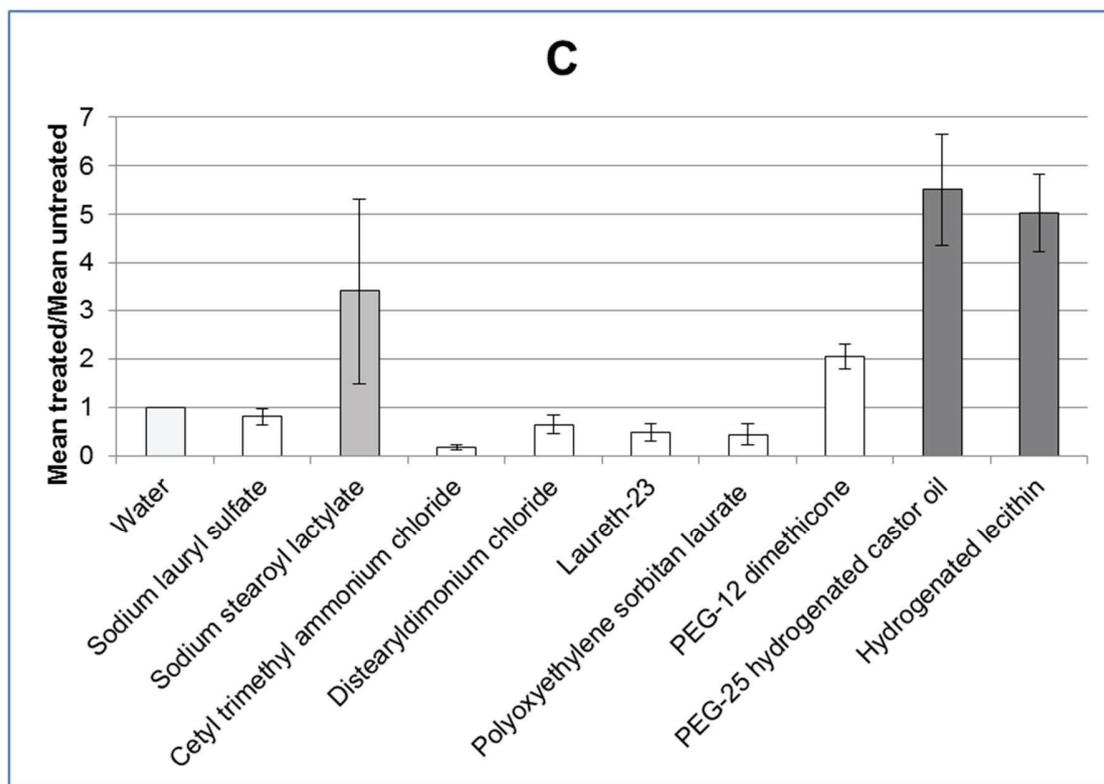


Fig 1. Influence of the type of surfactant on RHE viability (MTT) (A) extracellular release of IL-1 $\alpha$  (B) and IL-8 (C). The dark grey bars represent surfactants showing a strong effect on these two parameters, the bright grey bars represent surfactants showing a slighter effect. For cell viability, the threshold of significance was 0.5, meaning that surfactants responsible for more than 50% of cell mortality were considered to have a significant effect. A value higher than 1 corresponds to a production of IL-1 $\alpha$  or IL-8 induced by the surfactant. The frequency distribution of the IL-1 $\alpha$  and IL-8 values was bimodal; the threshold of significance was chosen as the Interleukin value corresponding to the minimum of frequency in between the two populations. Such threshold of significance was 3.

Fig 1A shows the relative cell viability obtained after RHE treatment with each emulsion containing 3% of surfactant. The ratio is expected close or equal to 1 for non-toxic surfactant-based emulsions. Three surfactants out of nine were responsible for important cell mortality ranging from 60% for Laureth-23 to 93% for CTAC and 95% for SLS. Figures 1B and 1C illustrate the relative inflammation potency of the surfactants considering IL-1 $\alpha$  and IL-8 releases. Considering the release of the marker of immediate irritancy IL-1 $\alpha$ , two ionic surfactants were responsible for a noticeable IL-1 $\alpha$  release from 6 to 22 times larger than the control RHE. Laureth-23 was responsible for a production of IL-1 $\alpha$  near the threshold at 3.1. Two non-ionic surfactants, the hydrogenated lecithin and the PEG-25 hydrogenated castor oil, which

did not have any effect on the cell viability, induced the production of immediate inflammation markers. The IL-1 $\alpha$  release was around 7 times larger than the control RHE for these two surfactants (Fig 1B). Moreover these surfactants were also the only ones causing a noticeable increase (around 5 times larger than the control RHE) of IL-8 release, the delayed inflammation marker. SSL was borderline considering the production of IL-8, with a release 3.4 times larger than the control RHE.

Among the 9 surfactants studied, only three had no effect on any parameters: DC, for ionic surfactants and Polyoxyethylene sorbitan laurate and PEG-12 dimethicone for the non-ionic surfactants.

### 3.2. Evaluation of skin barrier function

Surfactant effect on the skin barrier function has been evaluated through three experimental methods to human skin explants: the surface polarity of skin, the skin lipid extraction and the skin lipid organization.

#### 3.2.1. Surface polarity of skin

The skin polarity values after exposure to the surfactant solutions are reported in Table 1.

Table 1. Polarity of the skin surface after exposure to the surfactant solution. Bold type represents results with significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ )

surfactants	Skin surface polarity
Water	29.2% $\pm$ 2.8
Sodium lauryl sulfate	<b>59.4%<math>\pm</math>2.1</b>
Sodium stearoyl lactylate	<b>56.5% <math>\pm</math> 2.6</b>
Cetyl trimethyl ammonium chloride	<b>62.9%<math>\pm</math>2.4</b>
Distearyldimonium chloride	<b>58.7%<math>\pm</math>2.1</b>
Laureth-23	<b>54.8%<math>\pm</math>3.7</b>
Polyoxyethylene sorbitan laurate	33.8% $\pm$ 5.1
PEG-12 hydrogenated castor oil	30.7% $\pm$ 4.2
PEG-25 hydrogenated castor oil	<b>51.3%<math>\pm</math>5.5</b>
Hydrogenated lecithin	<b>56.5%<math>\pm</math>4.3</b>

The polarity is the ratio of the polar component of the surface energy to total surface energy (the sum of the polar and the dispersive components). Below 50%, the skin was considered as an

apolar surface. The control skin exposed to pure water has a polarity value of 29%. The skin surface is naturally apolar as previously reported by (Rosenberg, Williams, and Cohen 1973).

Exposure to all ionic surfactants caused an increase of the skin polarity by a factor two. Skin polarity reached 59.4% for SLS and SSL, and reached 62.9% for CTAC.

Three non-ionic surfactants out of five also increased the skin polarity from 51.3% for PEG-25 hydrogenated castor oil to 56.5% for hydrogenated lecithin. Laureth-23 resulted in a polarity of 54.8%.

Polyoxyethylene sorbitan laurate and PEG-12 dimethicone did not modify the surface polarity of skin.

### 3.2.2. Lipid extraction evaluation

The lipid extraction potential of surfactants was evaluated by the measurement of the amounts of lipids remaining in the Epidermis (SC+E) of human skin explants after exposure to the solutions of surfactants. The results are reported on the Fig 2 as a difference between skin lipid content after exposure and in the control.

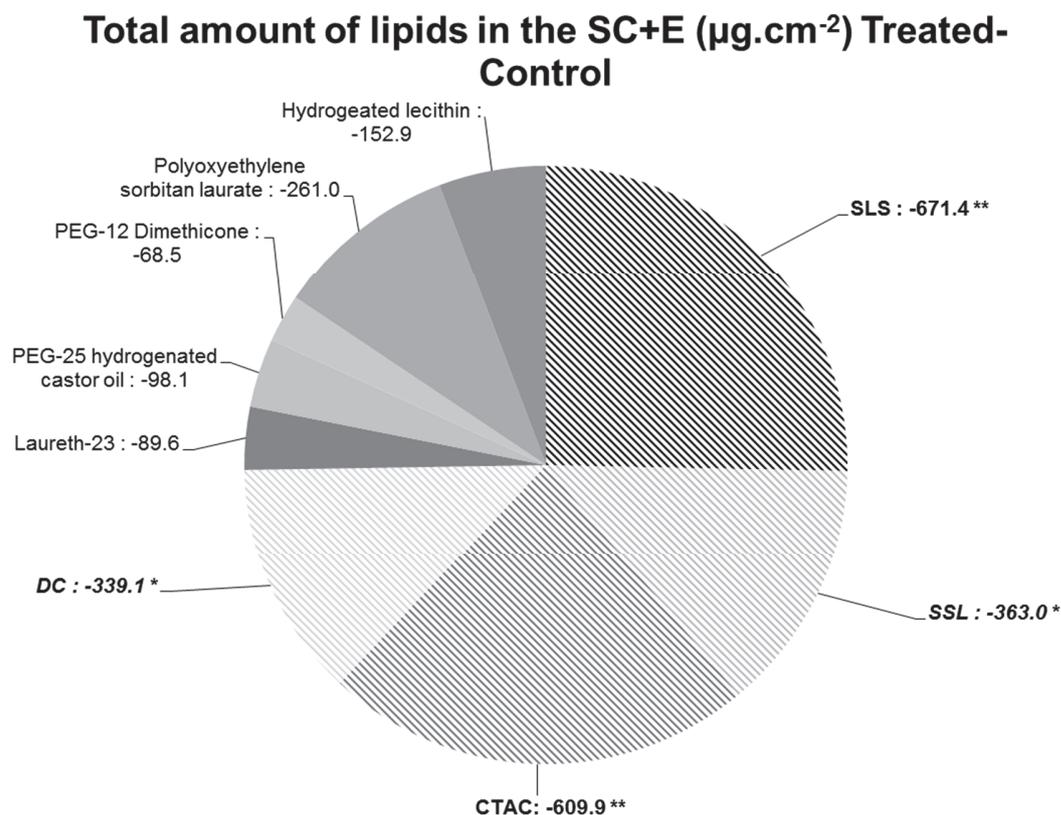


Fig 2. Amount of total lipids in the SC+E after exposure to the surfactant solutions, expressed as a difference with the control sample. Hatched areas represent ionic surfactant treatment. Bold type with two asterisks represents significant results ( $p < 0.05$ ), bold type with one asterisk represents almost significant results ( $p < 0.1$ )

Only two ionic surfactants extracted the skin lipids to a significant level. SLS and CTAC lowered the amount of lipids in the SC+E by a factor two compared to the control. DC and SSL removed about one third of the lipid content. The nonionic surfactants did not show any extraction potency.

Details about the lipid classes (sebaceous film or epidermal lipids) extracted by these 4 surfactants responsible for a noteworthy extraction of the total amount of lipids are reported in Fig 3.

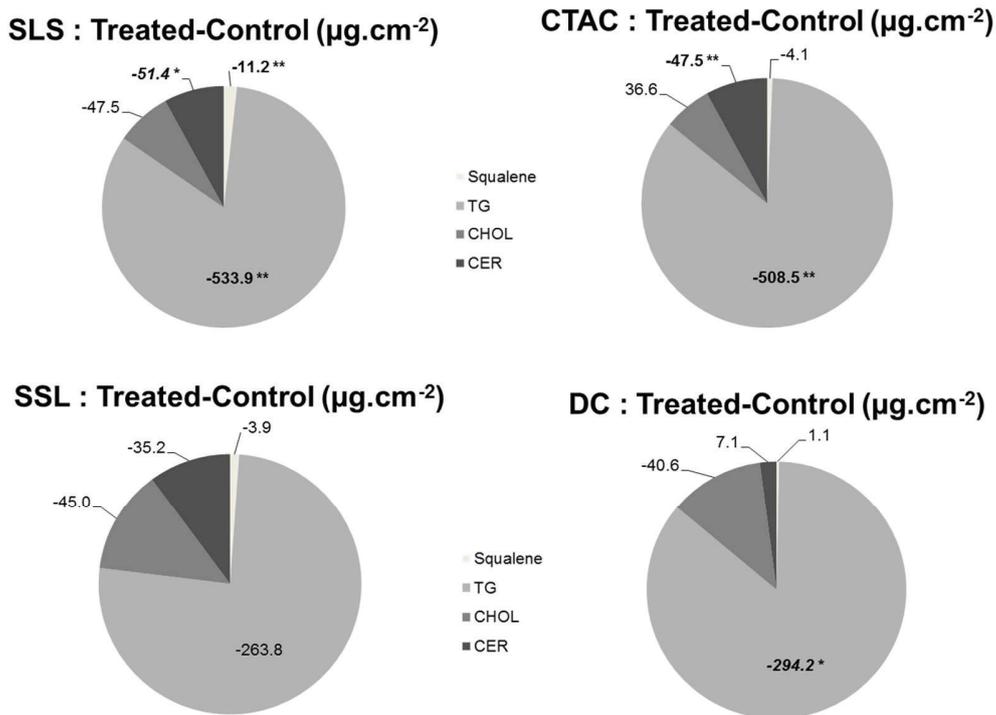


Fig 3. Amount of lipids extracted in each class of lipids (surface or epidermal) after exposure to the surfactant solutions. Bold type with two asterisks represent significant results ( $p < 0.05$ ), bold type with one asterisk represent almost significant results ( $p < 0.1$ ). The results are reported as a difference between skin lipid content after treatment and control.

The lipid extraction by these surfactants was selective. The triglycerides were strongly extracted. SLS and CTAC were responsible for a significant decrease of triglycerides in the SC+E. The other cationic surfactant (DC) had also an impact on the triglycerides content, less important but still noticeable ( $p < 0.1$ ). SSL also decreased the triglycerides content, but at a non-significant level. CTAC and SLS were responsible for a significant decrease of ceramides amount ( $p < 0.05$  and  $p < 0.1$  respectively). SLS was the only surfactant responsible for a significant decrease of squalene and *n*-alkanes. No significant extraction of cholesterol was noticed.

### 3.2.3. Lipid matrix organization evaluation

The effects of exposure to the surfactants on the organization of the lipids in the stratum corneum were evaluated by ATR-FTIR. The position of the CH<sub>2</sub> symmetric stretching peak was related to the lipid chain lateral packing. Fig 4 shows the mean values of the wavenumber attributed to this peak after exposure to surfactant.

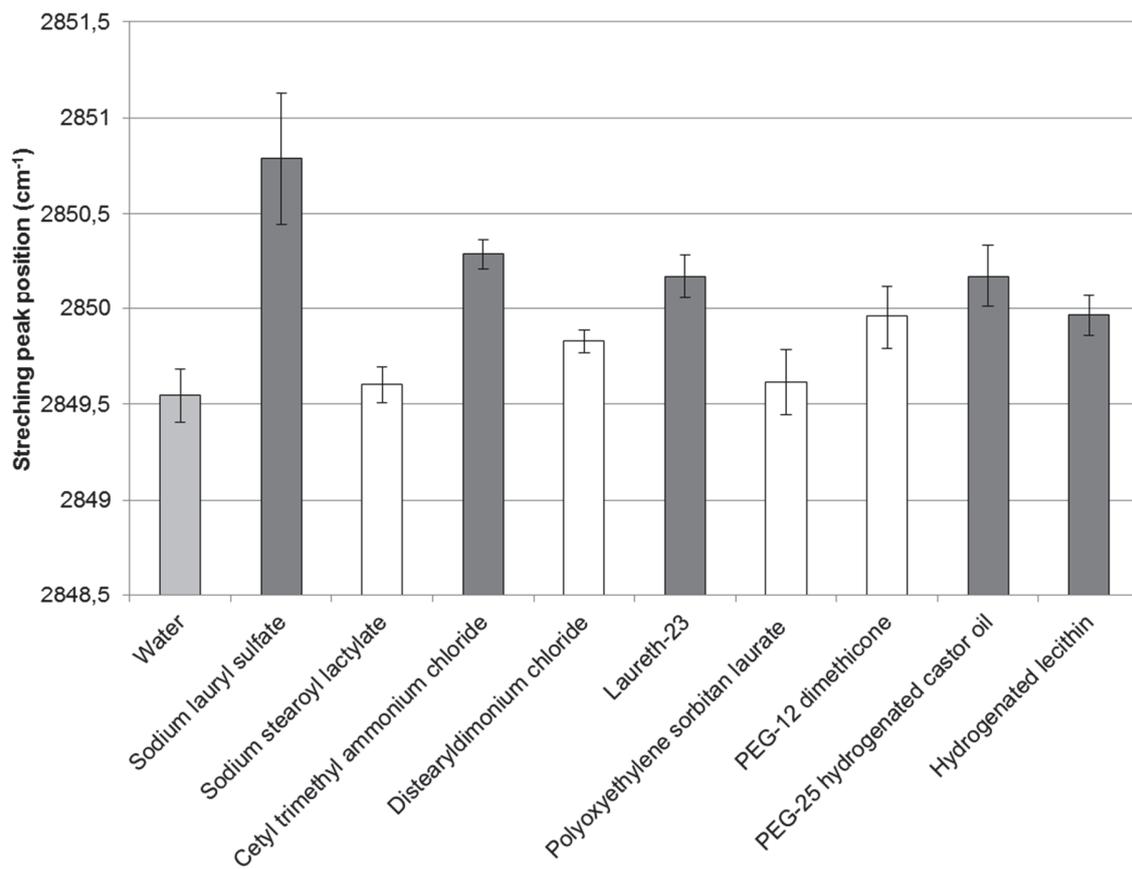


Fig 4. ATR-FTIR symmetric stretching frequencies according to the surfactant treatment. Dark grey bars represent surfactants showing a significant effect compared to the control (water).

A significant increase of the wavenumber of this peak was noticed for five surfactants indicating a transition from orthorhombic to hexagonal or liquid packing.

Among the ionic surfactants, SLS and CTAC were responsible for a shift higher than  $0.7\text{ cm}^{-1}$  meaning that these surfactants fluidized the lipid matrix. The lipids underwent a phase transition from an organized orthorhombic phase to a less organized hexagonal phase. However, a further transition to liquid crystalline phase did not occur, as proved by wavenumber values still lower than  $2854\text{ cm}^{-1}$ . Three non-ionic surfactants (Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil and hydrogenated lecithin) induced a significant shift of the stretching band position compared to the control. However, the shift of the band was lower than  $0.7\text{ cm}^{-1}$ , suggesting that the phase transition from OR to HEX did not reach completion.

The other surfactants (SSL, DC, polyoxyethylene sorbitan laurate and PEG-12 dimethicone) did not modify the lipid matrix organization.

For SLS and CTAC, the  $\text{CH}_2$  scissoring band ( $1410\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$ ) reflecting the nature of lateral packing between the ceramide molecules (orthorhombic, hexagonal or disordered) was also studied. The values of FW-50 calculated from absorbance spectra (Boncheva et al., 2008). are indicated in Table 2.

Table 2. FW-50 values corresponding to the scissoring bandwidths measured at 50% of the peak height, measured on the second-derivative spectra normalized to identical minima and maxima and in addition baseline- corrected.

	water	SLS	CTAC
FW-50 ( $\text{cm}^{-1}$ )	$11.1\pm 0.5$	$8.6\pm 0.8$	$9.8\pm 1$

FW-50 value for the control was  $11.1\text{ cm}^{-1}$ . FW-50 was reduced to  $8.6\text{ cm}^{-1}$  and  $9.8\text{ cm}^{-1}$  after application of SDS and CTAC respectively. These results confirmed the transition of the OR phase into HEX phase induced by the two surfactants.

### 3.3. Surfactant's toxicity to skin

Table 3 summarizes (i) the surfactants which had an effect on the intercellular pathway according to the different evaluation methods (ii) the relationship between surfactants influence

on the skin barrier and their toxicity. (+) surfactants which had a significant effect; (-) surfactants which had no effect; (0) control.

The modification of the skin surface polarity was not related to the surfactant toxicity in all instances. Indeed DC and SSL increased the skin polarity but were sorted as mild considering the toxicity. DC and SSL had a defatting effect and extracted TG, but neither extracted epidermal lipids nor disorganized the lipids.

The surfactants which were responsible for a lipid matrix disorganization or epidermal lipid extraction were also responsible for noticeable cell mortality or enhanced release of inflammation markers.

Table 3 summarize of (i) the surfactants which had an effect on the lipoidal pathway according to the different evaluation methods (ii) the relationship between surfactant behavior on skin barrier and their toxicity. (+) surfactants which had a significant effect; (-) surfactants which had no effect; (0) control.

	Skin surface polarity	Lipid extraction	Lipid matrix disorganization	Cell mortality	Immediate inflammation	Delayed inflammation
Water	0	0	0	0	0	0
Sodium lauryl sulfate	+	+	+	+	+	-
Sodium stearyl lactylate	+	-	-	-	-	+
Cetyl trimethyl ammonium chloride	+	+	+	+	+	-
Distearyldimonium chloride	+	+	-	-	-	-
Laureth-23	+	-	+	+	+	-
Polyoxyethylene sorbitan laurate	-	-	-	-	-	-
PEG-12 dimethicone	-	-	-	-	-	-
PEG-25 hydrogenated castor oil	+	-	+	-	+	+
Hydrogenated lecithin	+	-	+	-	+	+

#### 4. Discussion

Surfactant molecules are efficient at defatting the skin and removing sebum (Ananthapadmanabhan et al., 2013) but they may also disrupt the SC lipid organization and damage proteins at different levels. Surfactant effects on the skin have been extensively studied by means of in vitro and in vivo experiments but these studies were mostly restricted to alkyl sulfates and especially to SLS (Ananthapadmanabhan et al., 2004; Korting et al., 1994; Lee and Maibach, 1995; Effendy and Maibach, 1995; Purohit et al., 2014; James-Smith et al., 2011). The studies investigating the impact of various surfactants on the skin lipids at different levels are scarce and poorly related to cytotoxicity (Bárány et al., 2000; Iwai et al., 1998).

The impairment of the skin barrier by SLS and the irritation effects have been explained by its ability, at a concentration above the CMC, to remove intercellular hydrophobic lipids and to bind to intracellular keratin leading to an increase in transepidermal water loss (Froebe et al., 1990; Fulmer and Kramer, 1986; Patil et al., 1994; Rhein et al., 1986). SLS induces damages to keratinocytes, resulting in the production of inflammatory mediators (de Jongh et al., 2006).

In the present study the relationship between the cytotoxicity of surfactants belonging to different chemical classes and their impact on the skin lipids which maintain a tight physical barrier to water loss was investigated. The three methods for analyzing the skin lipids and especially the FTIR measurements gave new insights on the surfactant behavior at different levels in the epidermis. In vitro test for skin toxicity and irritation were conducted with both cell viability measurements and inflammation markers assay as they present a good correlation with in vivo experiments (Welss et al., 2004).

The most striking result taught that surfactants that modified the lipid organization or extracted epidermal lipids sorted as toxic. On the contrary, a detergency effect on the skin surface did not systematically lead to skin toxicity. For example, the cationic surfactant DC significantly removed triglycerides from the skin surface. As triglycerides are the main lipid class of the sebum (Pappas, 2009), this result highlighted the detergent properties of DC (and in a lower extent of SSL), which removed the hydrolipidic film. DC had a detergency effect, but was not able to mix with the lipids of the matrix. The absence of intercalation of the surfactant in the lipid matrix could explain its mildness. Moreover TG's are apolar lipids, and consequently their specific extraction modified the composition of the SC lipids. As ceramides are polar lipids, the reduction of apolar lipids in favor of polar ones gives a clue for explaining the increase of the skin polarity treated by DC and SSL as suggested by Levêque et al. (1993). However, the increase of the skin polarity after surfactant treatment cannot be fully explained by triglyceride extraction

considering that SSL increased the skin polarity with low extraction of skin lipids. This means that this ionic surfactant was difficult to remove from the skin surface even after several washes. The second striking observation is that the surfactants which impaired the skin barrier belong to different chemical classes.

The ability of the surfactant to mix with the lipids of the matrix, and cause disorganization in the lipid phases, was evaluated by FTIR experiments. A compact lateral organization of the lipid matrix is one of the parameters explaining the skin barrier function. Damien and Boncheva (2010) suggested that the higher the extent of OR phase, the lower the inside-out flux of water. Studies on liposomes showed that the first stage of lipid damage by surfactants is associated to their intercalation into the lipid matrix (Maza et al., 1997). As a consequence, the lipid matrix organization is loosened and the skin barrier function is weakened.

Several ionic and non-ionic surfactants impaired the tissue at different levels leading to cytotoxicity in the skin. SLS and CTAC, two ionic surfactants, were responsible for a high cytotoxicity. SLS has often been used as a positive control for irritancy tests and several researchers have demonstrated its permeation through the skin (de Jongh et al., 2006; Kobiela et al., 2013; Mao et al., 2012; Patil et al., 1994; Wigger-Alberti et al., 2000). Besides removing the hydrolipidic film, SLS and CTAC disturbed the lipid matrix. The several works on skin absorption of SLS have shown that SLS inserted into the lipid matrix and even made micelles within the skin lipids (Friberg et al., 1987; Mao et al., 2012; Moore et al., 2003). Mao et al. (2012) reported that SLS was able to penetrate deeply the SC either as a monomer or as micelles, and that these micelles quickly disassemble into monomers once integrated into the SC lipids.

SLS and CTAC both modified the chain conformational order in SC lipids as given evidence by the significant shift of the  $\nu_{\text{sym}} \text{CH}_2$  stretching mode and the decrease of the two bandwidths of the  $\text{CH}_2$  scissoring bands between  $1462\text{-}1473 \text{ cm}^{-1}$ . These two changes were indicative of the transition from OR to HEX organization. Contrary to Mao et al. (2012) results which showed variations of weak significance after 40 hours of exposure, a significant shift of the  $\nu_{\text{sym}} \text{CH}_2$  band was noticed in the present study after only one hour exposure time. This difference may be attributed to the use of a more concentrated SLS solution in the present study ( $\times 10$ ). Interestingly, Mao et al. (2012) did not observe any perturbation of the keratin structure, suggesting an intercellular pathway for the SLS permeation. These authors suggested an intercalation of SLS in the SC lipids, and the removal and/or disordering of SC lipids packed as their OR phase (Mao et al., 2012). The removal of CER by SLS and CTAC was demonstrated in the present study. This result is in accordance with Imokawa et al. and Rawlings but does not agree with Froebe, Fulmer and Kramer results who respectively found no extraction of TG or

CER but a decrease of the CHOL level or no change in the lipid amounts but some unexplained shifts in the composition of the ceramides (Froebe et al., 1990; Fulmer and Kramer, 1986; Imokawa et al., 1989; Rawlings et al., 1994). These discrepancies may be explained by the different protocols used and especially the conditions of exposure to SLS.

In vitro/in vivo tests on skin have often demonstrated that cationic surfactants were more toxic than anionic ones and that non-ionic surfactants were the less toxic to the skin (Effendy and Maibach, 1995; Korting et al., 1994; Lansdown and Grasso, 1972). In the present study, three non-ionic surfactants were also responsible for an important cell death (Laureth-23) or a noticeable increase of IL-1 $\alpha$  and IL-8 (PEG-25 hydrogenated castor oil and hydrogenated lecithin). Even if these surfactants had different behaviors concerning the modification of the skin polarity and the lipid extraction, they all mixed with the lipid matrix. Laureth-23, PEG-25 hydrogenated castor oil and hydrogenated lecithin loosened the lipid packing, and converted the matrix organization from OR to HEX phase, but in a lesser extent than SLS and CTAC. The increase of the skin polarity due to these surfactants can be explained by their ability to mix with the skin lipids even without removing the hydrolipidic film. This property was suggested by the percutaneous penetration studies of various drugs: some non-ionic surfactants, especially the PEG ether with a alkyl chain with 12 carbons were recognized as potential penetration enhancers, altering the barrier function of the skin (Walters et al., 1993). Nothing was reported concerning the PEG-25 hydrogenated castor oil and hydrogenated lecithin. The present study revealed that PEG ethers were more toxic than PEG esters especially with regard to MTT. In particular, Laureth-23 was responsible for cell mortality twice as much as PEG esters used at the same concentration.

The polarity of the skin was measured because any modification of this parameter suggests an alteration of the skin lipids considering that skin lipids are the major molecules responsible for the wetting properties and the polarity of the skin (Mavon et al., 1997). The modification of the wetting properties of the skin may be related to (i) the difficulty to remove surfactants even after several washes as suggested by Rosenberg et al. (1973), (ii) an extraction of specific classes of lipids (apolar ones) due to a detergency effect (Pappas, 2009) (iii) the modification of lipid composition in the skin due to intercalation and then partial extraction of epidermal lipid groups (Kragh-Hansen et al., 1998; Maza et al., 1997; Pappas, 2009). In the present study, the majority of surfactants induced changes of the skin polarity. However some of them did not induce any toxicity such as Polyoxyethylene sorbitan laurate, PEG-12 hydrogenated castor oil, SSL and DC. This suggests that a change of the skin polarity cannot be related to cytotoxicity and that further investigation on the lipid content and organization is necessary.

Finally four surfactants (SSL, DC, polyoxyethylene sorbitan laurate and PEG12-dimethicone did not elicit any reaction. This result was not surprising concerning the non-ionic surfactants as they are generally considered as non-toxic and especially the polyoxyethylene sorbitan laurate (Effendy and Maibach, 1995). However, this surfactant has been often used as penetration enhancer although its efficacy could not be definitely demonstrated (Cappel and Kreuter, 1991). The evaluations of the penetration enhancer activity of Polyoxyethylene sorbitan laurate gave largely scattered results; it has been reported to increase the skin penetration of several compounds (Sarpotdar and Zatz, 1986a, 1986b; Shahi and Zatz, 1978) whereas any effect was measured on other compounds (Aungst et al., 1986; López et al., 2000).

No studies were done on the PEG-12 dimethicone but the mildness of this PEG ester has been highlighted in previous studies (Fruijtier-Pölloth, 2005).

Two ionic ones were included in the four non-toxic surfactants, the cationic surfactant DC and the anionic SSL. It has been demonstrated that the nature of the polar head group had a strong influence on the irritant potency (Ananthapadmanabhan et al., 2004). A ionic surfactant should have stronger interactions of electrostatic origin with SC proteins, and therefore should behave as more irritating because the irritant potential of a surfactant is related to its ability to bind to keratin and swell the membrane of corneocytes (Imokawa et al., 1975). The mildness of these two surfactants was not explained by their ionic or nonionic nature but by their crystalline structure in solution that prevented their interaction with skin proteins or lipids (Lémery et al., 2015). Conversely SLS and CTAC which were organized as fluid micellar structures can easily interact with skin components.

The common feature between the four mild surfactants was their inability to disorganize the lipid matrix. Those surfactants were not able to mix with the lipids, fluidize the matrix, and turn the skin barrier more permeable.

## **Conclusion**

This study reports a detailed evaluation of the surfactants toxicity to skin related to their behavior on the skin barrier. Modifications of the skin polarity, or lipid extraction did not fully explain the surfactant skin toxicity. The intercalation of surfactants in the lipid matrix, responsible for a disorganization of the matrix and a more permeable barrier, was linked to the toxicity. Such effects were independent of the ionic or nonionic type of surfactant. The role of binding to skin proteins, often considered as the main factor explaining skin irritation, was questioned as some non-ionic surfactants sorted as toxic. The measurement of a complete IR vibrational spectrum

after exposure to surfactants is a predictive way to evaluate the toxicity of surfactant as it brings information at a molecular level concerning the potential damaging effects of surfactants.

## 5. Acknowledgments

The authors wish to thank Johnson & Johnson Santé Beauté France for their financial support. We would also like to thank Hélène Wong and José Serrano for their help in the measurements of the toxicity in vitro of surfactants.

## References

- Agner, T., 1991. Basal transepidermal water loss, skin thickness, skin blood flow and skin colour in relation to sodium-lauryl-sulphate- induced irritation in normal skin. *Contact Dermatitis* 25, 108–114.
- Ananthapadmanabhan, K.P., Moore, D.J., Subramanyan, K., Misra, M., Meyer, F., 2004. Cleansing without compromise: the impact of cleansers on the skin barrier and the technology of mild cleansing. *Dermatol. Ther.* 17, 16–25.
- Ananthapadmanabhan, K.P., Mukherjee, S., Chandar, P., 2013. Stratum corneum fatty acids: their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 337–345.
- Ananthapadmanabhan, K.P., Yu, K.K., Meyers, C.L., Aronson, M.P., 1996. Binding of surfactants to stratum corneum, in: *J. Soc. Cosmet. Chem. Presented at the Society of Cosmetic Chemists. Annual Scientific Meeting, Society of Cosmetic Chemists*, pp. 185–200.
- Aungst, B.J., J. Rogers, N., Shefter, E., 1986. Enhancement of naloxone penetration through human skin in vitro using fatty acids, fatty alcohols, surfactants, sulfoxides and amides. *Int. J. Pharm.* 33, 225–234.
- Bárány, E., Lindberg, M., Lodén, M., 2000. Unexpected skin barrier influence from nonionic emulsifiers. *Int. J. Pharm.* 195, 189–195.
- Bauer, A., Schmitt, J., Bennett, C., Coenraads, P.-J., Elsner, P., English, J., Williams, H.C., 1996. Interventions for preventing occupational irritant hand dermatitis, in: *Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley & Sons, Ltd.*
- Berridge, M.V., Tan, A.S., 1993. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 303, 474–482.
- Blake-Haskins, J.C., Scala, D., Rhein, L.D., Robbins, C.R., 1986. Predicting surfactant irritation from the swelling response of a collagen film. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 37, 199–210.
- Boelsma, E., Tanojo, H., Boddé, H.E., Ponec, M., 1996. Assessment of the potential irritancy of oleic acid on human skin: Evaluation in vitro and in vivo. *Toxicol. In Vitro* 10, 729–742.
- Boncheva, M., Damien, F., Normand, V., 2008. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1344–1355.
- Bouwstra, J.A., Ponec, M., 2006. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Sphingolipids, Apoptosis and Disease* 1758, 2080–2095.
- Cappel, M.J., Kreuter, J., 1991. Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: II. Poloxamer and poloxamine surfactants. *Int. J. Pharm.* 69, 155–167.

- Caussin, J., Gooris, G.S., Janssens, M., Bouwstra, J.A., 2008. Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1778, 1472–1482.
- Corazza, M., Lauriola, M., Zappaterra, M., Bianchi, A., Virgili, A., 2010. Surfactants, skin cleansing protagonists. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 24, 1–6.
- Damien, F., Boncheva, M., 2010. The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 130, 611–614.
- De Jongh, C.M., Jakasa, I., Verberk, M.M., Kezic, S., 2006. Variation in barrier impairment and inflammation of human skin as determined by sodium lauryl sulphate penetration rate. *Br. J. Dermatol.* 154, 651–657.
- Effendy, I., Mailbach, H.I., 1995. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 33, 217–225.
- Faucher, J., Goddard, E., 1978. Interaction of Keratinous Substrates with Sodium Lauryl Sulfate .1. Sorption. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 29, 323–337.
- Feingold, K.R., 2007. Thematic review series: Skin Lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res.* 48, 2531–2546.
- Friberg, S.E., Goldsmith, L., Suhaimi, H., Rhein, L.D., 1987. Surfactants and the stratum corneum lipids. *Colloids Surf., Symposium for the Division of Colloid and Surface Chemistry, American Chemical Society, National Meeting* 30, 1–12.
- Froebe, C.L., Simion, F.A., Rhein, L.D., Cagan, R.H., Kligman, A., 1990. Stratum corneum lipid removal by surfactants: relation to in vivo irritation. *Dermatology* 181, 277–283. doi:10.1159/000247822
- Fruijtier-Pölloth, C., 2005. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology* 214, 1–38.
- Fulmer, A.W., Kramer, G.J., 1986. Stratum corneum lipid abnormalities in surfactant-induced dry scaly skin. *J. Invest. Dermatol.* 86, 598–602.
- Groen, D., Poole, D.S., Gooris, G.S., Bouwstra, J.A., 2011. Is an orthorhombic lateral packing and a proper lamellar organization important for the skin barrier function? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1529–1537.
- Halkier-Sønsen, L., Thesirup-Pedersen, K., 1993. The efficacy of a moisturizer (Locobase) among cleaners and kitchen assistants during everyday exposure to water and detergents. *Contact Dermatitis* 29, 266–271.
- Humbert, P., 2003. Conséquences fonctionnelles des perturbations des lipides cutanés. *Pathol. Biol., Mini-symposium - Colloque sur les Lipides de la peau - Lyon - mars 2002* 51, 271–274.
- Imokawa, G., Akasaki, S., Minematsu, Y., Kawai, M., 1989. Importance of intercellular lipids in water-retention properties of the stratum corneum: induction and recovery study of surfactant dry skin. *Arch. Dermatol. Res.* 281, 45–51.
- Imokawa, G., Hattori, M., 1985. A Possible Function of Structural Lipids in the Water-Holding Properties of the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* 84, 282–284.
- Imokawa, G., Sumura, K., Katsumi, M., 1975. Study on skin roughness caused by surfactants: II. Correlation between protein denaturation and skin roughness. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52, 484–489.
- Iwai, H., Fukasawa, J., Suzuki, T., 1998. A liquid crystal application in skin care cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* 20, 87–102.
- James-Smith, M.A., Hellner, B., Annunziato, N., Mitragotri, S., 2011. Effect of Surfactant Mixtures on Skin Structure and Barrier Properties. *Ann. Biomed. Eng.* 39, 1215–1223.

- Kobiela, T., Lelen-Kaminska, K., Stepulak, M., Lekka, M., Malejczyk, M., Arct, J., Majewski, S., 2013. The influence of surfactants and hydrolyzed proteins on keratinocytes viability and elasticity. *Skin Res. Technol.* 19, e200–e208.
- Korting, H.C., Herzinger, T., Hartinger, A., Kersch, M., Angerpointner, T., Maibach, H.I., 1994. Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: Correlation with in vivo data from a soap chamber assay. *J. Dermatol. Sci.* 7, 119–129.
- Kp, W., 1994. Effects of surfactants on skin hydration. *Curr. Probl. Dermatol.* 22, 72–79.
- Kragh-Hansen, U., le Maire, M., Møller, J.V., 1998. The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. *Biophys. J.* 75, 2932–2946.
- Lansdown, A.B.G., Grasso, P., 1972. Physico-Chemical Factors Influencing Epidermal Damage by Surface Active Agents. *Br. J. Dermatol.* 86, 361–378.
- Lee, C.H., Maibach, H.I., 1995. The sodium lauryl sulfate model: an overview. *Contact Dermatitis* 33, 1–7.
- Lémery, E., Briançon, S., Chevalier, Y., Bordes, C., Oddos, T., Gohier, A., Bolzinger MA. 2015. Skin Toxicity of Surfactants: Structure/toxicity Relationships. *Colloids Surf. A.* 469 (March): 166–79.
- Lévêque, J.L., de Rigal, J., Saint-Léger, D., Billy, D., 1993. How does sodium lauryl sulfate alter the skin barrier function in man? A multiparametric approach. *Skin Pharmacol. Physiol.* 6, 111–115.
- López, A., Llinares, F., Cortell, C., Herráez, M., 2000. Comparative enhancer effects of Span®20 with Tween®20 and Azone® on the in vitro percutaneous penetration of compounds with different lipophilicities. *Int. J. Pharm.* 202, 133–140.
- Malten, K.E., 1981. Thoughts on irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 7, 238–247.
- Mao, G., Flach, C.R., Mendelsohn, R., Walters, R.M., 2012. Imaging the Distribution of Sodium Dodecyl Sulfate in Skin by Confocal Raman and Infrared Microspectroscopy. *Pharm. Res.* 29, 2189–2201.
- Mavon, A., Zahouani, H., Redoules, D., Agache, P., Gall, Y., Humbert, P., 1997. Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: A study on two anatomical sites. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 8, 147–155.
- Maza, A. de la, Coderch, L., Lopez, O., Baucells, J., Parra, J.L., 1997. Permeability changes caused by surfactants in liposomes that model the stratum corneum lipid composition. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74, 1–8.
- Mendelsohn, R., Flach, C.R., Moore, D.J., 2006. Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, *Vibrational Microscopic Imaging: Towards Molecular Pathology* 1758, 923–933.
- Merle, C., Baillet-Guffroy, A., 2009. Physical and chemical perturbations of the supramolecular organization of the stratum corneum lipids: In vitro to ex vivo study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1788, 1092–1098.
- Moore, D.J., Mendelsohn, R., 1999. Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm. Venereol. Suppl. (Stockh.)* 208, 16–22.
- Moore, P.N., Puvvada, S., Blankschtein, D., 2003. Challenging the surfactant monomer skin penetration model: Penetration of sodium dodecyl sulfate micelles into the epidermis. *J. Cosmet. Sci.* 54, 29–46.
- Nickoloff, B.J., Naidu, Y., 1994. Perturbation of epidermal barrier function correlates with initiation of cytokine cascade in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 30, 535–546.

- Nokhodchi, A., Shokri, J., Dashbolaghi, A., Hassan-Zadeh, D., Ghafourian, T., Barzegar-Jalali, M., 2003. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. *Int. J. Pharm.* 250, 359–369.
- Norlén, L., Nicander, I., Lundsjö, A., Cronholm, T., Forslind, B., 1998. A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 508–516.
- Otzen, D., 2011. Protein–surfactant interactions: A tale of many states. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1814, 562–591.
- Pappas, A., 2009. Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol.* 1, 72–76.
- Patil, S.M., Singh, P., Maibach, H.I., 1994. Cumulative irritancy in man to sodium lauryl sulfate: The overlap phenomenon. *Int. J. Pharm.* 110, 147–154.
- Perrenoud, D., Gallezot, D., Van Melle, G., 2001. The efficacy of a protective cream in a real-world apprentice hairdresser environment. *Contact Dermatitis* 45, 134–138.
- Ponec, M., Kempenaar, J., 1995. Use of Human Skin Recombinants as an in vitro Model for Testing the Irritation Potential of Cutaneous Irritants. *Skin Pharmacol. Physiol.* 8, 49–59.
- Prottey, C., Ferguson, T., 1975. Factors Which Determine Skin Irritation Potential of Soaps and Detergents. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 26, 29–&.
- Purohit, P., Chandar, P., Vilinska, A., Ananthapadmanabhan, K.P., Somasundaran, P., 2014. Effect of mixed surfactants on stratum corneum: a drying stress and Raman spectroscopy study. *Int. J. Cosmet. Sci.* 36, 379–385.
- Rawlings, A.V., Matts, P.J., Anderson, C.D., Roberts, M.S., 2008. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discov. Today Dis. Mech., Common skin conditions and disorders* 5, e127–e136.
- Rawlings, A., Watkinson, A., Rogers, J., Mayo, A., Hope, J., Scott, I., 1994. Abnormalities in Stratum-Corneum Structure, Lipid-Composition, and Desmosome Degradation in Soap-Induced Winter Xerosis. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 45, 203–220.
- Rhein, L.D., Robbins, C.R., Fernee, K., Cantore, R., 1986. Surfactant structure effects on swelling of isolated human stratum corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 37, 125–139.
- Rhein LD., 1997. In vitro interactions: biochemical and biophysical effects of surfactants on skin. In: Rieger MM, Rhein LD, eds. *Surfactants in Cosmetics. Surfactant Science Series.* New York, NY: Marcel Dekker: 397–425.
- Rosenberg, A., Williams, R., Cohen, G., 1973. Interaction forces involved in wetting of human skin. *J. Pharm. Sci.* 62, 920–922.
- Saary, J., Qureshi, R., Palda, V., DeKoven, J., Pratt, M., Skotnicki-Grant, S., Holness, L., 2005. A systematic review of contact dermatitis treatment and prevention. *J. Am. Acad. Dermatol.* 53, 845.e1–845.e13.
- Sarpotdar, P.P., Zatz, J.L., 1986a. Evaluation of penetration enhancement of lidocaine by nonionic surfactants through hairless mouse skin in vitro. *J. Pharm. Sci.* 75, 176–181.
- Sarpotdar, P.P., Zatz, J.L., 1986b. Percutaneous Absorption Enhancement by Nonionic Surfactants. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 12, 1625–1647.
- Shahi, V., Zatz, J.L., 1978. Effect of formulation factors on penetration of hydrocortisone through mouse skin. *J. Pharm. Sci.* 67, 789–792.
- Somasundaran, P., 2006. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science.* CRC Press.
- Tupker, R.A., Pinnagoda, J., Coenraads, P.-J., Nater, J.P., 1989. The influence of repeated exposure to surfactants on the human skin as determined by transepidermal water loss and visual scoring. *Contact Dermatitis* 20, 108–114.
- Walters, K.A., Bialik, W., Brain, K.R., 1993. The effects of surfactants on penetration across the skin\*. *Int. J. Cosmet. Sci.* 15, 260–271.
- Walters, R.M., Mao, G., Gunn, E.T., Hornby, S., 2012. Cleansing formulations that respect skin barrier integrity. *Dermatol. Res. Pract.* 2012, e495917.

- Welss, T., Basketter, D.A., Schröder, K.R., 2004. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro* 18, 231–243.
- Wickett, R.R., Visscher, M.O., 2006. Structure and function of the epidermal barrier. *Am. J. Infect. Control* 34, S98–S110.
- Wigger-Alberti, W., Krebs, A., Elsner, P., 2000. Experimental irritant contact dermatitis due to cumulative epicutaneous exposure to sodium lauryl sulphate and toluene: single and concurrent application. *Br. J. Dermatol.* 143, 551–556.
- Wilhelm, K.-P., Cua, A.B., Wolff, H.H., Maibach, H.I., 1993. Surfactant-induced stratum corneum hydration in vivo: prediction of the irritation potential of anionic surfactants. *J. Invest. Dermatol.* 101, 310–315.
- Wilmer, J.L., Burleson, F.G., Kayama, F., Kanno, J., Luster, M.I., 1994. Cytokine Induction in Human Epidermal Keratinocytes Exposed to Contact Irritants and Its Relation to Chemical-Induced Inflammation in Mouse Skin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 915–922.

## Discussion générale

Les objectifs de ce travail expérimental étaient d'une part approfondir les connaissances sur la physicochimie de certaines classes de tensioactifs (TA) peu étudiées et pourtant largement utilisées dans le milieu industriel puis d'autre part évaluer l'impact de la physicochimie du tensioactif sur sa toxicité cutanée et son effet sur la fonction barrière. Ces tensioactifs sont utilisés dans des émulsions et sont donc des molécules qui sont fréquemment au contact de la peau.

### Contexte de l'étude

#### *La sélection des tensioactifs*

Le premier travail a été d'établir une sélection de tensioactifs qui soit représentative de leur utilisation sur le marché industriel et qui soit également pertinente pour l'étude de l'influence de la structure et de la physicochimie du tensioactif sur différents paramètres cutanés. Ainsi, une sélection de 38 tensioactifs a été effectuée comprenant des tensioactifs que nous avons qualifiés « d'académiques », de structure relativement simple et pour une petite partie d'entre eux ayant déjà fait l'objet d'étude dans la littérature (Effendy and Maibach 1995; Ananthapadmanabhan et al. 2004). A ceux-ci s'ajoutent de nouveaux tensioactifs, de structures plus complexes, souvent en mélange avec d'autres molécules telles que des alcools gras, utilisés dans l'industrie. Bien que la toxicité cutanée des tensioactifs soit un sujet qui a été très étudié, l'analyse simultanée d'un si grand nombre de molécules, permettant le croisement de multiples paramètres physicochimiques reste à ce jour innovant. En effet, la littérature s'est focalisée uniquement sur quelques molécules, maintenant considérées comme des références telles que le sodium dodecyl sulfate ou SDS pour la classe des tensioactifs anioniques, le cetyl trimethyl ammonium bromide pour les tensioactifs cationiques, le cocamidopropyl betaine pour les tensioactifs amphotères et les polysorbates ou quelques éthers et esters de polyéthylène glycol pour les tensioactifs non ioniques (Effendy and Maibach 1995). Certains travaux ont étudié l'influence de la structure de ces molécules chargées sur la peau en comparant des molécules similaires mais avec des longueurs de chaînes alkyles différentes pour les alkyl sulfates par exemple (Wilhelm, Samblebe, and Siegers 1994), ou des nombres de motifs de polyéthylène glycol différents pour les tensioactifs non ioniques (K. A. Walters, Bialik, and Brain 1993; Bárány, Lindberg, and Lodén 2000; Park et al. 2000). Cependant, aucune étude n'a

évalué de manière simultanée, utilisant les mêmes techniques d'analyse, aussi bien un panel de tensioactifs anioniques que cationiques et non ioniques. Les études se sont focalisées soit sur une seule classe de tensioactifs comprenant plusieurs individus, soit sur la comparaison de l'effet des trois classes avec seulement un ou deux représentants par classe. Or la multitude de méthodes d'évaluation de la peau qui ont été mises au point et utilisées dans ces études rend la comparaison des résultats délicate.

### ***Le choix de la méthode d'évaluation***

Les techniques d'évaluation de l'intégrité de la peau ont énormément évolué. Concernant la toxicité cutanée, les premiers tests développés ont été réalisés *in vivo*. Dans des études précédentes, la toxicité cutanée du tensioactif était évaluée au travers de mesures hydratation telles que des mesures de capacitance ou de conductance, des mesures de perte insensible en eau (PIE) reflétant une altération de la fonction barrière. L'analyse colorimétrique de la surface cutanée à l'aide d'un chromamètre (Tupker et al. 1997), la cotation des érythèmes observés cliniquement (Hall-Manning et al. 1998) et le flux sanguin de la peau (Bárány, Lindberg, et Lodén 2000) peuvent être étudiés en plus, apportant une information sur le pouvoir inflammatoire du tensioactif. Le couplage d'une méthode *in vivo* évaluant la fonction barrière et d'une méthode évaluant l'inflammation est donc utilisé pour déterminer le pouvoir irritant d'un TA (Uhoda, Paye, and Pierard 2003; Zhai et al. 2004).

Dans le cadre de notre étude, en raison du grand nombre de molécules étudiées, le choix de tests *in vitro* pour le screening du pouvoir irritant des tensioactifs sur la peau a été choisi (Wells, Basketter, and Schröder 2004). En effet, de nombreux progrès ont été faits dans le domaine des tests *in vitro* et la recherche de méthodes alternatives aux tests sur l'animal (test de Draize sur le lapin), et particulièrement dans le domaine de l'ingénierie tissulaire avec la mise au point de modèles de peaux reconstruites utilisés lors de ces tests, Parmi eux, en 2007 et 2008, trois modèles d'épiderme humain reconstruit (RHE) ont été validés par l'ESAC (ECVAM Scientific Advisory Committee) pour remplacer le test de Draize dans l'évaluation de l'irritation cutanée : EpiDerm™ SIT, EpiSkin™ et SkinEthic™ RHE (Alépée et al. 2010). Notre choix s'est arrêté sur ce dernier modèle. Ils ont fait l'objet de nombreuses études de fiabilité concernant les tests d'irritation cutanée (Faller and Bracher 2002). Il a cependant été montré que malgré leur forte ressemblance avec l'épiderme humain, la plus grande limite de ces modèles résulte de leur plus forte perméabilité, provenant d'une fonction barrière amoindrie (Ponec et al. 2001; Schmook, Meingassner, and Billich 2001). Cependant l'ECVAM s'accorde sur le fait qu'il y a une

corrélation entre le potentiel irritant du tensioactif et son impact sur la viabilité cellulaire *in vitro*, qui doit être couplée à d'autres facteurs tels que la libération de marqueurs d'inflammation. Plusieurs tests de viabilité cellulaire existent. La méthode la plus couramment utilisée est le test MTT, reflétant l'activité d'une enzyme mitochondriale (Bigliardi et al. 1994; Gay et al. 1992; Kobiela et al. 2013; Tornier, Roquet, and Fraissinette 2010). Celle-ci est généralement couplée avec le test LDH, se basant sur l'activité d'une enzyme cytosolique et étant de ce fait un marqueur plus spécifique d'une altération membranaire (Arechabala et al. 1999; Faller and Bracher 2002). Ces deux tests sont généralement corrélés et ont été choisis pour notre étude. Afin de refléter au mieux le pouvoir irritant *in vivo* du tensioactif, ces deux tests ont été couplés à des dosages de libération de médiateurs inflammatoires, comme le suggère l'ECVAM. Deux cytokines ont été choisies. L'IL-1 $\alpha$  a été sélectionnée car c'est un médiateur inflammatoire important, qui initie le processus d'inflammation (Coquette et al. 2003). L'IL-1 $\alpha$  est exprimée comme une protéine intracellulaire qui s'accumule dans les kératinocytes et qui est libérée après un dommage causé à la cellule ou une altération membranaire (Dinarello 1998). Elle représente le marqueur de l'inflammation primaire. La seconde cytokine sélectionnée est l'IL-8 qui est un marqueur d'inflammation secondaire. En effet elle est sécrétée en réponse à la libération d'IL-1 $\alpha$  entre autre. Cela ne représente pas un paramètre spécifique mais un paramètre général d'altération tissulaire (Baggiolini, Loetscher, and Moser 1995; Mohamadzadeh et al. 1994). Ces deux cytokines ont été sélectionnées car de plus, Coquette et al. ont montré que le ratio IL-8/IL-1 $\alpha$  pouvait être un paramètre intéressant pour discriminer les tensioactifs sensibilisants des tensioactifs irritants. Les molécules sont considérées comme des allergènes lorsque le taux d'IL-8 libéré est supérieur au taux d'IL-1 $\alpha$  et des molécules irritantes si c'est l'inverse (Coquette et al. 2003). Ce ratio IL-8/IL-1 $\alpha$  a donc été calculé dans notre étude.

Concernant l'évaluation de la fonction barrière, les techniques d'évaluation ont beaucoup évolué et ont permis une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'intégrité de la fonction barrière. En effet, depuis des années il est admis que les éléments responsables de la fonction barrière de la peau résident dans la couche la plus superficielle, à savoir le stratum corneum. Les techniques d'imagerie telles que la diffraction des rayons X (Bouwstra et al. 1991; Hatta et al. 2006), la diffraction des électrons (Janssens et al. 2013; Pilgram et al. 1999), la calorimétrie différentielle (Babita et al. 2006) et la microscopie électronique (Al-Amoudi, Norlen, and Dubochet 2004) ne pouvant être réalisées uniquement qu'*in vitro*, elles sont peu à peu remplacées ou utilisées en parallèle de techniques d'évaluation *in vivo* telles que la spectroscopie confocale Raman (Kikuchi et al. 2015; Tfiayli et al. 2012) et infrarouge (Boncheva, Damien, and Normand 2008; Laugel, Yagoubi, and Baillet 2005). Toutes ces techniques ont

participé à préciser le modèle de SC, de briques (cornéocytes) et de mortier (lipides intercornéocytaires) proposé par Elias en 1983, en apportant des informations sur l'organisation de ces lipides et le rôle de chacun d'entre eux (Elias 1983). Ainsi l'organisation latérale des lipides en phase orthorhombique et l'organisation lamellaire des lipides, en particulier la présence de phase de longue périodicité (LPP) sont deux paramètres jugés comme étant responsables de l'intégrité de la fonction barrière (Groen et al. 2011; Damien and Boncheva 2010). De plus, la présence de céramides type sphingosine et d'acides gras à longues chaînes a été montrée comme essentielle pour l'organisation des lipides intercornéocytaires (Caussin et al. 2008; Corbe et al. 2007).

Ces méthodes d'imagerie permettent de visualiser l'impact d'une molécule sur l'organisation des lipides matriciels du SC, que cette molécule soit marquée, deutérée, ou simple (Saad et al. 2012; Moore, Puvvada, and Blankschtein 2003; Merle and Baillet-Guffroy 2009). Pour ces raisons, la spectroscopie infrarouge a été choisie pour évaluer l'impact du tensioactif sur l'organisation lipidique.

Comme les tensioactifs sont principalement reconnus pour leur fonction détergente, l'étude de leurs effets à la surface cutanée, mais également leur potentiel extractif en surface comme en profondeur a été étudié ici pour se rendre compte des différents niveaux d'action du tensioactif sur la peau. La peau pouvant être considérée comme une surface solide, les mesures d'énergie de surface ont été choisies pour évaluer l'effet du TA sur la surface cutanée. Ces déterminations d'énergie de surface et de polarité de la peau par la méthode de mesures d'angles de contact restent à ce jour peu utilisées, seules quelques expériences ont été menées (Mavon et al. 1998; Mavon et al. 1997; Rosenberg, Williams, and Cohen 1973). Concernant l'évaluation du pouvoir extractif des tensioactifs, de nombreuses études ont été réalisées afin d'extraire et d'analyser le contenu en lipides du SC. Ces méthodes d'extraction se sont souvent reposées sur la technique de Folch et al. utilisant différents mélanges de chloroforme et méthanol (Folch, Lees, and Stanley 1957; Bligh and Dyer 1959). Les techniques chromatographiques sont privilégiées pour le dosage des lipides extraits. Parmi ces techniques, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide haute performance avec détecteur à diffusion de lumière sont souvent employées (Fulmer and Kramer 1986; G. Imokawa et al. 1989; Norlén et al. 1998), c'est cette dernière méthode qui a été choisie dans notre étude.

Le but de ce travail étant également d'établir des relations de structure/activité, de nombreux paramètres physicochimiques caractérisant les tensioactifs ont été calculés et mesurés. Parmi eux certains sont déjà connus dans la littérature comme ayant une influence sur la toxicité

cutanée, tels que la CMC, la charge de la tête polaire, la longueur de la chaîne alkyle et la nature de la liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyle du tensioactif qui seront développés par la suite. Ces paramètres issus de la littérature n'ayant pas été jugés pertinents dans notre étude, d'autres paramètres ont été ajoutés afin d'avoir une description physicochimique des TA beaucoup plus complète. Le HLB facilement calculable permet d'avoir une bonne prédiction du comportement des tensioactifs non ioniques en émulsion mais n'est pas très adapté pour les tensioactifs ioniques. Un paramètre s'appliquant à l'ensemble des tensioactifs a donc été étudié. Il s'agit du paramètre d'ordre qui rend compte de la courbure que forment les tensioactifs lorsqu'ils sont en phase aqueuse et ainsi permet de décrire leur faculté à former ou non des phases cristallines, où l'angle de courbure sera proche de zéro. Enfin la toxicité des tensioactifs en émulsion peut également être influencée par présence d'huile car le comportement du tensioactif en émulsion dépend beaucoup de la nature de l'huile. Ainsi des paramètres caractérisant les émulsions comme le diamètre moyen des globules ou la polydispersité mais également la viscosité ont également été mesurés.

Afin d'exploiter au mieux les multiples données générées par l'ensemble de ces expérimentations, différents types d'analyses statistiques ont été réalisés. L'analyse en composante principale a permis de représenter les 38 tensioactifs en tenant compte de l'ensemble de variables quantitatives afin de mettre en évidence des comportements communs concernant la tolérance (Réponse) en fonction des paramètres physicochimiques (Descripteurs). En effet, elle offre une représentation en deux dimensions du comportement des tensioactifs concernant la tolérance cutanée, en tenant compte de leurs multiples caractéristiques physicochimiques. Chaque axe correspond à une combinaison linéaire de l'ensemble des descripteurs physicochimiques calculée de manière à expliquer la plus grande variance possible et de révéler des groupes d'individus similaires. Des matrices de corrélation calculées en déterminant le coefficient de corrélation de Pearson entre chaque paire de paramètres ont été utilisées afin d'identifier quels paramètres physicochimiques étaient directement reliés à la tolérance cutanée. Enfin le test de Student non apparié avec un niveau de significativité de  $p < 0,05$  a été utilisé afin de rendre compte des effets significativement différents par rapport au contrôle, ayant été engendrés par le traitement par le tensioactif.

## Mécanismes d'action des tensioactifs sur la peau en relation avec leur physicochimie

### *Le site d'action*

Une des fonctions principales d'une molécule tensioactive est de se placer à l'interface eau/huile et de former des micelles pouvant solubiliser des corps gras dans une phase aqueuse. Sur la peau, cette propriété se traduit par une action nettoyante et détergente, les tensioactifs étant incorporés dans des produits d'hygiène afin de réduire le sébum en surface et d'éliminer les contaminants exogènes (Walters et al. 2012).

Dans nos travaux, différentes classes de TA ont été étudiées, représentant des TA utilisés préférentiellement dans le domaine de la formulation d'émulsions. Concernant la toxicité cutanée, des comportements différents ont été observés. En effet grâce à l'analyse en composante principale sur les 8 TA ioniques et les 30 TA non ioniques étudiés, un cluster de TA bien tolérés a pu être observé figurant un comportement commun concernant la toxicité cutanée. 10 TA ne figuraient pas dans ce cluster et présentaient une forte toxicité cutanée. Parmi eux trois TA ioniques : le SDS (anionique) et le Cetyl trimethyl ammonium chloride (cationique) et le Sodium stearoyl glutamate (anionique) mais qui était utilisé à un pourcentage bien au-delà des recommandations fournisseurs pour les tests de toxicité. et 7 TA non ioniques dont 4 éthers pégylés et un ester de saccharose avec une chaîne alkyle en C12 et deux TA plus complexes dont un géminé. Du fait de la diversité des classes entre ces 10 TA responsables pourtant du même effet sur la toxicité cutanée, nous nous sommes intéressés aux paramètres physicochimiques des TA pouvant expliquer ce comportement commun. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux paramètres clés décrits dans la littérature à savoir la charge du TA, la CMC, la longueur de la chaîne alkyle ou la liaison entre la chaîne alkyle et la tête polaire du TA.

En raison, des propriétés détergentes, dans un premier temps, la mesure du potentiel extractif des TA sur les lipides de la peau a été envisagée dans ce travail, ceci en lien avec les manifestations cliniques d'irritation cutanée observées lors de contact répétés ou longs des tensioactifs avec la peau. Cette étude a été menée malgré le fait que différentes expériences portant sur l'extraction lipidique n'ont mis en évidence qu'un faible pouvoir extractif dans la littérature (Froebe et al. 1990; Fulmer and Kramer 1986; Rawlings et al. 1994; G. Imokawa et al. 1989). De plus, les signes cliniques des pathologies induites pas les tensioactifs telles que les

dermatites irritatives de contact montrent une forte composante inflammatoire ce qui a suggéré une action du tensioactif sur les composants cellulaires des cornéocytes, dont les protéines. Ceci explique que des études sur l'effet des tensioactifs sur les protéines ont été menées afin d'expliquer leur action irritante et qu'une notion quasi empirique de l'interaction TA/protéine responsable de l'irritation cutanée est apparue (Effendy and Maibach 1995; Ananthapadmanabhan et al. 2004; Corazza et al. 2010; Pezron, 2006). Dans ce travail nous avons donc étudié l'influence de la charge de la tête polaire du TA en lien avec la toxicité cellulaire.

### *La charge*

Les protéines étant des molécules chargées, l'interaction avec les tensioactifs chargés est privilégiée et c'est ainsi qu'un classement des tensioactifs en fonction de leur toxicité a été établi avec du plus irritant au moins irritant les TA anioniques, les TA cationiques et les TA non ioniques considérés comme peu toxiques. Ces conclusions se sont basées sur de nombreuses expériences *in vivo* ou *in vitro* dans lesquelles la toxicité de tensioactifs était évaluée en fonction de leur classe. Ainsi un individu dans chaque classe était représenté (Berardesca et al. 1990; Mullerdecker, Furstenberger, and Marks 1994; Osborne and Perkins 1994; Korting et al. 1994). Les techniques d'évaluation peuvent être différentes. Par exemple Baradesca et al. ont utilisé des techniques *in vivo* avec 24h de patch-test en occlusion puis mesure de la PIE, capacitance et scoring visuel. Osborne et al. ont réalisés des tests *in vitro* sur modèle de peau humaine avec respectivement les tests MTT, LDH et libération de marqueur d'inflammation. Bien que ces techniques soient différentes, les mêmes conclusions ont été énoncées. En raison de leur capacité à se lier aux protéines, les tensioactifs ioniques sont les plus irritants, ce qui justifie que le SDS est considéré comme un modèle positif d'irritation cutanée (Tupker et al. 1997). Cependant cela suggère également que les tensioactifs non ioniques sont tous très bien tolérés comme le montrent certaines études qui recensent très peu de cas de sensibilisation et d'allergie lors de l'utilisation de produits contenant des TA pégylés (Fruijtjer-Pöllöth 2005). Dans notre étude, certains tensioactifs non ioniques se sont avérés être aussi toxiques que certains TA ioniques, particulièrement la classe des éthers pégylés, et certains TA ioniques n'ont présenté aucune toxicité. Le paramètre de la charge portée par le tensioactif ne semble pas être discriminant pour expliquer sa toxicité. Ceci peut montrer que l'interaction du tensioactif avec les protéines n'est peut-être pas la cause unique de sa toxicité. En effet, Walters et al. ont étudié l'effet du SDS sur le stratum corneum par spectroscopie infrarouge et n'ont retrouvé aucune modification des bandes amides, reflétant une modification de la conformation des protéines

(Walters et al. 2012), en revanche une modification des bandes de stretching synonyme de perturbation de l'organisation lipidique a été observée, ce que nous avons pris en compte dans notre stratégie de recherche.

### *La nature de la liaison tête polaire/chaine alkyle*

Notre étude a montré que 4 éthers pégylés sur les 5 étudiés ont été responsables de toxicité cutanée. A contrario les 3 esters pégylés étudiés se sont révélés bien tolérés, avec cependant une composante inflammatoire notable pour le PEG-25 hydrogenated castor oil. Nos travaux rejoignent les résultats de Hofland et al qui ont étudié l'impact de vésicules d'esters et d'éthers pégylés sur des suspensions de kératinocytes en cultures.

Ces auteurs ont montré que les éthers pégylés inhibaient 50% de la prolifération cellulaire à une concentration dix fois moins élevée que pour les esters pégylés (Hofland et al. 1991). Leur étude montre en outre une certaine toxicité des TA non ioniques mais permet également d'établir une relation structure activité où la nature de la liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyle du tensioactif semble avoir un impact sur sa toxicité. Cette relation se trouve être en concordance avec nos résultats.

### *La concentration micellaire critique*

La toxicité cutanée du tensioactif est souvent expliquée par sa capacité à se lier aux protéines. Ainsi il a été montré que le TA se lie plus facilement aux protéines sous sa forme monomérique que sous une forme auto-assemblée en micelles (Imokawa and Mishima 1979; Jones 1992). Cette liaison présume une pénétration dans la matrice lipidique du stratum corneum et dans les kératinocytes, facilitée quand le TA est sous forme monomérique. Ce modèle monomérique de pénétration cutanée du tensioactif a été largement fondé sur le fait que l'irritation induite par les tensioactifs était fortement corrélée à la CMC (Klaus-P. Wilhelm et al. 1993; Faucher and Goddard 1978). Les micelles sont supposées ne pas être capables de pénétrer dans la peau de par leur grande taille. Ces conclusions font suite aux mêmes types d'expériences que pour la charge, comparant un tensioactif dans chaque classe chimique (anionique, cationique et non ionique). Le SDS a été souvent pris comme modèle. Il apparaît beaucoup plus irritant que le polysorbate 20 et possède une CMC vingt fois plus élevée, donc une concentration en monomère beaucoup plus forte, ce qui conforte la conclusion de plusieurs études indiquant que la forme monomérique est responsable de l'irritation cutanée (Corazza et al. 2010; Ananthapadmanabhan et al. 2004; Pezron et al. 1996). C'est dans cette volonté d'abaisser la

CMC pour diminuer l'irritation des produits, que dans les formules moussantes industrielles, contenant du SDS, d'autres tensioactifs, amphotères ou non ioniques sont ajoutés (Corazza et al. 2010).

Nous avons étudié l'impact de la CMC des TA sur la toxicité *in vitro*. Cependant, dans notre étude, la CMC n'a pu être calculée que pour les tensioactifs solubles dans l'eau et seule la famille des TA non ioniques possédait suffisamment d'individus dans ce cas pour pouvoir analyser l'influence de la CMC sur la toxicité cutanée. Afin de rendre compte de l'impact de la CMC sur les différentes réponses de toxicité cutanée, une matrice de corrélation a été calculée dans laquelle figure les coefficients de corrélations de Pearson entre la CMC et les réponses de toxicité cutanée. Grâce à cet outil statistique, nous avons pu montrer qu'aucune corrélation n'a été observée entre ces paramètres, supposant que la forme monomérique n'est pas la seule responsable de la toxicité cutanée.

Ces résultats sont appuyés par ceux de Otzen et al., qui ont montré que les quatre familles de tensioactifs (anionique, cationique, amphotère et non ionique) étaient capables de dénaturer l' $\alpha$ -lactalbumine. Les TA non chargés ne peuvent se lier aux protéines que par des liaisons hydrophobes faibles. Le déploiement de la protéine se fait de manière beaucoup plus lente dans le cadre de ces tensioactifs par rapport à ceux chargés. Aucune dénaturation n'est observée à une concentration en dessous de la CMC. Les monomères seuls, ne dénaturent pas la protéine, mais coopèrent avec les micelles dans le processus de dénaturation (Otzen, Sehgal, and Westh 2009). De plus des découvertes récentes ont également remis en question le modèle monomérique de pénétration cutanée, en montrant que l'irritation cutanée et la perturbation de la barrière augmentaient même au-delà de la CMC (Lu and Moore 2012; Moore et al. 2003). Il a également été suggéré que les micelles de SDS pouvaient pénétrer *via* les pores aqueux (Moore, Puvvada, and Blankschtein 2003). Saad et al. ont montré que le SDS pouvait pénétrer dans le SC sous forme de monomère ou de micelles et que ces micelles se désassemblaient rapidement pour former des micelles plus organisées avec les lipides du SC (Saad et al. 2012). Enfin la corrélation entre la CMC du tensioactif et sa toxicité n'a pas été démontrée dans des systèmes étudiés récemment (Apel-Paz, Doncel, and Vanderlick 2003; Walters et al. 2012).

### ***Longueur de la chaîne alkyle du tensioactif***

Ce paramètre structurel, a été aussi bien étudié pour les tensioactifs ioniques que non ioniques. Pour les tensioactifs anioniques, la chaîne en C12 comparativement aux chaînes de C2 à C18 est celle qui provoque :

- une adsorption maximale sur la kératine (Breuer, 1979),
- un gonflement maximal du SC (Rhein et al. 1986),
- des effets cliniques délétères (augmentation de la rugosité cutanée et augmentation de la PIE) (Imokawa, Sumura, and Katsumi 1975)
- la mortalité cellulaire la plus importante (Wilhelm, Samblebe, and Siegers 1994).

Ce résultat a été nuancé par l'étude de Breuer et al., qui a montré que l'adsorption des alkyl sulfates sur l'albumine sérique bovine (Breuer, 1979) ou sur une surface hydrophile (Jonsson 1998) augmentait avec la longueur de la chaîne de C2 à C18. Breuer a proposé un modèle de pénétration dépendant de la chaîne alkyle du tensioactif et dans lequel la liaison entre le TA et la protéine augmente avec la longueur de la chaîne alkyle du TA. Cependant, il souligne que la pénétration des chaînes dans la matrice protéique des cornéocytes est l'étape limitante et donc moindre pour les chaînes alkyles longues.

Un maximum d'effets biologiques néfastes a également été observé pour les tensioactifs non ioniques en C12. Ce même comportement des chaînes en C12 a été observé pour les tensioactifs non ioniques qui de plus agissent comme des promoteurs d'absorption (Florence et al. 1984). Cette propriété traduit leur capacité à interagir avec les lipides de la matrice du SC et à les fluidifier pour favoriser le passage de molécules. Ayala et al. ont observé ce même phénomène de promoteur d'absorption avec les esters de saccharose en C12 (Ayala-Bravo et al. 2003), tout comme Cázares-Delgado et al. Le laurate de saccharose favorise davantage le passage transcutané du chlorhydrate de lidocaïne sous forme de sel (molécule ionisée) comparativement à l'oléate de saccharose. L'effet opposé a été observé avec la lidocaïne sous forme de base non chargée par Cázares-Delgado et al. (Cázares-Delgado et al. 2005). Cependant, Walters et al. ont montré que l'efficacité des éthers pégylés en tant que promoteur d'absorption dépendait beaucoup de la molécule étudiée (Walters, Bialik, and Brain 1993). Cela rejoint les observations concernant la toxicité des tensioactifs non ioniques dans notre étude au sein d'une même famille. Nous avons observé une toxicité plus importante de l'ester de saccharose en C12 par rapport à l'ester de saccharose en C18 ou en C18-1. De la même façon, dans la classe des éthers le maximum de toxicité est observé pour le Laureth-23 (C12). Aucune, influence de la longueur de chaîne n'a cependant été démontrée concernant la famille des polysorbates.

## ***L'organisation du tensioactif en solution aqueuse ou en émulsion : notion de paramètre d'ordre***

Les précédents paramètres physicochimiques n'ayant pas donné de résultats concluant concernant l'explication de la toxicité des tensioactifs sur la peau, un nouveau paramètre, peu étudié dans ce contexte, a été choisi. Ce paramètre présente l'avantage d'être universel dans le sens où il est applicable à toutes les classes de tensioactifs, qu'ils soient chargés ou non. L'organisation du TA dans la phase aqueuse (phase continue de notre émulsion testée en toxicité *in vitro*) nous a paru être un paramètre pertinent à étudier car il rend compte de l'organisation et ainsi de la biodisponibilité du TA à la surface cutanée lors de l'application d'une émulsion sur la peau. Pour déterminer ce paramètre, des diagrammes de phases binaires (eau-TA) et ternaires (eau-TA-huile) ont été réalisés pour chaque TA. Ils consistent en un mélange de ces deux ou trois composants avec des concentrations croissantes en TA. Après avoir atteint leur état d'équilibre, ces mélanges ont été observés par microscopie en lumière polarisée afin de déterminer les types de phases organisées que le TA avait formées ou non. Pour quantifier ces observations, le paramètre d'ordre  $S$  a été utilisé puisqu'il possède une valeur caractéristique à chaque type de phase organisée ( $S=1$  pour une phase cristalline et  $S=0.4$  pour une phase micellaire par exemple). L'attribution pour chaque tensioactif d'une valeur de paramètre d'ordre représentant la première phase organisée observée au plus faible pourcentage de TA a permis de compléter la matrice de corrélation entre la physicochimie et la toxicité des TA de deux paramètres supplémentaires : les organisations du TA en phase aqueuse et en émulsion suite à l'observation des échantillons des diagrammes binaires et ternaires. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'importance de la capacité des TA à former des phases organisées dans la toxicité des TA ioniques. En effet, parmi les 8 TA ioniques étudiés en toxicité *in vitro*, trois se sont révélés très toxiques, deux TA anioniques, dont un étant utilisé à des pourcentages supérieurs aux recommandations du fournisseur et un TA cationique et 5 autres ont été bien tolérés et issus des deux mêmes familles cationiques et anioniques. Cette différence de comportement entre ces deux groupes de TA ioniques a pu être expliquée par la capacité des tensioactifs bien tolérés à former des phases cristallines ou lamellaire en phase aqueuse et en émulsion, contrairement aux TA toxiques qui ne se présentaient que sous forme micellaire. L'organisation du TA ionique à la surface de la peau semble être un paramètre important à prendre en compte pour expliquer sa toxicité cutanée.

Concernant les TA non ioniques ce paramètre n'a pas été adapté car il n'a pas été assez discriminant entre ces TA. En effet les TA non ioniques qui présentaient une phase organisée en présence d'eau n'en présentaient plus lorsqu'ils étaient en émulsion, adoptant tous le même comportement.

## **L'évaluation de la fonction barrière, quel lien avec la toxicité cutanée**

L'effet des tensioactifs sur la fonction barrière est délicat à étudier suivant les niveaux choisis. Concernant l'organisation des lipides matriciels, les techniques d'évaluation de la fonction barrière se perfectionnent. Cependant, ces techniques sont essentiellement utilisées avec la molécule modèle, le SDS (Saad et al. 2012; Walters et al. 2012; Mao et al. 2012). L'évaluation de l'effet du tensioactif à la surface de la peau a été étudiée par la détermination de l'énergie de surface de la peau et de la polarité de la peau suite à des mesures d'angles de contact. Cette technique, peu utilisée donne des conclusions différentes sur l'effet des tensioactifs sur la peau et surtout quant au rôle des lipides de surface sur la polarité de la peau. Mavon et al. ont montré que le fait de dégraisser la surface de la peau, diminuait sa mouillabilité, les lipides de surface apportant à la peau un caractère hydrophile. Lorsqu'il compare les angles de contact de l'eau sur la peau ou d'un liquide apolaire, le diiodométhane, avant et après dégraissage, il conclut que le fait d'enlever les lipides rend la peau plus hydrophobe (Mavon et al. 1997; Mavon et al. 1998). Notre méthode est fondée sur l'évaluation de 6 liquides standard afin d'avoir un comportement global de la peau. On a pu constater que presque tous les TA augmentaient la polarité de la peau. Rosenberg explique que cette augmentation de polarité serait due à la rémanence des TA sur la peau (Rosenberg, Williams, and Cohen 1973). Cependant aucune étude de polarité n'a été complétée par d'autres expériences sur la fonction barrière pour approfondir les raisons pour lesquelles le TA modifie la polarité de la peau. Une augmentation de la polarité de la peau suite au traitement par un TA pourrait en effet être la cause de différentes actions du TA sur la peau. Le TA, de par ses propriétés détergentes peut extraire les lipides présents à la surface de la peau. Ces lipides, sont majoritairement des lipides apolaires tels que les triglycérides. Une extraction ciblée des triglycérides entrainerait un déséquilibre dans la balance entre les lipides polaires (céramides) et les lipides apolaires au profit des lipides polaires rendant ainsi la surface cutanée plus polaire. Une deuxième action du tensioactif peut être envisagée. L'insertion des molécules de TA au sein de la matrice lipidique, exposant leur tête polaire à la surface de la peau, augmenterait la mouillabilité et la polarité de la peau. Enfin le TA peut tout simplement rester rémanent à la surface cutanée sans engendrer d'autres perturbation cutanée mais

provoquant une augmentation de la polarité de la surface de la peau. C'est en se basant sur ces hypothèses que la suite de l'investigation sur la fonction barrière a été pensée.

L'extraction des lipides du stratum corneum par les tensioactifs reste aussi assez controversée au niveau des conclusions sur les classes de lipides les plus touchées et la quantité de lipides extraits. Ce niveau d'évaluation reste très dépendant des méthodes utilisées par différents auteurs et ceci explique les nombreuses conclusions apparues dans la littérature et décrites précédemment dans ce manuscrit. Notre méthode a permis de rendre compte du pouvoir détergent de certains tensioactifs tel que le TA cationique, le Distearyl dimmonium chloride, n'extrayant que les lipides de surface (les triglycérides) et le pouvoir extractif d'autres tensioactifs (le SDS et le Cetyl trimethylammonium chloride) sur les lipides intercornéocytaires, perturbant significativement la barrière cutanée. Seuls les tensioactifs ioniques ont eu un effet sur l'extraction des lipides, le facteur « charge » peut avoir une influence sur ce paramètre. Cependant ce facteur « charge » a été montré précédemment comme n'ayant pas de lien avec la toxicité cutanée du TA ce qui se retrouve ici puisque l'extraction lipidique, ainsi que la polarité n'ont pas été corrélées avec la toxicité du tensioactif.

Comme décrit précédemment certains tensioactifs ioniques et non ioniques sont connus pour pouvoir désorganiser la matrice lipidique, cette fonction étant utilisée pour promouvoir l'absorption de molécules à travers la peau (Williams and Barry 2012). L'étude de la désorganisation de la matrice lipidique suite au traitement par une solution de TA a été effectuée grâce à la spectroscopie infrarouge. Une organisation latérale compacte des lipides matriciels est un des paramètres expliquant la fonction barrière. Damien et Boncheva (2010) ont montré que plus la phase OR, la plus organisée, était présente au sein des lipides du SC, moins il y avait d'augmentation potentielle de la PIE. De la Maza et al. ont montré dans une étude sur les liposomes que la première étape de perturbation de la matrice lipidique intercornéocyttaire par les TA était associée à leur intercalation dans la matrice lipidique. (Maza et al., 1997). Ceci a pour conséquence une fluidification de la matrice lipidique et une altération de la fonction barrière de la peau. Dans notre étude, deux TA ioniques, le SDS et le Cetyl trimethylammonium chloride ainsi que 3 TA non ioniques, le Laureth-23, le PEG-25 hydrogenated castor oil et la lécithine hydrogénée ont été responsables d'une fluidification de la matrice lipidique, comme l'a montré le déplacement de la bande des vibrations CH<sub>2</sub> stretching symétriques vers des plus forts nombres d'ondes. Ces changements indiquent une transition de phase OR-HEX soit une désorganisation de la matrice lipidique. Contrairement aux résultats de Mao et al. qui ont montré un faible déplacement de pic après 40h d'exposition au SDS, dans notre étude, un

déplacement de pic significatif a été enregistré après 1h de contact seulement. Cette différence est probablement due au fait que notre solution de SDS était dix fois plus concentrée. Dans notre étude, la toxicité des tensioactifs a pu être reliée à un des trois niveaux de perturbation de la barrière cutanée : la désorganisation de la matrice lipidique. Cette observation peut expliquer la toxicité de certains tensioactifs non ioniques qui n'ont pas de pouvoir d'extraction mais qui sont capables de pénétrer dans la matrice et d'aller au contact des cornéocytes et provoquer l'initiation d'une réaction inflammatoire. Cela peut expliquer également les observations concernant la toxicité des tensioactifs ioniques, pour lesquels nous avons mis en évidence un nouveau paramètre physicochimique expliquant l'innocuité ou la toxicité du tensioactif. La capacité des tensioactifs à former des phases cristallines dans l'eau s'est révélée être un paramètre important dans l'innocuité de ces tensioactifs pourtant chargés. En effet, les tensioactifs qui cristallisent sont peu solubles dans l'eau. C'est probablement leur faible solubilité dans l'eau qui est la cause de leur faible toxicité car ils ont des difficultés à se transférer dans la peau. Si malgré leur faible solubilité, ces tensioactifs se transfèrent vers la peau et se mélangent aux lipides du SC, leur tendance à cristalliser, c'est à dire à former des phases à chaînes grasses très organisées, ne fluidifie pas les lipides du SC. Cela pourrait peut-être même augmenter l'organisation des lipides du SC, c'est-à-dire améliorer la fonction barrière.

## Conclusions et perspectives

A travers cette étude analysant une grande variété de tensioactifs sur plusieurs paramètres cutanés, certaines conclusions existantes sur le comportement du tensioactif sur la peau ont été remises en question.

En effet, la toxicité de certains tensioactifs non ioniques, réputés très doux pour la peau a été démontrée. Au contraire, les tensioactifs ioniques connus pour leur fort pouvoir irritant n'ont pas tous été responsables d'une toxicité. Ceci a été expliqué par le comportement physicochimique du tensioactif en phase aqueuse et sa capacité de former des phases organisées. Des paramètres clé expliquant la toxicité cutanée tels que la CMC, la charge, et la longueur des chaînes alkyles n'ont pas été reconnus comme pertinents dans cette étude. Seule la nature de la liaison entre la tête polaire et la chaîne alkyle du tensioactif semble avoir un effet au regard de la plus forte toxicité engendrées par les éthers pégylés comparativement aux esters.

La modification de la polarité de la peau ou l'extraction lipidique par les tensioactifs ne sont pas des paramètres suffisamment discriminants pour rendre compte de la toxicité des tensioactifs. En revanche, la désorganisation de la matrice lipidique par les tensioactifs semble être liée à son pouvoir irritant.

Pour approfondir et renforcer ces conclusions, d'autres tests rendant compte de la fonction barrière comme des mesures de PIE et des tests de pénétration cutanée d'une molécule hydrophile et d'une molécule hydrophobe pourraient être envisagés. Ces tests de pénétration cutanée pourraient se faire sur peau préalablement traitée par une solution de tensioactif pour voir les dommages causés par le tensioactif sur la fonction barrière. Des tests où la molécule serait directement dans la solution de tensioactif permettraient d'évaluer une cinétique de la dégradation de la fonction barrière.

De plus afin de conforter l'hypothèse que la cristallisation des tensioactifs réduit leur toxicité, des études de toxicité *in vitro* pourraient être réalisées avec d'autres tensioactifs ioniques présentant ou non des phases cristallines en solution aqueuse pour renforcer les études statistiques en augmentant le nombre d'individus.

Des évaluations de l'organisation de la matrice lipidique avec ces TA permettraient de renforcer l'observation que cette étape est déterminante pour expliquer la toxicité du TA. Des expériences en spectroscopie infrarouge ou Raman avec des TA toxiques marqués permettraient d'apprécier plus précisément le comportement du TA lorsqu'il pénètre dans la peau, pouvant expliquer que certains engendrent une mortalité cellulaire et d'autres une simple libération de marqueurs d'inflammation.

# **ANNEXES**



## Annexe 1. HLB des différents tensioactifs

	Nom commercial	Nom INCI	HLB
<b>Anionique</b>	Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate	<b>20,2</b>
	Dermofeel SL	(and) Dicapryl Phosphate Sodium stearyl lactylate	17
	Lipo Stearic Acid	Stearic acid	15
	Texapon K12	Sodium lauryl sulfate	<b>40</b>
	Eumulgin SG	Sodium Stearyl Glutamate	<b>43,2</b>
<b>Cationique</b>	Incroquat TMS	Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol	<b>35,3</b>
	Varisoft 300	Cetyl trimethylammonium Chloride/CTAC	15,8
	Varisoft TA100	Distearyldimonium Chloride	10,5
<b>Ether de PEG</b>	Brij S2/BrijS721	Steareth-2 Steareth-21	<b>9,2</b>
	BrijC10	Ceteth-10	12,9
	BrijS100	Steareth-100	19
	EumulginBA25	Beheneth-25	15,4
	LipocolL23	Laureth-23	17
	LipocolO20	Oleth-20	15,5
<b>Ester de PEG</b>	Apifil CG	PEG-8 beeswax	<b>9,4</b>
	Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	11,8
	Lipopeg100S	PEG-100 stearate	18,9
	Lipopeg10S	PEG-20 stearate	15,6
<b>Ester de sucrose</b>	Surfhope C1216	Sucrose Laurate	16
	Surfhope C1715	Sucrose oleate	15
	Surfhope C1816	Sucrose stearate	16
<b>Ester de sorbitan POE</b>	Montanox60	Polysorbate 60	14,9
	Montanox80	Polysorbate 80	15
	Tween20	Polysorbate 20	16,7
<b>Ester de polyglycérol</b>	Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	14
<b>Autres non ionique</b>	Arlacel 2121	Sorbitan stearate (and) Sucrose cocoate	<b>6</b>
	Emuliumdelta	Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and) PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20	<b>9</b>
	Emulmetik 320	Hydrogenated lecithin	11
	Glucamate/Glucate	PEG-20 Methyl Glucose Sesquistearate Methyl Glucose sesquistearate	10,4
	Gransurf 61	PEG-12 Dimethicone	14
	Inutec SP1	Inulin lauryl carbamate	<b>8</b>
	Montanov202	Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside	<b>8</b>
	Montanov68	Cetearyl Alcohol & Cetearyl Glucoside	10
	Pellicer L30	Water (and) Sodium Dilauramidoglutamide Lysine	16,2
	Simulgreen 18-2	Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside	14
	Simulsol 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	11

## Annexe 2. pH des solutions et émulsions

	Nom commercial	Nom INCI	pH solution aqueuse	pH émulsion
<b>Anionique</b>	Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate (and) Dicapryl Phosphate	<b>2,33</b>	<b>2,74</b>
	Dermofeel SL	Sodium stearoyl lactylate	5,04	6,44
	Lipo Stearic Acid	Stearic acid	4,26	
	Texapon K12	Sodium lauryl sulfate	<b>7,4</b>	<b>8,2</b>
	Eumulgin SG	Sodium Stearoyl Glutamate	<b>8,64</b>	<b>9,05</b>
<b>Cationique</b>	Incroquat TMS	Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol	6,05	<b>4,7</b>
	Varisoft 300	Cetyl trimethylammonium Chloride/CTAC	6,83	5,79
	Varisoft TA100	Distearyldimonium Chloride	5,11	<b>4,57</b>
<b>Mixte de PEI</b>	Brij S2/BrijS721	Steareth-2	4,61	5,88
		Steareth-21		
	BrijC10	Ceteth-10	4,25	5,31
	BrijS100	Steareth-100	8,17	7,04
	EumulginBA25	Beheneth-25	5,71	5,3
	LipocolL23	Laureth-23	5,51	7,03
	LipocolO20	Oleth-20	4,3	6,83
<b>Mixte de PEI</b>	Apifil CG	PEG-8 beeswax	4,87	5,63
	Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	4,65	5,26
	Lipopeg100S	PEG-100 stearate	6,56	6,47
	Lipopeg10S	PEG-20 stearate	<b>3,02</b>	<b>4,67</b>
<b>Mixte de sucre</b>	Surfhope C1216	Sucrose Laurate	5,84	6,36
	Surfhope C1715	Sucrose oleate	<b>2,71</b>	<b>4,48</b>
	Surfhope C1816	Sucrose stearate	5,58	5,67
<b>Mixte de sorbitar</b>	Montanox60	Polysorbate 60	5,75	6,77
	Montanox80	Polysorbate 80	5,69	6,68
	Tween20	Polysorbate 20	3,43	5,93
<b>Mixte de polygly</b>	Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	6,07	6,08
<b>Mixtes non ioni</b>	Arlacel 2121	Sorbitan stearate (and) Sucrose cocoate	7,13	6,9
	Emuliumdelta	Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and) PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20	4,3	4,9
	Emulmetik 320	Hydrogenated lecithin	6,56	6,51
	Glucamate/Glucate	PEG-20 Methyl Glucose Sesquistearate Methyl Glucose sesquistearate	5,46	6,71
	Gransurf 61	PEG-12 Dimethicone	<b>8,06</b>	<b>7,22</b>
	Inutec SP1	Inulin lauryl carbamate	6,45	5,55
	Montanov202	Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside	5,93	5,71
	Montanov68	Cetearyl Alcohol & Cetearyl Glucoside	7,35	5,88
	Pellicer L30	Water (and) Sodium Dilauramidoglutamide Lysine	<b>7,69</b>	<b>7,52</b>
	Simulgreen 18-2	Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside	7,48	7,05
	Simulsol 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	6,66	5,87

## Annexe 3. Tensions superficielles et interfaciales

	Nom commercial	Nom INCI	Tension interfaciale (mN.m <sup>-1</sup> )	Tension superficielle (mN.m <sup>-1</sup> )
<b>Anionique</b>	Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate (and) Dicapryl Phosphate		
	Dermofeel SL	Sodium stearoyl lactylate		
	Lipo Stearic Acid	Stearic acid		
	Texapon K12	Sodium lauryl sulfate	2,9	35,1
	Eumulgin SG	Sodium Stearoyl Glutamate	5,0	40,2
<b>Cationique</b>	Incroquat TMS	Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol		
	Varisoft 300	Cetyl trimethylammonium Chloride/CTAC	4,6	35,9
	Varisoft TA100	Distearyldimonium Chloride		
<b>Ether de PEG</b>	Brij S2/BrijS721	Steareth-2 Steareth-21		
	BrijC10	Ceteth-10		
	BrijS100	Steareth-100	12,5	51,1
	EumulginBA25	Beheneth-25	6,8	45,8
	Lipocoll23	Laureth-23	6,8	43,1
	LipocolO20	Oleth-20	4,3	39,7
<b>Ester de PEG</b>	Apifil CG	PEG-8 beeswax		
	Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	3,4	42,1
	Lipopeg100S	PEG-100 stearate	8,7	43,7
	Lipopeg10S	PEG-20 stearate	4,9	36,1
<b>Ester de sucrose</b>	Surfhope C1216	Sucrose Laurate	2,0	30,8
	Surfhope C1715	Sucrose oleate	0,8	33,4
	Surfhope C1816	Sucrose stearate	2,9	37,0
<b>Ester de sorbitan POE</b>	Montanox60	Polysorbate 60	1,9	37,5
	Montanox80	Polysorbate 80	3,7	36,3
	Tween20	Polysorbate 20	4,9	36,6
<b>Ester de polyglycérol</b>	Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	1,9	30,6
<b>Autres non ionique</b>	Arlacel 2121	Sorbitan stearate (and) Sucrose cocoate		
	Emuliumdelta	Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and) PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20		
	Emulmetik 320	Hydrogenated lecithin	9,6	51,2
	Glucamate/Glucate	PEG-20 Methyl Glucose Sesquistearate Methyl Glucose sesquistearate		
	Gransurf 61	PEG-12 Dimethicone	4,6	29,9
	Inutec SP1	Inulin lauryl carbamate	9,7	46,8
	Montanov202	Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside		
	Montanov68	Cetearyl Alcohol & Cetearyl Glucoside		
	Pellicer L30	Water (and) Sodium Dilauramidoglutamide Lysine	11,7	46,8
	Simulgreen 18-2	Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside		
	Simulsol 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate		

## Annexe 4. CMC, PAC et caractéristiques micellaires.

	Nom commercial	Nom INCI	CMC (g.L <sup>-1</sup> )	PAC	Caractéristiques
<b>Anionique</b>	Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate (and) Dicetyl Phosphate			
	Dermofeel SL	Sodium stearoyl lactylate			
	Lipo Stearic Acid	Stearic acid			
	Texapon K12	Sodium lauryl sulfate	2	0,5	micelles cylindriques
	Eumulgin SG	Sodium Stearoyl Glutamate			
<b>Cationique</b>	Incroquat TMS	Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol			
	Varisoft 300	Cetyl trimethylammonium Chloride/CTAC	2,51	0,6	micelles cylindriques
	Varisoft TA100	Distearyldimonium Chloride			
<b>Ether de PEG</b>	Brij S2/BrijS721	Steareth-2 Steareth-21			
	BrijC10	Ceteth-10			
	BrijS100	Steareth-100	0,03	0,3	micelles sphériques
	EumulginBA25	Beheneth-25	0,13	0,3	micelles sphériques
	LipocolL23	Laureth-23	0,22	0,2	micelles sphériques
	LipocolO20	Oleth-20	0,04	0,4	micelles cylindriques
<b>Ester de PEG</b>	Apifil CG	PEG-8 beeswax			
	Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	0,13	0,4	micelles cylindriques
	Lipopeg100S	PEG-100 stearate	0,13	0,2	micelles sphériques
	Lipopeg10S	PEG-20 stearate	0,06	0,4	micelles cylindriques
<b>Ester de sucrose</b>	Surfhope C1216	Sucrose Laurate	0,16	0,3	micelles sphériques
	Surfhope C1715	Sucrose oleate	0,18	0,6	micelles cylindriques
	Surfhope C1816	Sucrose stearate	0,1	1,6	systèmes inverses
<b>Ester de sorbitan POE</b>	Montanox60	Polysorbate 60	0,071	0,4	micelles cylindriques
	Montanox80	Polysorbate 80	0,063	0,3	micelles cylindriques
	Tween20	Polysorbate 20	0,11	0,5	micelles cylindriques
<b>Ester de polyglycérol</b>	Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	0,35	0,4	micelles cylindriques
<b>Autres non ionique</b>	Arlacel 2121	Sorbitan stearate (and) Sucrose cocoate			
	Emuliumdelta	Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and) PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20			
	Emulmetik 320	Hydrogenated lecithin			
	Glucamate/Glucate	PEG-20 Methyl Glucose Sesquistearate Methyl Glucose sesquistearate			
	Gransurf 61	PEG-12 Dimethicone	0,43		
	Inutec SP1	Inulin lauryl carbamate			
	Montanov202	Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside			
	Montanov68	Cetearyl Alcohol & Cetearyl Glucoside			
	Pellicer L30	Water (and) Sodium Dilauramidoglutamide Lysine	1,06	0,3	micelles sphériques
	Simulgreen 18-2	Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside			
	Simulsol 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate			

## Annexe 5. Granulométrie (d0.5 en µm)

	Nom commercial	Nom INCI	Span	d0,5
<b>Anionique</b>	Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate (and) Dicapryl Phosphate	0,96	18,3
	Dermofeel SL	Sodium stearoyl lactylate	1,77	8,5
	Lipo Stearic Acid	Stearic acid	3,88	40,5
	Texapon K12	Sodium lauryl sulfate	1,13	6,3
	Eumulgin SG	Sodium Stearoyl Glutamate	<b>9,57</b>	11,8
<b>Cationique</b>	Incroquat TMS	Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol	1,60	<b>79,6</b>
	Varisoft 300	Cetyl trimethylammonium Chloride/CTAC	0,86	8,2
	Varisoft TA100	Distearyldimonium Chloride	1,60	28,9
<b>Ether de PEG</b>	Brij S2/BrijS721	Steareth-2 Steareth-21	1,22	21,0
	BrijC10	Ceteth-10	1,49	7,0
	BrijS100	Steareth-100	1,00	50,0
	EumulginBA25	Beheneth-25	1,32	20,3
	LipocolL23	Laureth-23	0,97	26,0
	LipocolO20	Oleth-20	0,95	17,9
<b>Ester de PEG</b>	Apifil CG	PEG-8 beeswax	1,14	12,4
	Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	1,56	4,0
	Lipopeg100S	PEG-100 stearate	1,13	27,0
	Lipopeg10S	PEG-20 stearate	1,14	7,4
<b>Ester de sucrose</b>	Surfhope C1216	Sucrose Laurate	0,96	9,5
	Surfhope C1715	Sucrose oleate	2,17	28,3
	Surfhope C1816	Sucrose stearate	1,54	13,5
<b>Ester de sorbitan POE</b>	Montanox60	Polysorbate 60	1,25	8,0
	Montanox80	Polysorbate 80	1,30	12,3
	Tween20	Polysorbate 20	0,90	14,1
<b>Ester de polyglycérol</b>	Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	1,13	10,7
<b>Autres non ionique</b>	Arlacel 2121	Sorbitan stearate (and) Sucrose cocoate Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and)	1,93	<b>3,5</b>
	Emuliumdelta	PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20	2,34	4,5
	Emulmetik 320	Hydrogenated lecithin	1,73	27,7
	Glucamate/Glucate	PEG-20 Methyl Glucose Sesquistearate Methyl Glucose sesquistearate	1,28	14,9
	Gransurf 61	PEG-12 Dimethicone	1,11	33,4
	Inutec SP1	Inulin lauryl carbamate	1,92	12,2
	Montanov202	Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside	1,39	13,7
	Montanov68	Cetearyl Alcohol & Cetearyl Glucoside	1,51	14,2
	Pellicer L30	Water (and) Sodium Dilauramidoglutamide Lysine	<b>0,77</b>	30,6
	Simulgreen 18-2	Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside	1,40	26,1
	Simulsol 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	1,73	21,8

## Annexe 6. Viscosité

	Nom commercial	Nom INCI	Viscosité (mPa.s <sup>-1</sup> )
<b>Anionique</b>	Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate	640
	Dermofeel SL	(and) Dicetyl Phosphate Sodium stearyl lactylate	861
	Lipo Stearic Acid	Stearic acid	992
	Texapon K12	Sodium lauryl sulfate	645
	Eumulgin SG	Sodium Stearyl Glutamate	660
<b>Cationique</b>	Incroquat TMS	Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol	<b>1147</b>
	Varisoft 300	Cetyl trimethylammonium Chloride/CTAC	613
	Varisoft TA100	Distearyldimonium Chloride	749
<b>Ether de PEG</b>	Brij S2/BrijS721	Steareth-2 Steareth-21	438
	BrijC10	Ceteth-10	547
	BrijS100	Steareth-100	553
	EumulginBA25	Beheneth-25	577
	LipocolL23	Laureth-23	467
	LipocolO20	Oleth-20	445
<b>Ester de PEG</b>	Apifil CG	PEG-8 beeswax	<b>348</b>
	Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	380
	Lipopeg100S	PEG-100 stearate	416
	Lipopeg10S	PEG-20 stearate	521
<b>Ester de sucrose</b>	Surfhope C1216	Sucrose Laurate	507
	Surfhope C1715	Sucrose oleate	625
	Surfhope C1816	Sucrose stearate	457
<b>Ester de sorbitan POE</b>	Montanox60	Polysorbate 60	344
	Montanox80	Polysorbate 80	398
	Tween20	Polysorbate 20	595
<b>Ester de polyglycérol</b>	Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	567
<b>Autres non ionique</b>	Arlacel2121	Sorbitan stearate (and) Sucrose cocoate Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and)	630
	Emuliumdelta	PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20	957
	Emulmetik 320	Hydrogenated lecithin	641
	Glucamate/Glucate	PEG-20 Methyl Glucose Sesquistearate Methyl Glucose sesquistearate	403
	Gransurf 61	PEG-12 Dimethicone	551
	Inutec SP1	Inulin lauryl carbamate	479
	Montanov202	Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside	582
	Montanov68	Cetearyl Alcohol & Cetearyl Glucoside	1026
	Pellicer L30	Water (and) Sodium Dilauramidoglutamide Lysine	632
	Simulgreen 18-2	Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside	1007
	Simulsol 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	376

## Annexe 7. Organisation des tensioactifs en phase aqueuse et en émulsion.

	Nom commercial	Nom INCI	S binaire 25°C	S binaire 70°C	S ternaire 25°	S ternaire 70°
<b>Anionique</b>	Crodafos CS20A	Cetearyl Alcohol (and) Ceteth-20 Phosphate (and) Dicetyl Phosphate	0,6	0,6	0,4	0,4
	Dermofeel SL	Sodium stearyl lactylate	1	0,4	1	0,4
	Lipo Stearic Acid	Stearic acid	1	0,4	1	0,4
	Texapon K12	Sodium lauryl sulfate	0,4	0,4	0,4	0,4
	Eumulgin SG	Sodium Stearoyl Glutamate	1	0,4	1	0,6
<b>Cationique</b>	Incroquat TMS	Behentrimonium Methosulfate (and) Cetearyl Alcohol	0,6/1	0,6	0,6/1	0,6
	Varisoft 300	Cetyl trimethylammonium Chloride/CTAC	0,4	0,4	0,4	0,4
	Varisoft TA100	Distearyldimonium Chloride	0,6	0,6	1	0,4
<b>Ether de PEG</b>	Brij S2/BrijS721	Steareth-2 Steareth-21	1	0,4	0,6	0,4
	BrijC10	Ceteth-10	0,6	0,6	0,4	0,4
	BrijS100	Steareth-100	0,4	0,4	0,4	0,4
	EumulginBA25	Beheneth-25	0,5	0,5	0,4	0,6
	LipocolL23	Laureth-23	0,4	0,4	0,4	0,4
	LipocolO20	Oleth-20	0,4	0,6	0,4	0,4
<b>Ester de PEG</b>	Apifil CG	PEG-8 beeswax	1	0,4	1	0,4
	Croduret 25	PEG-25 hydrogenated castor oil	0,6	0,4	0,4	0,4
	Lipopeg100S	PEG-100 stearate	0,4	0,4	0,4	0,4
	Lipopeg10S	PEG-20 stearate	1	0,4	0,6	0,4
<b>Ester de sucrose</b>	Surfhope C1216	Sucrose Laurate	0,4	0,4	0,4	
	Surfhope C1715	Sucrose oleate	0,6	0,4	0,4	
	Surfhope C1816	Sucrose stearate	1	1	0,4	
<b>Ester de sorbitan POE</b>	Montanox60	Polysorbate 60	1	0,4	0,6	0,4
	Montanox80	Polysorbate 80	0,4	0,4	0,4	0,4
	Tween20	Polysorbate 20	0,4	0,4	0,4	0,4
<b>Ester de polyglycérol</b>	Dermofeel G5L	Polyglyceryl-5 laurate	0,4	0,4	0,4	0,4
<b>Autres non ionique</b>	Arlacel2121	Sorbitan stearate (and) Sucrose cocoate	1	0,4	0,4	0,4
	Emuliumdelta	Cetyl alcohol (and) Gyceryl Stearate (and) PEG-75 stearate (and) ceteth-20 (and) Steareth-20	1	0,4	0,4	0,4
	Emulmetik 320	Hydrogenated lecithin	1	1	0,6	
	Glucamate/Glucate	PEG-20 Methyl Glucose Sesquistearate Methyl Glucose sesquistearate	1	0,4	0,4	0,4
	Gransurf 61	PEG-12 Dimethicone	0,4	0,6	0,4	0,6
	Inutec SP1	Inulin lauryl carbamate	1	1	0,4	
	Montanov202	Arachidyl Alcohol & Behenyl Alcohol & Arachidyl Glucoside	1	0,4	0,6	0,4
	Montanov68	Cetearyl Alcohol & Cetearyl Glucoside	1	0,4	0,6	0,4
	Pellicer L30	Water (and) Sodium Dilauramidoglutamide Lysine	0,4	0,4	0,4	0,6
	Simulgreen 18-2	Hydroxystearyl Alcohol & Hydroxystearyl Glucoside	1	0,4	0,6	0,4
	Simulsol 165	Glyceryl Stearate (and) PEG-100 Stearate	1	0,4	1	0,4

# Annexe 8. Focus peau sèche : L'importance des lipides cutanés pour le maintien de l'hydratation des peaux sèches

Medical Staff - Dermatologie

3

## FOCUS PEAU SÈCHE

L'importance des lipides cutanés pour le maintien de l'hydratation des peaux sèches

Importance of skin lipids in maintaining hydration in dry skins

E. LEMERY, S. BRIANÇON, M-A. BOLZINGER

\* Université Lyon 1, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Laboratoire de Dermopharmacie et Cosmétologie ; UMR CNRS 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP), Villeurbanne

### Mots-clés

Lipides cutanés  
Barrière cutanée  
Perte en eau

### Key-words

Cutaneous lipids  
Cutaneous barrier  
Water loss

C'est à partir des années 1950 que l'hydratation du stratum corneum (SC) a été considérée comme un facteur clé pour le maintien de l'intégrité de la fonction barrière. Les avancées scientifiques dans ce domaine ont permis d'identifier le rôle des lipides cutanés intercornéocytaires, et plus particulièrement de leur organisation structurale dans le contrôle de la perméabilité du SC. La composition des lipides, ainsi que leur organisation peuvent être incriminés dans de nombreuses pathologies cutanées, responsables d'un état de peau sèche.

## L'organisation des lipides intercornéocytaires

Macroscopiquement, le stratum corneum (SC) apparaît comme un modèle de briques (cornéocytes) et de mortier (matrice lipidique)<sup>(1)</sup>. Il s'agit de la première description qui en a été faite en 1983. Plusieurs modèles ont ensuite été proposés pour représenter l'organisation supramoléculaire de cette matrice : empilement monocouche (« *stacked monolayer model* »)<sup>(2)</sup>, domaine mosaïque<sup>(3)</sup>, modèle de « phase de gel simple »<sup>(4)</sup>, modèle sandwich<sup>(5)</sup> et modèle « *asymmetric bilayer model* »<sup>(6)</sup>.

La matrice lipidique est composée essentiellement de cholestérol, d'acides gras libres (AGL) et de céramides (CER)<sup>(7)</sup>. Il a été montré que l'arrangement lamellaire des lipides est constitué de deux motifs se répétant : une phase de longue périodicité de 13 nm (LPP) et une de courte périodicité 6 nm (SPP)<sup>(8-10)</sup>. En plus de l'organisation lamellaire, les lipides, de par les chaînes insaturées des céramides et des acides gras, présentent une organisation latérale compacte créant des domaines ordonnés qui contrôlent la perméabilité du SC. Trois phases différentes sont observées :

- la phase orthorhombique (OR), la plus dense, avec un arrangement compact des lipides<sup>(11)</sup> ;
- la phase cristalline liquide (LIQ) peu compacte permettant une plus grande fluidité des lipides cutanés, mais elle n'est pas systématiquement observée ;

Hydration of the stratum corneum (SC), the outermost epidermal layer, was first considered as being a key factor in maintaining the skin barrier function in the 1950s. Scientific advances in this field led to the determination of the role of intercornéocyte skin lipids, and particularly their structural organization, in controlling SC permeability. The lipid composition and organization could be involved in many skin diseases that cause dry skin.

## Intercornéocyte lipid organization

Macroscopically, the stratum corneum (SC) seemed to have a brick (cornéocytes) and mortar (matrix lipids) configuration<sup>(1)</sup>. This was how it was first described in 1983. Several other models were then proposed to represent the supramolecular organization of this matrix, including: the stacked monolayer model<sup>(2)</sup>, the domain mosaic model<sup>(3)</sup>, the single gel phase model<sup>(4)</sup>, the sandwich model<sup>(5)</sup> and the asymmetric bilayer model<sup>(6)</sup>.

The lipid matrix is mainly composed of cholesterol, free fatty acids (AGL) and ceramides (CER)<sup>(7)</sup>. It was shown that the lamellar lipid arrangement consists of two repeated motifs, i.e. one with a long 13 nm periodicity phase (LPP) and the other with a short 6 nm periodicity phase (SPP)<sup>(8-10)</sup>. In addition to this lamellar

#### 4 Focus : peau sèche

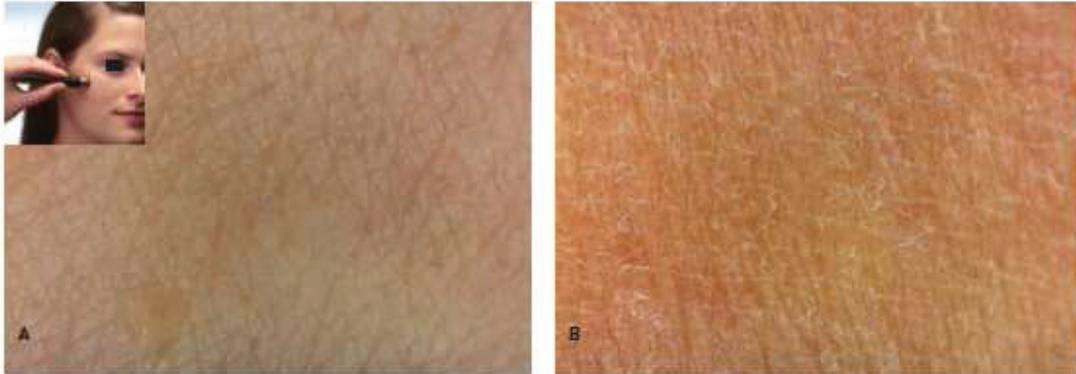


Figure 1. Mesure de capacitance en valeur arbitraire prise au Corneometer CM825 Courage & Khazaka. A : peau hydratée : CM825 > 40 A.U. B : Peau très sèche : CM825 < 30 A.U.  
Capacitance measured in arbitrary values using a Corneometer CM825 Courage&Khazaka. A: Hydrated skin: CM825 > 40 A.U. B: Very dry skin: CM825 < 30 A.U.  
Source : JJSBF Scientific Affairs.

– la phase hexagonale (HEX), intermédiaire. Elle est majoritaire en surface, en raison de la présence de lipides sébacés, le reste des lipides du SC étant sous forme OR<sup>19</sup>.

L'organisation en phase OR semble déterminante pour la fonction barrière. M. Boncheva et F. Damien<sup>17</sup> ont mis en évidence une corrélation entre la diminution de la perte insensible en eau (PIE) et la présence de la phase OR. Cependant, D. Groen et J. Bouwstra<sup>12</sup> n'arrivent pas à la même conclusion en étudiant un autre paramètre : la perméabilité à l'acide benzoïque. La structure lamellaire et la présence de LPP semblent dans leur cas être déterminantes pour la fonction barrière.

Le ciment lipidique constitue donc une barrière plus ou moins compacte vis-à-vis du passage de l'eau<sup>15</sup>, mais d'autres structures permettent de retenir l'eau :

- l'enveloppe cornée et les cornéodesmosomes matures créent des tortuosités sur le chemin de diffusion de l'eau ;
- les facteurs naturels d'hydratation (NMF), molécules hygroscopiques largement citées dans la littérature<sup>16-19</sup> ;
- les aquaporines<sup>20,21</sup> ;
- et le film hydrolipidique par son action occlusive.

### Peaux sèches et pathologiques : quand les lipides matriciels sont touchés

Une étude épidémiologique, réalisée sur 4 508 individus d'âge supérieur à 15 ans, de 8 pays européens différents (France, Italie, Grèce, Portugal, Allemagne, Suisse, Belgique et Espagne), révèle que la peau sèche concerne 37 % des personnes interrogées, avec une majorité de femmes (59,5 %)<sup>22</sup>. On parle de peau sèche lorsque la teneur en eau du SC est inférieure à 10 %, en-deçà de cette valeur on observe l'apparition de squames, ainsi qu'une perte d'éclat et de souplesse<sup>23</sup>. En revanche, les teneurs en eau du derme et de l'hypoderme sont inchangées<sup>24</sup>. De nombreuses modifications de la matrice lipidique sont retrouvées dans les peaux sèches<sup>25-28</sup>. Une diminution du contenu en

organization, and due to the presence of ceramides and fatty acids unsaturated chains, lipids have a compact lateral organization creating ordered domains that control SC permeability. Three different phases may be observed:

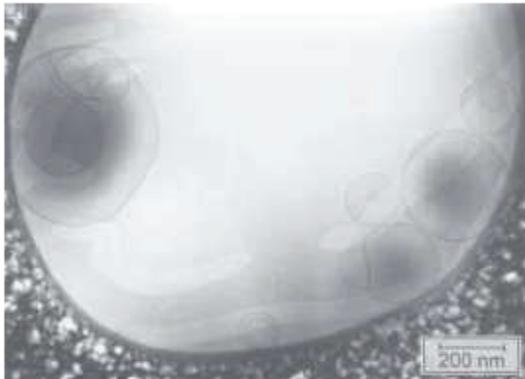
- the orthorhombic phase (OR) is the densest, with a compact lipid arrangement<sup>11</sup> ;
- the liquid crystalline phase (LIQ) is not very compact, enabling greater skin lipid fluidity, but it is not always observed ;
- and finally, the hexagonal phase (HEX) is an intermediary phase. It occurs mainly on the surface due to the presence of sebaceous lipids, as the remaining SC lipids are in OR form<sup>19</sup>. The OR phase organization seems essential for the skin barrier function. M. Boncheva and F. Damien<sup>17</sup> highlighted a correlation between transepidermal water loss (TEWL) and the presence of the OR phase. However, D. Groen and J. Bouwstra<sup>12</sup> did not come to the same conclusion when studying another parameter: the benzoic acid permeability. In their case, the lamellar structure and the presence of LPP seemed important for the skin barrier function.

Lipid cement is thus a more or less compact barrier to water loss<sup>15</sup>, whereas other structures enable water retention:

- the corneal envelope and mature corneodesmosomes create tortuosities along the water diffusion route ;
- natural moisturizing factors (NMF), i.e. hygroscopic molecules have been widely discussed in the literature<sup>16-19</sup> ;
- aquaporins<sup>20,21</sup> ;
- and hydrolipidic film through its occlusion action.

### Dry and pathological skins: when the lipid matrix is affected

An epidemiological study on 4 508 people of over 15 years old, from eight different European countries (France, Italy, Greece, Portugal, Germany, Switzerland, Belgium and Spain), revealed that 37% of the people interviewed, including a majority of women (59.5%), had dry skin<sup>22</sup>. Skin is considered dry when the SC water content is under 10%, and below this level the skin



**Figure 2. Microscopie Cryo-TEM. Liposomes obtenus à partir des lipides de stratum corneum humain.**

**Cryo-TEM micrography. Liposomes obtained from human stratum corneum (Schmidtgen MC et al., 1998).**

lipides de 50 à 25 % pour une peau sèche est observée, touchant essentiellement les céramides (CerEOS à base sphingosine [S] et glycosphingolipides) dans les couches supérieures du SC. Cette diminution entraîne une modification de l'organisation des lipides : augmentation de SPP au détriment de LPP et augmentation de la phase hexagonale provoquant une augmentation de la perméabilité.

La composition en acide gras est essentielle pour le maintien de l'organisation structurale. Ainsi, les acides gras à longues chaînes (C22-C26), de par leur organisation en phase OR, présentent une compacité supérieure à celle des acides gras à courte chaîne qui augmentent la perméabilité<sup>(20)</sup>.

De même, un contenu riche en acide linoléique conduit à une organisation lamellaire LPP, tandis que les acides oléique ou stéarique entraînent une augmentation de la phase SPP<sup>(20)</sup>. Ainsi, il a été montré qu'un déficit alimentaire en acide gras essentiel (acide linoléique ou linoléique) peut entraîner une ichtyose<sup>(21)</sup>.

Une diminution des céramides contenant de la phytosphingosine a été montrée dans des cas de dermatites atopiques et de psoriasis, en relation avec une sécheresse cutanée (évaluée par une augmentation de la PIE)<sup>(22,24)</sup>.

Les lipides cutanés et leur organisation jouant un rôle déterminant pour l'intégrité de la fonction barrière de la peau, de nombreuses techniques d'exploration de cette matrice lipidique ont vu et voient continuellement le jour.

## Les nouvelles techniques d'explorations

Pour l'évaluation de l'hydratation, de nombreuses méthodes existent :

- les méthodes thermiques comme la calorimétrie différentielle à balayage, qui fournit des données thermodynamiques permettant d'identifier les transitions de phase ;
- les méthodes mécaniques s'intéressant à la fermeté et la souplesse de la peau (Torquemeter®, Cutometer®) ;
- les méthodes électriques avec la mesure de la capacitance pour évaluer la sécheresse de la peau<sup>(23)</sup> (figure 1) ;



**Figure 3. Peau en tomographie par cohérence optique. Skin by optical coherence tomography.**

becomes scaly, with a loss of radiance and flexibility<sup>(20)</sup>. However, the dermis and hypodermis water contents are unchanged<sup>(20)</sup>.

Many lipid matrix modifications occur in dry skin<sup>(22-24)</sup>. A 50–25% decrease in the dry skin lipid content has been observed, mainly affecting ceramides (sphingosine [S] and glycosphingolipid based CerEOS<sup>(25)</sup>) in the upper SC layers. This decrease modifies the lipid organization—an increase in SPP to the detriment of LPP and an increase in the hexagonal phase, thus triggering an increase in permeability.

The fatty acid composition is essential for maintaining the structural organization. Long-chain fatty acids (C22-C26), due to their OR phase organization, are more compact than short chain fatty acids which increase the skin permeability<sup>(20)</sup>.

Similarly, a high linoleic acid content leads to a lamellar LPP organization, whereas oleic or stearic acids prompt an increase in the SPP phase<sup>(20)</sup>. It has been shown that a dietary essential fatty acid deficit (linolenic or linoleic acid) can cause ichthyosis<sup>(21)</sup>.

A decrease in CER containing phytosphingosin has been demonstrated in cases of atopic dermatitis and psoriasis, in relation to skin dryness (evaluated by an increase in TEWL)<sup>(22,24)</sup>.

Skin lipids and their organization have a key role in the integrity of the skin barrier function, so many techniques for assessing this lipid matrix have been and are continuing to be developed.

## New assessment techniques: advantages and new discoveries

Many methods are available for assessing skin hydration:

- thermal methods such as differential scanning calorimetry, which generates thermodynamic data to detect phase transitions;
- mechanical methods focus on skin firmness and flexibility (Torquemeter®, Cutometer®);
- electrical methods, with capacitance measurements to assess skin dryness<sup>(23)</sup>;

## Focus : peau sèche

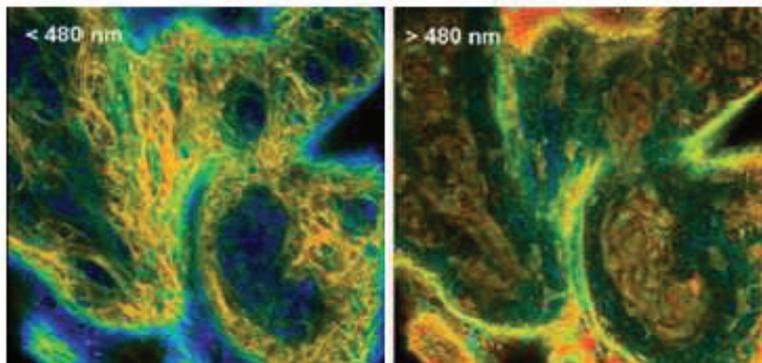


Figure 4. Microscopie biphotonique.  
Peau de porc.  
Two-photon microscopy. Pig skin.

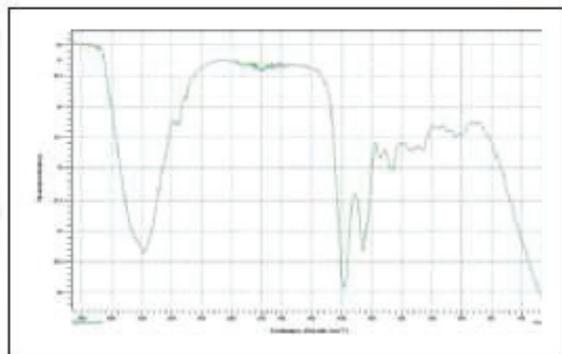


Figure 5. Spectromètre infrarouge avec dispositif de réflexion totale atténuée (ATR) et explant de peau de porc (A).  
Spectre ATR-FTIR transformé de Fourier.  
Infrared spectrometer with attenuated total reflectance (ATR) and pig side skin explant. ATR-FTIR spectrum Fourier transformed.

– et les méthodes photothermiques ou photoacoustiques (radiométrie impulsionnelle, spectroscopie photoacoustique).

La mesure de la PIE, qui augmente en cas d'altération de la barrière, permet d'évaluer l'irritation cutanée, de faire un suivi médical des différents types d'inflammation et de pathologies cutanées. Il est probable que l'augmentation de la diffusion de l'eau reflète une modification de la structure orthorhombique de certains lipides de la matrice<sup>(28)</sup>.

Depuis les 25 dernières années, une nouvelle tendance se détache : le couplage entre imagerie et spectroscopie.

Concernant les techniques d'imagerie, de nouvelles méthodes sont apparues, toutes ayant en commun une meilleure performance en termes de résolution d'image ou de profondeur d'exploration, et une dénaturation minimum de la peau. La spectrométrie de masse par électrospray-ionisation (ESI-MS) couplée à l'observation directe par microscopie électronique de cryo-transmission (cryo-TEM) peut être utilisée pour l'étude des céramides intactes à longues chaînes (figure 2). Cette technique repose sur la vitrification du tissu, contrairement à la microscopie électronique classique, qui nécessite une déshydratation complète de l'échantillon. La tomographie par cohérence optique permet des observations de structure de la peau proches de celles obtenues par biopsie, sans être invasive ou destructive, voire le diagnostic de maladies cutanées<sup>(29)</sup> (figure 3).

La microscopie biphotonique, grâce à des marqueurs fluorescents, permet quant à elle des observations très fines de la structure de la peau (répartition des différentes cellules, structure

– and photothermal and photoacoustic methods (impulse radiometry, photoacoustic spectroscopy).

TEWL measurements, which increase when the skin barrier is altered, enables assessment of skin irritation, and medical follow-up of the different types of inflammation and skin diseases. It is likely that an increase in water diffusion reflects a modification in the orthorhombic structure of certain matrix lipids<sup>(28)</sup>. Over the last 25 years, a new trend in analysis techniques has developed involving a combination of imagery and spectroscopy. New imaging techniques have also been developed that all perform better with respect to image resolution or exploration depth, with minimum skin denaturation. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) combined with cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) can be used to study intact long-chain ceramides (figure 2). This technique is based on tissue vitrification, contrary to conventional electron microscopy, which requires complete dehydration of the test specimen. Optical coherence tomography is a noninvasive/non-destructive technique that enables observations as good as those obtained via biopsy concerning the skin structure and even skin disease diagnosis<sup>(29)</sup> (figure 3).

Two-photon microscopy using fluorescent markers generates very finely detailed images of the skin structure (distribution of different cells, polygonal structure of corneocytes, nucleus size). This method is invasive and currently only used for imaging animals<sup>(30-32)</sup> (figure 4).

X-ray diffraction provides access to the lipid lamellar organiza-

polygonale des cornéocytes, taille des noyaux). Cette méthode reste invasive et est à l'heure actuelle réalisée uniquement chez l'animal<sup>(43,44)</sup> (figure 4).

La diffraction des rayons X donne accès à l'organisation lamellaire des lipides (LPP et SPP) et leur arrangement latéral (OR, HEX ou LIQ)<sup>(45)</sup>.

La spectroscopie infrarouge (IR) est basée sur la vibration de liaison des molécules lorsque l'échantillon est traversé par un faisceau IR (figure 5). Grâce à cette technique, J. Moore a montré l'importance des liaisons hydrogènes intermoléculaires dans les régions polaires des CER et des AGL pour la cohésion et l'intégrité de la barrière<sup>(46)</sup>. Elle permet d'avoir également des informations sur l'ordre de conformation des chaînes lipidiques au niveau intramolécule (fluidité), ainsi que sur leur agencement latéral au niveau intermolécule et au niveau des parties polaires.

Enfin, la spectroscopie Raman couplée à la microscopie confocale permet une analyse non destructive de la peau. Elle donne des informations sur la composition biochimique de la peau (protéines, eau, acides gras...), elle permet l'étude des propriétés de la barrière cutanée, des défauts structuraux de la kératine et des protéines et autres modifications liées à des pathologies, comme par exemple le contenu en eau<sup>(45,46)</sup>. Il est ainsi possible de contrôler l'augmentation graduelle de la concentration en eau avec la profondeur du SC<sup>(47)</sup>. L'organisation des chaînes lipidiques peut également être déterminée.

## Conclusion

L'hydratation cutanée est un phénomène complexe et la connaissance a beaucoup avancé sur l'étude des protéines du stratum corneum, telles que les aquaporines, les enzymes de desquamation ou celles élaborant l'enveloppe cornée, les protéines structurales (jonctions serrées), la filaggrine et autres facteurs naturels d'hydratation. Les nouvelles technologies d'investigation ont néanmoins permis de jeter un nouvel éclairage sur le rôle primordial des lipides intercornéocytaires dans le maintien de l'hydratation de la peau, et font de cette classe de molécules une des cibles importantes à considérer pour assurer une meilleure prise en charge de la peau sèche.

## Références

1. Elias PM. *J Invest Dermatol* 1983 ; 80 : 44e-9e.
2. Keastner D et al. *Skin Pharmacol Physiol* 2008 ; 21(2) : 58-74.
3. Fordlind B. *Acta Derm Venereol* 1994 ; 74(1) : 1-6.
4. Norlén L. *J Invest Dermatol* 2001 ; 117(4) : 830-6.
5. Jungstedt JM et al. *Contact Dermatitis* 2008 ; 58(5) : 255-62.
6. Bouwstra JA et al. *Acta Derm Venereol Suppl* 2000 ; 208 : 23-30.
7. McIntosh TJ. *Biophys J* 2004 ; 85 : 1675-81.
8. Bouwstra J. *BBA* 2006 ; 1758(12) : 2080-95.
9. Madison KC. *J Invest Dermatol* 2003 ; 121(2) : 231-41.
10. de Jager MW et al. *BBA* 2004 ; 1664(2) : 132-40.
11. Pilgram G et al. *J Invest Dermatol* 2001 ; 117(3) : 710-7.
12. Boncheva M, Damian F. *J Invest Dermatol* 2010 ; 130(2) : 611-4.
13. Groen D et al. *BBA* 2011 ; 1808(6) : 1529-37.
14. Caussin J et al. *BBA* 2008 ; 1778(6) : 1517-24.
15. Norlén L, Al-Amoudi A. *J Invest Dermatol* 2004 ; 123(4) : 715-32.
16. Santilanés A et al. *J Cell Sci* 2009 ; 122 : 1285-94.
17. Rawlings AV, Harding CR. *Dermatologic Therapy* 2004 ; 17(suppl 1) : 43-8.
18. Sakai S et al. *J Invest Dermatol* 2000 ; 114(6) : 1184-7.
19. Rawlings AV, Matts PJ. *J Invest Dermatol* 2005 ; 124(6) : 1099-110.
20. Boury-Jamot M et al. *BBA* 2006 ; 1758(9) : 1034-42.
21. Hara-Chikuma M, Verkman AS. *J Invest Dermatol* 2008 ; 128 : 2145-51.
22. Taitz C. *J Am Acad Dermatol* 2008 ; 59(1) : 23-34.
23. Fluhr JW, Darlenski R, Striber C. *Br J Dermatol* 2008 ; 159(1) : 23-34.
24. Barco D, Giménez-Arnau A. *Actas Dermosifiligr* 2008 ; 99(9) : 671-82.
25. Marko R. *J Nutr* 2004 ; 134(8 suppl) : 2017S-2021S.
26. Rawlings AV, Harding CR. *Dermatol Ther* 2004 ; 17(suppl 1) : 43-8.
27. Ishikawa J et al. *J Invest Dermatol* 2010 ; 130(10) : 2511-4.
28. Papaz A. *Dermato-Endocrinology* 2009 ; 1(1) : 72-6.
29. de Guzman Strong C et al. *J Cell Biol* 2006 ; 175(4) : 661-70.
30. Groen D et al. *BBA* 2011 ; 1808(6) : 1529-37.
31. Bonnard C. Étude fonctionnelle de LEKTI et de sa nouvelle cible, l'élastase 2 pancréatique. Thèse de doctorat, Toulouse 2007.
32. Kobayashi H, Tagami H. *Int J Cosmet Sci* 2004 ; 26(2) : 91-101.
33. Hacham J-P et al. *J Invest Dermatol* 2010 ; 130(2) : 500-10.
34. Buraczowska I, Lodiński M. *Pharmacology* 2005 ; 73(1) : 1-7.
35. Rawlings AV. *Int J Cosmet Sci* 2003 ; 25(1-2) : 63-95.
36. Mizutani Y et al. *Biochimie* 2009 ; 91(16) : 784-90.
37. Tagami H. *Int J Cosmet Sci* 2008 ; 30(6) : 413-34.
38. Agache P. *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*. Ed. Médicales Internationales 2000.
39. Conseil national de recherches Canada. Tomographie par cohérence optique. Conseil national de recherches Canada. [En ligne] 16 février 2010. [Citation : 6 novembre 2010]. <http://www.nrc-mrc.gc.ca/fr/br/dermatologie/cohomo/>.
40. Tsai H et al. *J Dermatol Sci* 2009 ; 56(1) : 1-8.
41. Bender J et al. *J Control Release* 2008 ; 129(3) : 163-9.
42. Caspers DC et al. *Control Release* 2008 ; 132(1) : 13-20.
43. Bouwstra JA, Ponec M. *BBA* 2006 ; 1758(12) : 2080-95.
44. Moore DJ, Rerek ME. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockholm)* 2000 ; 208 : 16-22.
45. Caspers P, Lucassen GW, Puppels GJ. *Biophys J* 2003 ; 85 : 572-80.
46. Caspers P et al. *J Raman Spectrosc* 2000 ; 31 : 813-8.
47. Crowther JM et al. *Br J Dermatol* 2008 ; 159(3) : 567-77.

# REFERENCES

- Abrams, Kenneth, Jeff D. Harvell, David Shriner, Philip Wertz, Hilda Maibach, Howard I. Maibach, and S. J. Rehfeld. 1993. "Effect of Organic Solvents on in Vitro Human Skin Water Barrier Function." *Journal of Investigative Dermatology* 101 (4): 609–13.
- Agner, Tove. 1991. "Basal Transepidermal Water Loss, Skin Thickness, Skin Blood Flow and Skin Colour in Relation to Sodium-Lauryl-Sulphate- Induced Irritation in Normal Skin." *Contact Dermatitis* 25 (2): 108–14.
- Akira, Shizuo, Tetsuya Taga, and Tadimitsu Kishimoto. 1993. "Interleukin-6 in Biology and Medicine." In *Advances in Immunology*, edited by Frank J. Dixon, 54:1–78. Academic Press.
- Akiyama, M., Y. Sugiyama-Nakagiri, K. Sakai, J.R. McMillan, M. Goto, K. Arita, Y. Tsuji-Abe, N. Tabata, K. Matsuoka, and R. Sasaki. 2005. "Mutations in Lipid Transporter ABCA12 in Harlequin Ichthyosis and Functional Recovery by Corrective Gene Transfer." *Journal of Clinical Investigation* 115 (7): 1777–84.
- Al-Amoudi, Ashraf, Lars P. O. Norlen, and Jacques Dubochet. 2004. "Cryo-Electron Microscopy of Vitreous Sections of Native Biological Cells and Tissues." *Journal of Structural Biology* 148 (1): 131–35.
- Alépée, Nathalie, Carine Tornier, Cécile Robert, Carole Amsellem, Marie-Hélène Roux, Olivier Doucet, Jean Pachot, Marisa Méloni, and Anne de Brugerolle de Fraissinette. 2010. "A Catch-up Validation Study on Reconstructed Human Epidermis (SkinEthic™ RHE) for Full Replacement of the Draize Skin Irritation Test." *Toxicology in Vitro* 24 (1): 257–66.
- Ananthapadmanabhan, K. P., David J. Moore, Kumar Subramanyan, Manoj Misra, and F Meyer. 2004. "Cleansing without Compromise: The Impact of Cleansers on the Skin Barrier and the Technology of Mild Cleansing." *Dermatologic Therapy* 17 (February): 16–25.
- Ananthapadmanabhan, K.P., S. Mukherjee, and P. Chandar. 2013. "Stratum Corneum Fatty Acids: Their Critical Role in Preserving Barrier Integrity during Cleansing." *International Journal of Cosmetic Science* 35 (4): 337–45.
- Ananthapadmanabhan, K. P., K. K. Yu, C. L. Meyers, and M. P. Aronson. 1996. "Binding of Surfactants to Stratum Corneum." In *J. Soc. Cosmet. Chem*, 47:185–200. Society of Cosmetic Chemists.
- Antranik. 2011. "Detailed Features of Epithelia." *Antranik.org*.
- Apel-Paz, Meirav, Gustavo F. Doncel, and T. Kyle Vanderlick. 2003. "Membrane Perturbation by Surfactant Candidates for STD Prevention." *Langmuir* 19 (3): 591–97.
- Arechabala, B., C. Coiffard, P. Rivalland, L. J. M. Coiffard, and Y. De Roeck-Holtzhauer. 1999. "Comparison of Cytotoxicity of Various Surfactants Tested on Normal Human Fibroblast Cultures Using the Neutral Red Test, MTT Assay and LDH Release." *Journal of Applied Toxicology* 19 (3): 163–65.
- Ashton, P, J Hadgraft, and Ka Walters. 1985. "Effects of Surfactants in Percutaneous Absorption." *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 61 (8): 228–35.
- Aungst, Bruce J., Nancy J. Rogers, and Eli Shefter. 1986. "Enhancement of Naloxone Penetration through Human Skin in Vitro Using Fatty Acids, Fatty Alcohols, Surfactants, Sulfoxides and Amides." *International Journal of Pharmaceutics* 33 (1–3): 225–34.
- Ayala-Bravo, Hilda A., David Quintanar-Guerrero, Aarti Naik, Yogeshvar N. Kalia, José M. Cornejo-Bravo, and Adriana Ganem-Quintanar. 2003. "Effects of Sucrose Oleate and Sucrose Laureate on in Vivo Human Stratum Corneum Permeability." *Pharmaceutical Research* 20 (8): 1267–73.

- B**abita, Kumar, Vinod Kumar, Vikas Rana, Subheet Jain, and Ashok K. Tiwary. 2006. "Thermotropic and Spectroscopic Behavior of Skin: Relationship with Percutaneous Permeation Enhancement." *Current Drug Delivery* 3 (1): 95–113.
- Baggiolini, Marco, Pius Loetscher, and Bernhard Moser. 1995. "Interleukin-8 and the Chemokine Family." *International Journal of Immunopharmacology*, Sixth International Conference of Immunopharmacology, 17 (2): 103–8.
- Bárány, Ebba, Magnus Lindberg, and Marie Lodén. 2000. "Unexpected Skin Barrier Influence from Nonionic Emulsifiers." *International Journal of Pharmaceutics* 195 (1–2): 189–95.
- Barratt, M. D. 1995. "Quantitative Structure-Activity Relationships for Skin Permeability." *Toxicology in Vitro* 9 (1): 27–37.
- Basketter, D. A., M. Chamberlain, H. A. Griffiths, M. Rowson, E. Whittle, and M. York. 1997. "The Classification of Skin Irritants by Human Patch Test." *Food and Chemical Toxicology* 35 (8): 845–52.
- Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I., and Willis, C. M. 1999. Toxicology of contact dermatitis. Allergy, irritancy and urticaria, Vol 1, John Wiley & Sons edn, Nutrition and Chemical Toxicity.
- Bauer, Andrea, Jochen Schmitt, Cathy Bennett, Pieter-Jan Coenraads, Peter Elsner, John English, and Hywel C Williams. 1996. "Interventions for Preventing Occupational Irritant Hand Dermatitis." In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd.
- . 2010. "Interventions for Preventing Occupational Irritant Hand Dermatitis." In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Belsito, Donald V. 2005. "Occupational Contact Dermatitis: Etiology, Prevalence, and Resultant Impairment/disability." *Journal of the American Academy of Dermatology* 53 (2): 303–13.
- Bender, Johanna, Carl Simonsson, Maria Smedh, Sven Engström, and Marica B. Ericson. 2008. "Lipid Cubic Phases in Topical Drug Delivery: Visualization of Skin Distribution Using Two-Photon Microscopy." *Journal of Controlled Release* 129 (3): 163–69.
- Berardesca, E., and European Group for Efficacy Measurements on Cosmetics and Other Topical Products (EEMCO). 1997. "EEMCO Guidance for the Assessment of Stratum Corneum Hydration: Electrical Methods." *Skin Research and Technology* 3 (2): 126–32.
- Berardesca, E., D. Fideli, P. Gabba, M. Cespa, G. Raggiosi, and H. I. Maibach. 1990. "Ranking of Surfactant Skin Irritancy in Vivo in Man Using the Plastic Occlusion Stress Test (POST)." *Contact Dermatitis* 23 (1): 1–5.
- Berardesca, E., and H.i. Maibach. 1990. "Monitoring the Water-Holding Capacity in Visually Non-Irritated Skin by Plastic Occlusion Stress Test (POST)." *Clinical and Experimental Dermatology* 15 (2): 107–10.
- Berardesca, Enzo, and Giovanni Borroni. 1995. "Instrumental Evaluation of Cutaneous Hydration." *Clinics in Dermatology, Bioengineering of the Skin*, 13 (4): 323–27.
- Berg, D. J., M. W. Leach, R. Kühn, K. Rajewsky, W. Müller, N. J. Davidson, and D. Rennick. 1995. "Interleukin 10 but Not Interleukin 4 Is a Natural Suppressant of Cutaneous Inflammatory Responses." *The Journal of Experimental Medicine* 182 (1): 99–108.
- Berridge, M. V., and A. S. Tan. 1993. "Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303 (2): 474–82.
- Berthaud, Fabienne, and Mila Boncheva. 2011. "Correlation between the Properties of the Lipid Matrix and the Degrees of Integrity and Cohesion in Healthy Human Stratum Corneum." *Experimental Dermatology* 20 (3): 255–62.

- Beyere, L., S. Yarasi, and G. R. Loppnow. 2003. "Solvent Effects on Sunscreen Active Ingredients Using Raman Spectroscopy." *Journal of Raman Spectroscopy* 34 (10): 743–50.
- Bialik, W., K. A. Walters, K. R. Brain, and J. Hadgraft. 1993. "Some Factors Affecting the in Vitro Penetration of Ibuprofen through Human Skin." *International Journal of Pharmaceutics* 92 (1–3): 219–23.
- Bigliardi, Paul L., Michael J. Herron, Robert D. Nelson, and Mark V. Dahl. 1994. "Effects of Detergents on Proliferation and Metabolism of Human Keratinocytes." *Experimental Dermatology* 3 (2): 89–94.
- Blake-Haskins, J. C., D. Scala, L. D. Rhein, and C. R. Robbins. 1986. "Predicting Surfactant Irritation from the Swelling Response of a Collagen Film." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 37 (4): 199–210.
- Blank, Irvin H. 1953. "Further Observations on Factors Which Influence the Water Content of the Stratum Corneum1." *Journal of Investigative Dermatology* 21 (4): 259–71.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. "A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (8): 911–17.
- Boelsma, Esther, Chris Anderson, Anneli M. J. Karlsson, and Maria Ponec. 2000. "Microdialysis Technique as a Method to Study the Percutaneous Penetration of Methyl Nicotinate Through Excised Human Skin, Reconstructed Epidermis, and Human Skin In Vivo." *Pharmaceutical Research* 17 (2): 141–47.
- Boelsma, E., H. Tanojo, H. E. Boddé, and M. Ponec. 1996. "Assessment of the Potential Irritancy of Oleic Acid on Human Skin: Evaluation in Vitro and in Vivo." *Toxicology in Vitro* 10 (6): 729–42.
- Boncheva, Mila, Fabienne Damien, and Valéry Normand. 2008. "Molecular Organization of the Lipid Matrix in Intact Stratum Corneum Using ATR-FTIR Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (5): 1344–55.
- Bonté, F. 2011. "Skin Moisturization Mechanisms: New Data." *Annales Pharmaceutiques Françaises* 69 (3): 135–41.
- Bouwstra, J A, F E Dubbelaar, G S Gooris, and M Ponec. 2000. "The Lipid Organisation in the Skin Barrier." *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* 208: 23–30.
- Bouwstra, J. A., G. S. Gooris, W. Bras, and D. T. Downing. 1995. "Lipid Organization in Pig Stratum Corneum." *Journal of Lipid Research* 36 (4): 685–95.
- Bouwstra, J. A., G. S. Gooris, F. E. R. Dubbelaar, and M. Ponec. 2001. "Phase Behavior of Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: Coexistence of Crystalline and Liquid Phases." *Journal of Lipid Research* 42 (11): 1759–70.
- Bouwstra, J. A., G. S. Gooris, F. E. R. Dubbelaar, A. M. Weerheim, A. P. IJzerman, and M. Ponec. 1998. "Role of Ceramide 1 in the Molecular Organization of the Stratum Corneum Lipids." *Journal of Lipid Research* 39 (1): 186–96.
- Bouwstra, Joke A., Gert S. Gooris, Frank E. R. Dubbelaar, and Maja Ponec. 2002. "Phase Behavior of Stratum Corneum Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: The Role of Natural and Synthetic Ceramide 1." *Journal of Investigative Dermatology* 118 (4): 606–17.
- Bouwstra, Joke A., Gert S. Gooris, Joop A. van der Spek, and Wim Bras. 1991. "Structural Investigations of Human Stratum Corneum by Small-Angle X-Ray Scattering." *Journal of Investigative Dermatology* 97 (6): 1005–12.
- Bouwstra, Joke A., H. Wouter W. Groenink, Joop A. Kempenaar, Stefan G. Romeijn, and Maria Ponec. 2007. "Water Distribution and Natural Moisturizer Factor Content in Human Skin Equivalents Are Regulated by Environmental Relative Humidity." *Journal of Investigative Dermatology* 128 (2): 378–88.

- Bouwstra, Joke A., and Maria Ponec. 2006. "The Skin Barrier in Healthy and Diseased State." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Sphingolipids, Apoptosis and Disease, 1758 (12): 2080–95.
- Bowman, JP, Rs Berger, Oh Mills, Am Kligman, and T Stoudemayer. 2002. "The 21-Day Human Cumulative Irritation Test Can Be Reduced to 14 Days without Loss of Sensitivity." *Journal of Cosmetic Science* 54 (5): 443–49.
- Brochard-Wyart, Françoise, Pierre-Gilles de Gennes, and David Quéré. 2004. *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Paris: Belin.
- Buraczewska, I., B. Berne, M. Lindberg, H. Törmä, and M. Lodén. 2007. "Changes in Skin Barrier Function Following Long-Term Treatment with Moisturizers, a Randomized Controlled Trial." *British Journal of Dermatology* 156 (3): 492–98.
- C**ameron, D. G., Casal, H. L., and Mantsch, H. H. 1979. *J. Biochem. Biophys. Methods* 1:21-36
- Camhi, S. L., P. Lee, and A. M. Choi. 1995. "The Oxidative Stress Response." *New Horizons (Baltimore, Md.)* 3 (2): 170–82.
- Candi, Eleonora, Rainer Schmidt, and Gerry Melino. 2005. "The Cornified Envelope: A Model of Cell Death in the Skin." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (4): 328–40.
- Cappel, Markus J., and Jörg Kreuter. 1991. "Effect of Nonionic Surfactants on Transdermal Drug Delivery: II. Poloxamer and Poloxamine Surfactants." *International Journal of Pharmaceutics* 69 (2): 155–67.
- Carrer, Dolores C., Charlotte Vermehren, and Luis A. Bagatolli. 2008. "Pig Skin Structure and Transdermal Delivery of Liposomes: A Two Photon Microscopy Study." *Journal of Controlled Release* 132 (1): 12–20.
- Caspers, Peter J., Gerald W. Lucassen, Elizabeth A. Carter, Hajo A. Bruining, and Gerwin J. Puppels. 2001. "In Vivo Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin: Noninvasive Determination of Molecular Concentration Profiles." *Journal of Investigative Dermatology* 116 (3): 434–42.
- Caspers, Peter J., Adrian C. Williams, Elizabeth A. Carter, Howell G. M. Edwards, Brian W. Barry, Hajo A. Bruining, and Gerwin J. Puppels. 2002. "Monitoring the Penetration Enhancer Dimethyl Sulfoxide in Human Stratum Corneum in Vivo by Confocal Raman Spectroscopy." *Pharmaceutical Research* 19 (10): 1577–80.
- Caspers, P. J., G. W. Lucassen, H. A. Bruining, and G. J. Puppels. 2000. "Automated Depth-Scanning Confocal Raman Microspectrometer for Rapid in Vivo Determination of Water Concentration Profiles in Human Skin." *Journal of Raman Spectroscopy* 31 (8-9): 813–18.
- Caussin, Julia, Gert S. Gooris, and Joke A. Bouwstra. 2008. "FTIR Studies Show Lipophilic Moisturizers to Interact with Stratum Corneum Lipids, Rendering the More Densely Packed." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (6): 1517–24.
- Caussin, Julia, Gert S. Gooris, Michelle Janssens, and Joke A. Bouwstra. 2008. "Lipid Organization in Human and Porcine Stratum Corneum Differs Widely, While Lipid Mixtures with Porcine Ceramides Model Human Stratum Corneum Lipid Organization Very Closely." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (6): 1472–82.
- Cázares-Delgado, J., A. Naik, Y. N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, and A. Ganem-Quintanar. 2005. "Skin Permeation Enhancement by Sucrose Esters: A pH-Dependent Phenomenon." *International Journal of Pharmaceutics* 297 (1–2): 204–12.
- Chamlin, Sarah L., Jack Kao, Ilona J. Frieden, Mary Y. Sheu, Ashley J. Fowler, Joachim W. Fluhr, Mary L. Williams, and Peter M. Elias. 2002. "Ceramide-Dominant Barrier Repair Lipids Alleviate Childhood Atopic Dermatitis: Changes in Barrier Function Provide a Sensitive Indicator of Disease Activity." *Journal of the American Academy of Dermatology* 47 (2): 198–208.

- Chapman, D., Gomez-Fernandez, J. C., Goni, F. M., and Barnard, M. 1980. J. Biochem. Biophys. Methods 2:315-323.
- Chiba, K., T. Sone, K. Kawakami, and M. Onoue. 1999. "Skin Roughness and Wrinkle Formation Induced by Repeated Application of Squalenemonohydroperoxide to the Hairless Mouse." *Experimental Dermatology* 8 (6): 471–79.
- Chilcott, Robert P., Christopher H. Dalton, Andrew J. Emmanuel, Ceri E. Allen, and Simon T. Bradley. 2002. "Transepidermal Water Loss Does Not Correlate with Skin Barrier Function In Vitro." *Journal of Investigative Dermatology* 118 (5): 871–75.
- Choi, Eung Ho, Min Jung Kim, Byung-Il Yeh, Sung Ku Ahn, and Seung Hun Lee. 2003. "Iontophoresis and Sonophoresis Stimulate Epidermal Cytokine Expression at Energies That Do Not Provoke a Barrier Abnormality: Lamellar Body Secretion and Cytokine Expression Are Linked to Altered Epidermal Calcium Levels." *Journal of Investigative Dermatology* 121 (5): 1138–44.
- Choi, Eung Ho, Mao-Qiang Man, Fusheng Wang, Xinjiang Zhang, Barbara E. Brown, Kenneth R. Feingold, and Peter M. Elias. 2005. "Is Endogenous Glycerol a Determinant of Stratum Corneum Hydration in Humans?" *Journal of General Internal Medicine* 20 (5): 288–93.
- Christie, W. W. 1985. "Rapid Separation and Quantification of Lipid Classes by High Performance Liquid Chromatography and Mass (light-Scattering) Detection." *Journal of Lipid Research* 26 (4): 507–12.
- Chrit, L., C. Hadjur, S. Morel, G. Sockalingum, G. Lebourdon, F. Leroy, and M. Manfait. 2005. "In Vivo Chemical Investigation of Human Skin Using a Confocal Raman Fiber Optic Microprobe." *Journal of Biomedical Optics* 10 (4): 044007–044007 – 11.
- Cook, E. B., J. L. Stahl, L. Lowe, R. Chen, E. Morgan, J. Wilson, R. Varro, A. Chan, F. M. Graziano, and N. P. Barney. 2001. "Simultaneous Measurement of Six Cytokines in a Single Sample of Human Tears Using Microparticle-Based Flow Cytometry: Allergics vs. Non-Allergics." *Journal of Immunological Methods* 254 (1–2): 109–18.
- Coquette, A., N. Berna, A. Vandenbosch, M. Rosdy, B. De Wever, and Y. Poumay. 2003. "Analysis of Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and Interleukin-8 (IL-8) Expression and Release in in Vitro Reconstructed Human Epidermis for the Prediction of in Vivo Skin Irritation And/or Sensitization." *Toxicology in Vitro* 17 (3): 311–21.
- Corazza, M, Mm Lauriola, M Zappaterra, A Bianchi, and A Virgili. 2010. "Surfactants, Skin Cleansing Protagonists." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 24 (1): 1–6.
- Corbe, E., C. Laugel, N. Yagoubi, and A. Baillet. 2007. "Role of Ceramide Structure and Its Microenvironment on the Conformational Order of Model Stratum Corneum Lipids Mixtures: An Approach by FTIR Spectroscopy." *Chemistry and Physics of Lipids* 146 (2): 67–75.
- Cornwell, P. A., B. W. Barry, C. P. Stoddart, and J. A. Bouwstra. 1994. "Wide-Angle X-Ray Diffraction of Human Stratum Corneum: Effects of Hydration and Terpene Enhancer Treatment." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 46 (12): 938–50.
- Corradi, Anna, Adriano Tito Franzi, and Anna Rubartelli. 1995. "Synthesis and Secretion of Interleukin-1 $\alpha$  and Intedeukin-1 Receptor Antagonist during Differentiation of Cultured Keratinocytes." *Experimental Cell Research* 217 (2): 355–62.
- Corsini, E., A. Bruccoleri, M. Marinovich, and C. L. Galli. 1996. "Endogenous Interleukin-1 $\alpha$  Is Associated with Skin Irritation Induced by Tributyltin." *Toxicology and Applied Pharmacology* 138 (2): 268–74.
- Corsini, Emanuela, and Corrado L Galli. 1998. "Cytokines and Irritant Contact Dermatitis." *Toxicology Letters* 102–103 (December): 277–82.
- . 2000. "Epidermal Cytokines in Experimental Contact Dermatitis." *Toxicology* 142 (3): 203–12.

- Cremesti, Aida E., and Anthony S. Fischl. 2000. "Current Methods for the Identification and Quantitation of Ceramides: An Overview." *Lipids* 35 (9): 937–45.
- Crepy, M.N. 2005. "Dermatoses Professionnelles Aux Détergents," Fiche d'allergologie-dermatologie professionnelle, , no. 103: 375–84.
- Crickx, Béatrice. 2005. "Comprendre La Peau." *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 132 (11, Part 2): 3.
- Crowther, J.m., A. Sieg, P. Blenkinsop, C. Marcott, P.j. Matts, J.r. Kaczvinsky, and A.v. Rawlings. 2008. "Measuring the Effects of Topical Moisturizers on Changes in Stratum Corneum Thickness, Water Gradients and Hydration in Vivo." *British Journal of Dermatology* 159 (3): 567–77.
- D**ale, B. A., K. A. Resing, and J. D. Lonsdale-Eccles. 1985. "Filaggrin: A Keratin Filament Associated Proteina." *Annals of the New York Academy of Sciences* 455 (1): 330–42.
- Dale, Beverly A., Richard B. Presland, S. Patrick Lewis, Robert A. Underwood, and Philip Fleckman. 1997. "Transient Expression of Epidermal Filaggrin in Cultured Cells Causes Collapse of Intermediate Filament Networks with Alteration of Cell Shape and Nuclear Integrity." *Journal of Investigative Dermatology* 108 (2): 179–87.
- Damien, Fabienne, and Mila Boncheva. 2010. "The Extent of Orthorhombic Lipid Phases in the Stratum Corneum Determines the Barrier Efficiency of Human Skin in Vivo." *Journal of Investigative Dermatology* 130 (2): 611–14.
- Darlenski, R., S. Sassning, N. Tsankov, and J. W. Fluhr. 2009. "Non-Invasive in Vivo Methods for Investigation of the Skin Barrier Physical Properties." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Special Section: Biological Barriers and Nanomedicine- Advanced Drug Delivery and Predictive non vivo Testing Technologies, 72 (2): 295–303.
- Davies, J.T., Rideal E.K., 1961. "Diffusion through Interfaces". In: Willmer, H. (Ed.), *Interfacial Phenomena*, first ed. Academic Press, New York, pp. 343–450.
- De Jager, Miranda W., Gert S. Gooris, Igor P. Dolbnya, Maria Ponec, and Joke A. Bouwstra. 2004. "Modelling the Stratum Corneum Lipid Organisation with Synthetic Lipid Mixtures: The Importance of Synthetic Ceramide Composition." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1664 (2): 132–40.
- De Jongh, C.M., I. Jakasa, M.M. Verberk, and S. Kezic. 2006. "Variation in Barrier Impairment and Inflammation of Human Skin as Determined by Sodium Lauryl Sulphate Penetration Rate." *British Journal of Dermatology* 154 (4): 651–57.
- Denda, M., J. Hori, J. Koyama, S. Yoshida, R. Nanba, M. Takahashi, I. Horii, and A. Yamamoto. 1992. "Stratum Corneum Sphingolipids and Free Amino Acids in Experimentally-Induced Scaly Skin." *Archives of Dermatological Research* 284 (6): 363–67.
- Denecker, Geertrui, Petra Ovaere, Peter Vandenabeele, and Wim Declercq. 2008. "Caspase-14 Reveals Its Secrets." *The Journal of Cell Biology* 180 (3): 451–58.
- De Paepe, Kristien, Evi Houben, Ralf Adam, Frank Wiesemann, and Vera Rogiers. 2005. "Validation of the VapoMeter, a Closed Unventilated Chamber System to Assess Transepidermal Water Loss vs. the Open Chamber Tewameter®." *Skin Research and Technology* 11 (1): 61–69.
- DiColandrea, Teresa, Tadashi Karashima, Arto Määttä, and Fiona M. Watt. 2000. "Subcellular Distribution of Envoplakin and Periplakin Insights into Their Role as Precursors of the Epidermal Cornified Envelope." *The Journal of Cell Biology* 151 (3): 573–86.
- Diepgen, Thomas L. 2003. "Occupational Skin-Disease Data in Europe." *International Archives of Occupational and Environmental Health* 76 (5): 331–38.
- Dinarello, Charles A. 1998. "Interleukin-1, Interleukin-1 Receptors and Interleukin-1 Receptor Antagonist." *International Reviews of Immunology* 16 (5-6): 457–99.

- Domingo, X., M. Haughton, R. Harrison, B. Phillips, R. Harmer, J.-C. Vaillant, J.-L. Urbain, and J.-L. Didier. 1996. "Les agents de surface anioniques: Les agents de surface." *L'Actualité chimique*, no. 2-3: 54–57.
- Draize, John H., Geoffrey Woodard, and Herbert O. Calvery. 1944. "Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 82 (3): 377–90.
- E**ffendy, Isaak, and Howard I. Maibach. 1995. "Surfactants and Experimental Irritant Contact Dermatitis." *Contact Dermatitis* 33 (4): 217–25. doi:10.1111/j.1600-0536.1995.tb00470.x.
- Elias, Peter M. 1983. "Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation." *Journal of Investigative Dermatology* 80 (1s): 44s – 49s.
- . 1996. "Stratum Corneum Architecture, Metabolic Activity and Interactivity with Subjacent Cell Layers." *Experimental Dermatology* 5 (4): 191–201.
- Elkhyat, A., P. Agache, H. Zahouani, and Ph. Humbert. 2001. "A New Method to Measure in Vivo Human Skin Hydrophobia." *International Journal of Cosmetic Science* 23 (6): 347–52.
- Elsayed, Mustafa M. A., Ossama Y. Abdallah, Viviane F. Naggar, and Nawal M. Khalafallah. 2007. "Lipid Vesicles for Skin Delivery of Drugs: Reviewing Three Decades of Research." *International Journal of Pharmaceutics* 332 (1–2): 1–16.
- Endo, Koji, Noboru Suzuki, Osamu Yoshida, Hirayuki Sato, and Yoshiaki Fujikura. 2007. "The Barrier Component and the Driving Force Component of Transepidermal Water Loss and Their Application to Skin Irritant Tests." *Skin Research and Technology* 13 (4): 425–35.
- F**ailloux, N., M.-H. Baron, N. Abdul-Malak, and E. Perrier. 2004. "Contribution of Encapsulation on the Biodisponibility of Retinol." *International Journal of Cosmetic Science* 26 (2): 71–77.
- Faller, C., and M. Bracher. 2002. "Reconstructed Skin Kits: Reproducibility of Cutaneous Irritancy Testing." *Skin Pharmacology and Physiology* 15 (Suppl. 1): 74–91.
- Fartasch, Manigé. 1997. "Ultrastructure of the Epidermal Barrier after Irritation." *Microscopy Research and Technique* 37 (3): 193–99.
- Faucher, Ja, and Ed Goddard. 1978. "Interaction of Keratinous Substrates with Sodium Lauryl Sulfate .1. Sorption." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 29 (5): 323–37.
- Feingold, Kenneth R. 2007. "Thematic Review Series: Skin Lipids. The Role of Epidermal Lipids in Cutaneous Permeability Barrier Homeostasis." *Journal of Lipid Research* 48 (12): 2531–46.
- Feingold, Kenneth R., Matthias Schmuth, and Peter M. Elias. 2007. "The Regulation of Permeability Barrier Homeostasis." *Journal of Investigative Dermatology* 127 (7): 1574–76.
- Feingold, K. R. 2008. "The Outer Frontier: The Importance of Lipid Metabolism in the Skin." *The Journal of Lipid Research* 50 (Supplement): S417–22.
- Fisk, Helena L., Annette L. West, Caroline E. Childs, Graham C. Burdge, and Philip C. Calder. 2014. "The Use of Gas Chromatography to Analyze Compositional Changes of Fatty Acids in Rat Liver Tissue during Pregnancy." *Journal of Visualized Experiments*, no. 85 (March).
- Fluhr, Joachim W., Kenneth R. Feingold, and Peter M. Elias. 2006. "Transepidermal Water Loss Reflects Permeability Barrier Status: Validation in Human and Rodent in Vivo and Ex Vivo Models." *Experimental Dermatology* 15 (7): 483–92.
- Fluhr, Joachim W., Man Mao-Qiang, Barbara E. Brown, Philip W. Wertz, Debra Crumrine, John P. Sundberg, Kenneth R. Feingold, and Peter M. Elias. 2003. "Glycerol Regulates Stratum Corneum Hydration in Sebaceous Gland Deficient (Asebia) Mice." *Journal of Investigative Dermatology* 120 (5): 728–37.

- Fluhr, J.w., R. Darlenski, and C. Surber. 2008. "Glycerol and the Skin: Holistic Approach to Its Origin and Functions." *British Journal of Dermatology* 159 (1): 23–34.
- Folch, Jordi, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues." *Journal of Biological Chemistry* 226 (1): 497–509.
- Forslind, B. 1994. "A Domain Mosaic Model of the Skin Barrier." *Acta Dermato-Venereologica* 74 (1): 1–6.
- Förster, Matthias, Marie-Alexandrine Bolzinger, Gilles Montagnac, and Stéphanie Briançon. 2011. "Confocal Raman Microspectroscopy of the Skin." *European Journal of Dermatology: EJD* 21 (6): 851–63.
- Franz, Thomas J. 1975. "Percutaneous Absorption. on the Relevance of in Vitro Data." *Journal of Investigative Dermatology* 64 (3): 190–95.
- Friberg, Stig E., Lisa Goldsmith, Hamdan Suhaimi, and Linda D. Rhein. 1987. "Surfactants and the Stratum Corneum Lipids." *Colloids and Surfaces, Symposium for the Division of Colloid and Surface Chemistry, American Chemical Society, National Meeting*, 30 (1): 1–12.
- Froebe, C.L., F.A. Simion, L.D. Rhein, R.H. Cagan, and A. Kligman. 1990. "Stratum Corneum Lipid Removal by Surfactants: Relation to in Vivo Irritation." *Dermatology* 181 (4): 277–83.
- Frosch, Peter J., and Albert M. Kligman. 1976. "The Chamber-Scarification Test for Irritancy \*." *Contact Dermatitis* 2 (6): 314–24.
- Frosch, P. J., and A. M. Kligman. 1979. "The Soap Chamber Test. A New Method for Assessing the Irritancy of Soaps." *Journal of the American Academy of Dermatology* 1 (1): 35–41.
- Fruijtjer-Pölloth, Claudia. 2005. "Safety Assessment on Polyethylene Glycols (PEGs) and Their Derivatives as Used in Cosmetic Products." *Toxicology* 214 (1–2): 1–38.
- Fulmer, Andrew W., and Gregory J. Kramer. 1986. "Stratum Corneum Lipid Abnormalities in Surfactant-Induced Dry Scaly Skin." *Journal of Investigative Dermatology* 86 (5): 598–602.
- G**abard, Bernard, Eric Chatelain, Elsbeth Bieli, and Stephan Haas. 2001. "Surfactant Irritation: In Vitro Corneometry and in Vivo Bioengineering." *Skin Research and Technology* 7 (1): 49–55.
- Gaber, Bruce P., and Warner L. Peticolas. 1977. "On the Quantitative Interpretation of Biomembrane Structure by Raman Spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 465 (2): 260–74.
- Ganem-Quintanar, A, D Quintanar-Guerrero, F Falson-Rieg, and P Buri. 1998. "Ex Vivo Oral Mucosal Permeation of Lidocaine Hydrochloride with Sucrose Fatty Acid Esters as Absorption Enhancers." *International Journal of Pharmaceutics* 173 (1–2): 203–10.
- Garson, Jean-Claude, Jean Doucet, Jean-Luc Lévêque, and Georges Tsoucaris. 1991. "Oriented Structure in Human Stratum Corneum Revealed by X-Ray Diffraction." *Journal of Investigative Dermatology* 96 (1): 43–49.
- Gatto, H., J. Viac, M. Charveron, and D. Schmitt. 1992. "Study of Immune-Associated Antigens (IL-1 and ICAM-1) in Normal Human Keratinocytes Treated by Sodium Lauryl Sulphate." *Archives of Dermatological Research* 284 (3): 186–88. doi:10.1007/BF00372715.
- Gaudin, K., P. Chaminade, D. Ferrier, A. Baillet, and A. Tchaplà. 1999. "Analysis of Commercial Ceramides by Non-Aqueous Reversed-Phase Liquid Chromatography with Evaporative Light-Scattering Detection." *Chromatographia* 49 (5-6): 241–48.
- Gay, R., M. Swiderek, D. Nelson, and A. Ernesti. 1992. "The Living Skin Equivalent as a Model in Vitro for Ranking the Toxic Potential of Dermal Irritants." *Toxicology in Vitro* 6 (4): 303–15.

- Giardi, Chloé. 2011. *Synthèse de Surfactifs À Base de Polyoxazoline: Propriétés Physicochimiques et Formulation*. Ecole nationale supérieure de chimie.
- Gibbs, Susan, Helene Vietsch, Ursi Meier, and Maria Ponc. 2002. "Effect of Skin Barrier Competence on SLS and Water-Induced IL-1 $\alpha$  Expression." *Experimental Dermatology* 11 (3): 217–23.
- Ginn, M. E, C. M Noyes, and Eric Jungermann. 1968. "The Contact Angle of Water on Viable Human Skin." *Journal of Colloid and Interface Science* 26 (2): 146–51.
- Girard, Philippe, Anne Beraud, and Anne Sirvent. 2000. "Study of Three Complementary Techniques for Measuring Cutaneous Hydration in Vivo in Human Subjects: NMR Spectroscopy, Transient Thermal Transfer and Corneometry – Application to Xerotic Skin and Cosmetics." *Skin Research and Technology* 6 (4): 205–13.
- Giustizieri, Maria Laura, Cristina Albanesi, Claudia Scarponi, Ornella De Pità, and Giampiero Girolomoni. 2002. "Nitric Oxide Donors Suppress Chemokine Production by Keratinocytes in Vitro and in Vivo." *The American Journal of Pathology* 161 (4): 1409–18.
- Gladkova, N. D., G. A. Petrova, N. K. Nikulin, S. G. Radenska-Lopovok, L. B. Snopova, Yu. P. Chumakov, V. A. Nasonova, et al. 2000. "In Vivo Optical Coherence Tomography Imaging of Human Skin: Norm and Pathology." *Skin Research and Technology* 6 (1): 6–16.
- Golden, Guia M., Donald B. Guzek, Richard R. Harris, James E. McKie, and Russell O. Potts. 1986. "Lipid Thermotropic Transitions in Human Stratum Corneum." *Journal of Investigative Dermatology* 86 (3): 255–59.
- Gooris, G. S., and J. A. Bouwstra. 2007. "Infrared Spectroscopic Study of Stratum Corneum Model Membranes Prepared from Human Ceramides, Cholesterol, and Fatty Acids." *Biophysical Journal* 92 (8): 2785–95.
- Gorcea, Mihaela, Jonathan Hadgraft, David J. Moore, and Majella E. Lane. 2012. "Fourier Transform Infrared Spectroscopy Studies of Lipid Domain Formation in Normal and Ceramide Deficient Stratum Corneum Lipid Models." *International Journal of Pharmaceutics, Advances in Topical Drug Delivery*, 435 (1): 63–68.
- . 2013. "In Vivo Barrier Challenge and Initial Recovery in Human Facial Skin." *Skin Research and Technology* 19 (1): e375–82.
- Gordon, John R., and Stephen J. Galli. 1990. "Mast Cells as a Source of Both Preformed and Immunologically Inducible TNF- $\alpha$ /cachectin." *Nature* 346 (6281): 274–76.
- Graeve, Martin, and Dieter Janssen. 2009. "Improved Separation and Quantification of Neutral and Polar Lipid Classes by HPLC–ELSD Using a Monolithic Silica Phase: Application to Exceptional Marine Lipids." *Journal of Chromatography B* 877 (20–21): 1815–19.
- Greene, Richard S., Donald T. Downing, Peter E. Pochi, and John S. Strauss. 1970. "Anatomical Variation in the Amount and Composition of Human Skin Surface Lipid." *Journal of Investigative Dermatology* 54 (3): 240–47.
- Griffin, W. C., *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1, 311(1949)
- Groen, Daniël, Dana S. Poole, Gert S. Gooris, and Joke A. Bouwstra. 2011. "Is an Orthorhombic Lateral Packing and a Proper Lamellar Organization Important for the Skin Barrier Function?" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1808 (6): 1529–37.
- Grossman, R. M., J. Krueger, D. Yourish, A. Granelli-Piperno, D. P. Murphy, L. T. May, T. S. Kupper, P. B. Sehgal, and A. B. Gottlieb. 1989. "Interleukin 6 Is Expressed in High Levels in Psoriatic Skin and Stimulates Proliferation of Cultured Human Keratinocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (16): 6367–71.
- Grubauer, G., P. M. Elias, and K. R. Feingold. 1989. "Transepidermal Water Loss: The Signal for Recovery of Barrier Structure and Function." *Journal of Lipid Research* 30 (3): 323–33.
- Guilbot, Jérôme. 2006. "Importance des corps gras dans le domaine des tensioactifs." *OCL. Oléagineux, corps gras, lipides* 13 (2-3): 178–86.

- Gu, Ming, James L. Kerwin, Julian D. Watts, and Ruedi Aebersold. 1997. "Ceramide Profiling of Complex Lipid Mixtures by Electrospray Ionization Mass Spectrometry." *Analytical Biochemistry* 244 (2): 347–56.
- Gutiérrez-Praena, Daniel, Silvia Pichardo, Elena Sánchez, Antonio Grilo, Ana Maria Cameán, and Angeles Jos. 2011. "Influence of Carboxylic Acid Functionalization on the Cytotoxic Effects Induced by Single Wall Carbon Nanotubes on Human Endothelial Cells (HUVEC)." *Toxicology in Vitro* 25 (8): 1883–88.
- H**achem, Jean-Pierre, Evi Houben, Debra Crumrine, Mao-Qiang Man, Nanna Schurer, Truus Roelandt, Eung H. Choi, et al. 2006. "Serine Protease Signaling of Epidermal Permeability Barrier Homeostasis." *Journal of Investigative Dermatology* 126 (9): 2074–86.
- Haftek, M. 2003. "Données Structurales et Ultrastructurales Sur Les Lipides Cutanés Humains." *Pathologie Biologie*, Mini-symposium - Colloque sur les Lipides de la peau - Lyon - mars 2002, 51 (5): 264–66.
- Haftek M. 2002; "Stratum corneum". *Ann Dermatol Venereol.* 129 (1): 117-22.
- Halkier-Søsenen, Lars, and Kristian Thesirup-Pedersen. 1993. "The Efficacy of a Moisturizer (Locobase) among Cleaners and Kitchen Assistants during Everyday Exposure to Water and Detergents." *Contact Dermatitis* 29 (5): 266–71.
- Hall-Manning, T. J., G. H. Holland, G. Rennie, P. Revell, J. Hines, M. D. Barratt, and D. A. Basketter. 1998. "Skin Irritation Potential of Mixed Surfactant Systems." *Food and Chemical Toxicology* 36 (3): 233–38.
- Hamanaka, Sumiko, Mariko Hara, Hiroyuki Nishio, Fujio Otsuka, Akemi Suzuki, and Yoshikazu Uchida. 2002. "Human Epidermal Glucosylceramides Are Major Precursors of Stratum Corneum Ceramides." *Journal of Investigative Dermatology* 119 (2): 416–23.
- Hanson, Kerry M., Martin J. Behne, Nicholas P. Barry, Theodora M. Mauro, Enrico Gratton, and Robert M. Clegg. 2002. "Two-Photon Fluorescence Lifetime Imaging of the Skin Stratum Corneum pH Gradient." *Biophysical Journal* 83 (3): 1682–90.
- Harding, C. R., S. Aho, and C. A. Bosko. 2013. "Filaggrin – Revisited." *International Journal of Cosmetic Science* 35 (5): 412–23.
- Harding, C. R., S. Long, J. Richardson, J. Rogers, Z. Zhang, A. Bush, and A. V. Rawlings. 2003. "The Cornified Cell Envelope: An Important Marker of Stratum Corneum Maturation in Healthy and Dry Skin." *International Journal of Cosmetic Science* 25 (4): 157–67.
- Hatta, Ichiro, Noboru Ohta, Katsuaki Inoue, and Naoto Yagi. 2006. "Coexistence of Two Domains in Intercellular Lipid Matrix of Stratum Corneum." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (11): 1830–36.
- Heinrich, U., U. Koop, M.-C. Leneveu-Duchemin, K. Osterrieder, S. Bielfeldt, C. Chkarnat, J. Degwert, et al. 2003. "Multicentre Comparison of Skin Hydration in Terms of Physical-, Physiological- and Product-Dependent Parameters by the Capacitive Method (Corneometer CM 825)." *International Journal of Cosmetic Science* 25 (1-2): 45–53.
- Held, E., R. Skoet, J.d. Johansen, and T. Agner. 2005. "The Hand Eczema Severity Index (HECSI): A Scoring System for Clinical Assessment of Hand Eczema. A Study of Inter- and Intraobserver Reliability." *British Journal of Dermatology* 152 (2): 302–7.
- Hinder, A., C.E.H. Schmelzer, A.V. Rawlings, and R.H.H. Neubert. 2011. "Investigation of the Molecular Structure of the Human Stratum Corneum Ceramides [NP] and [EOS] by Mass Spectrometry." *Skin Pharmacology and Physiology* 24 (3): 127–35.
- Hirofani, Tesuya, Motomu Manabe, Hideoki Ogawa, Kimie Murayama, and Tomoko Sugawara. 1982. "Isolation and Characterization of Horny Cell Membrane." *Archives of Dermatological Research* 274 (1-2): 169–77.
- Hofland, H. E. J., J. A. Bouwstra, M. Ponc, H. E. Boddé, F. Spies, J. Coos Verhoef, and H. E. Junginger. 1991. "Interactions of Non-Ionic Surfactant Vesicles with Cultured

- Keratinocytes and Human Skin in Vitro: A Survey of Toxicological Aspects and Ultrastructural Changes in Stratum Corneum." *Journal of Controlled Release* 16 (1–2): 155–67.
- Holleran, W M, E I Ginns, G K Menon, J U Grundmann, M Fartasch, C E McKinney, P M Elias, and E Sidransky. 1994. "Consequences of Beta-Glucocerebrosidase Deficiency in Epidermis. Ultrastructure and Permeability Barrier Alterations in Gaucher Disease." *Journal of Clinical Investigation* 93 (4): 1756–64.
- Holleran, W. M., Y. Takagi, G. K. Menon, S. M. Jackson, J. M. Lee, K. R. Feingold, and P. M. Elias. 1994. "Permeability Barrier Requirements Regulate Epidermal Beta-Glucocerebrosidase." *Journal of Lipid Research* 35 (5): 905–12.
- Hovnanian, A. 2005. "Harlequin Ichthyosis Unmasked: A Defect of Lipid Transport." *Journal of Clinical Investigation* 115 (7): 1708–10.
- Huber, M., I. Rettler, K. Bernasconi, E. Frenk, S. P. Lavrijsen, M. Ponec, A. Bon, S. Lautenschlager, D. F. Schorderet, and D. Hohl. 1995. "Mutations of Keratinocyte Transglutaminase in Lamellar Ichthyosis." *Science* 267 (5197): 525–28.
- Ikeyama, Kazuyuki, Shigeyoshi Fuziwaru, and Mitsuhiro Denda. 2007. "Topical Application of Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor Accelerates Cutaneous Barrier Recovery and Prevents Epidermal Hyperplasia Induced by Barrier Disruption." *Journal of Investigative Dermatology* 127 (7): 1713–19.
- Imokawa, G. 1997. "Surfactant Mildness." *Surfactant Science Series* 68: 427–71.
- Imokawa, G., S. Akasaki, Y. Minematsu, and M. Kawai. 1989. "Importance of Intercellular Lipids in Water-Retention Properties of the Stratum Corneum: Induction and Recovery Study of Surfactant Dry Skin." *Archives of Dermatological Research* 281 (1): 45–51.
- Imokawa, Genji, Akihito Abe, Kumi Jin, Yuko Higaki, Makoto Kawashima, and Akira Hidano. 1991. "Decreased Level of Ceramides in Stratum Corneum of Atopic Dermatitis: An Etiologic Factor in Atopic Dry Skin?" *Journal of Investigative Dermatology* 96 (4): 523–26.
- Imokawa, Genji, and Michihiro Hattori. 1985. "A Possible Function of Structural Lipids in the Water-Holding Properties of the Stratum Corneum." *Journal of Investigative Dermatology* 84 (4): 282–84.
- Imokawa, Genji, and Yutaka Mishima. 1979. "Cumulative Effect of Surfactants on Cutaneous Horny Layers: Adsorption onto Human Keratin Layers in Vivo." *Contact Dermatitis* 5 (6): 357–66.
- Imokawa, G., K. Sumura, and M. Katsumi. 1975. "Study on Skin Roughness Caused by Surfactants: II. Correlation between Protein Denaturation and Skin Roughness." *Journal of the American Oil Chemists Society* 52 (12): 484–89.
- Israelachvili, Jacob N., D. John Mitchell, and Barry W. Ninham. 1976. "Theory of Self-Assembly of Hydrocarbon Amphiphiles into Micelles and Bilayers." *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72 (0): 1525–68.
- Iwai, H., J. Fukasawa, and T. Suzuki. 1998. "A Liquid Crystal Application in Skin Care Cosmetics." *International Journal of Cosmetic Science* 20 (2): 87–102.
- Iwai, Ichiro, HongMei Han, Lianne den Hollander, Stina Svensson, Lars-Göran Öfverstedt, Jamshed Anwar, Jonathan Brewer, et al. 2012. "The Human Skin Barrier Is Organized as Stacked Bilayers of Fully Extended Ceramides with Cholesterol Molecules Associated with the Ceramide Sphingoid Moiety." *Journal of Investigative Dermatology* 132 (9): 2215–25.
- Iwamori, M., C. Costello, and H. W. Moser. 1979. "Analysis and Quantitation of Free Ceramide Containing Nonhydroxy and 2-Hydroxy Fatty Acids, and Phytosphingosine by High-Performance Liquid Chromatography." *Journal of Lipid Research* 20 (1): 86–96.
- Jackson, S. M., M. L. Williams, K. R. Feingold, and P. M. Elias. 1993. "Pathobiology of the Stratum Corneum." *Western Journal of Medicine* 158 (3): 279.

- James-Smith, Monica A., Brittney Hellner, Nancy Annunziato, and Samir Mitragotri. 2011. "Effect of Surfactant Mixtures on Skin Structure and Barrier Properties." *Annals of Biomedical Engineering* 39 (4): 1215–23.
- Janssens, M., A. A. Mulder, J. van Smeden, G. S. K. Pilgram, R. Wolterbeek, A. P. M. Lavrijsen, R. I. Koning, A. J. Koster, and J. A. Bouwstra. 2013. "Electron Diffraction Study of Lipids in Non-Lesional Stratum Corneum of Atopic Eczema Patients." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1828 (8): 1814–21.
- Jensen, Jens-Michael, Stefan Schütze, Michael Förl, Martin Krönke, and Ehrhardt Proksch. 1999. "Roles for Tumor Necrosis Factor Receptor p55 and Sphingomyelinase in Repairing the Cutaneous Permeability Barrier." *Journal of Clinical Investigation* 104 (12): 1761–70.
- Jonca, Nathalie, Marina Guerrin, Krassimira Hadjiolova, Cécile Caubet, Hélène Gallinaro, Michel Simon, and Guy Serre. 2002. "Corneodesmosin, a Component of Epidermal Corneocyte Desmosomes, Displays Homophilic Adhesive Properties." *Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 5024–29.
- Jones, M. N. 1992. "Surfactant Interactions with Biomembranes and Proteins." *Chemical Society Reviews* 21 (2): 127–36.
- Jonsson, Bo. 1998. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. John Wiley.
- Kaelble, D. H. 1970. "Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids." *The Journal of Adhesion* 2 (2): 66–81.
- Kalinin, Andrey E., Andrey V. Kajava, and Peter M. Steinert. 2002. "Epithelial Barrier Function: Assembly and Structural Features of the Cornified Cell Envelope." *BioEssays* 24 (9): 789–800.
- Kalmanzon, Eliahu, Eliahu Zlotkin, Rivka Cohen, and Yechezkel Barenholz. 1992. "Liposomes as a Model for the Study of the Mechanism of Fish Toxicity of Sodium Dodecyl Sulfate in Sea Water." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1103 (1): 148–56.
- Kaplan, G., G. Walsh, L. S. Guido, P. Meyn, R. A. Burkhardt, R. M. Abalos, J. Barker, P. A. Frindt, T. T. Fajardo, and R. Celona. 1992. "Novel Responses of Human Skin to Intradermal Recombinant Granulocyte/macrophage-Colony-Stimulating Factor: Langerhans Cell Recruitment, Keratinocyte Growth, and Enhanced Wound Healing." *The Journal of Experimental Medicine* 175 (6): 1717–28.
- Kawai, M., and G. Imokawa. 1984. "The Induction of Skin Tightness by Surfactants." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 35 (3): 147–56.
- Kessner, Doreen, Mikhail Kiselev, Silvia Dante, Thomas Hauß, Peter Lersch, Siegfried Wartewig, and Reinhard H. H. Neubert. 2008. "Arrangement of Ceramide [EOS] in a Stratum Corneum Lipid Model Matrix: New Aspects Revealed by Neutron Diffraction Studies." *European Biophysics Journal* 37 (6): 989–99.
- Kikuchi, S., T. Aosaki, K. Bito, S. Naito, and Y. Katayama. 2015. "In Vivo Evaluation of Lateral Lipid Chain Packing in Human Stratum Corneum." *Skin Research and Technology* 21 (1): 76–83.
- Kobiela, Tomasz, Karolina Lelen-Kaminska, Michal Stepulak, Malgorzata Lekka, Magdalena Malejczyk, Jacek Arct, and Slawomir Majewski. 2013. "The Influence of Surfactants and Hydrolyzed Proteins on Keratinocytes Viability and Elasticity." *Skin Research and Technology* 19 (1): e200–208.
- Köck, A., T. Schwarz, R. Kirnbauer, A. Urbanski, P. Perry, J. C. Ansel, and T. A. Luger. 1990. "Human Keratinocytes Are a Source for Tumor Necrosis Factor Alpha: Evidence for Synthesis and Release upon Stimulation with Endotoxin or Ultraviolet Light." *The Journal of Experimental Medicine* 172 (6): 1609–14.
- Korting, Hans C., Thomas Herzinger, Anton Hartinger, Martina Kerscher, Thomas Angerpointner, and Howard I. Maibach. 1994. "Discrimination of the Irritancy Potential of

- Surfactants in Vitro by Two Cytotoxicity Assays Using Normal Human Keratinocytes, HaCaT Cells and 3T3 Mouse Fibroblasts: Correlation with in Vivo Data from a Soap Chamber Assay." *Journal of Dermatological Science* 7 (2): 119–29.
- Kotani, M., Y. Masamoto, and M. Watanabe. 1994. "An Alternative Study of the Skin Irritant Effect of an Homologous Series of Surfactants." *Toxicology in Vitro* 8 (2): 229–33.
- Kp, Wilhelm. 1994. "Effects of Surfactants on Skin Hydration." *Current Problems in Dermatology* 22 (December): 72–79.
- Kragh-Hansen, Ulrich, Marc le Maire, and Jesper V. Møller. 1998. "The Mechanism of Detergent Solubilization of Liposomes and Protein-Containing Membranes." *Biophysical Journal* 75 (6): 2932–46.
- Krasteva, M., J. Kehren, M. T. Ducluzeau, M. Sayag, M. Dupuis, J. Kanitakis, and J. F. Nicolas. 1999. "Contact Dermatitis II. Clinical Aspects and Diagnosis." *European Journal of Dermatology* 9 (2): 144–60.
- Lambers, H., & Pronk, H. 2002. Biophysical methods for stratum corneum characterization. *Cosmetic Science and Technology Series*, 24, 185-226.
- Lane, Majella E. 2013. "Skin Penetration Enhancers." *International Journal of Pharmaceutics* 447 (1–2): 12–21.
- Lansdown, A. B. G., and P. Grasso. 1972. "Physico-Chemical Factors Influencing Epidermal Damage by Surface Active Agents." *British Journal of Dermatology* 86 (4): 361–78.
- Larpent, Chantai. 1995. "Tensioactifs." *Techniques de l'ingénieur. Constantes physico-chimiques K2 (K342): K342.1–K342.13.*
- Larrick, J. W., V. Morhenn, Y. L. Chiang, and T. Shi. 1989. "Activated Langerhans Cells Release Tumor Necrosis Factor." *Journal of Leukocyte Biology* 45 (5): 429–33.
- Larson, Elaine, Raphaëlle Girard, Carmem Lucia Pessoa-Silva, John Boyce, Liam Donaldson, and Didier Pittet. 2006. "Skin Reactions Related to Hand Hygiene and Selection of Hand Hygiene Products." *American Journal of Infection Control* 34 (10): 627–35.
- Laugel, C., N. Yagoubi, and A. Baillet. 2005. "ATR-FTIR Spectroscopy: A Chemometric Approach for Studying the Lipid Organisation of the Stratum Corneum." *Chemistry and Physics of Lipids* 135 (1): 55–68.
- Lee, Cheol Heon, and Howard I. Maibach. 1995. "The Sodium Lauryl Sulfate Model: An Overview." *Contact Dermatitis* 33 (1): 1–7.
- Lee, David C., and Dennis Chapman. 1986. "Infrared Spectroscopic Studies of Biomembranes and Model Membranes." *Bioscience Reports* 6 (3): 235–56.
- Lefur, Agnès, and Jean-Pierre Arnaud. 2004. "Actualité des lipides en cosmétique : Les lipides polaires : actifs et vecteurs cosmétiques." In *OCL. Oléagineux, corps gras, lipides*, 11:436–39. Libbey-Eurotext.
- Le Maire, Marc, Philippe Champeil, and Jesper V Møller. 2000. "Interaction of Membrane Proteins and Lipids with Solubilizing Detergents." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Detergents in Biomembrane Studies, 1508 (1–2): 86–111.
- Leveque, Jean-Luc. 1983. "Physical Methods for Skin Investigation." *International Journal of Dermatology* 22 (6): 368–75.
- Lévêque, J.L., J. de Rigal, D. Saint-Léger, and D. Billy. 1993. "How Does Sodium Lauryl Sulfate Alter the Skin Barrier Function in Man? A Multiparametric Approach." *Skin Pharmacology and Physiology* 6 (2): 111–15.
- Levin, Jackie, and Howard Maibach. 2005. "The Correlation between Transepidermal Water Loss and Percutaneous Absorption: An Overview." *Journal of Controlled Release* 103 (2): 291–99.
- López, A, F Linares, C Cortell, and M Herráez. 2000a. "Comparative Enhancer Effects of Span®20 with Tween®20 and Azone® on the in Vitro Percutaneous Penetration of

- Compounds with Different Lipophilicities." *International Journal of Pharmaceutics* 202 (1–2): 133–40.
- . 2000b. "Comparative Enhancer Effects of Span®20 with Tween®20 and Azone® on the in Vitro Percutaneous Penetration of Compounds with Different Lipophilicities." *International Journal of Pharmaceutics* 202 (1–2): 133–40.
- Lu, Guojin, and David J. Moore. 2012. "Study of Surfactant–skin Interactions by Skin Impedance Measurements." *International Journal of Cosmetic Science* 34 (1): 74–80.
- M**adison, Kathi C. 2003. "Barrier Function of the Skin: 'La Raison d'Être' of the Epidermis." *Journal of Investigative Dermatology* 121 (2): 231–41.
- Madison, Kathi C., Donald C. Swartzendruber, Philip W. Wertz, and Donald T. Downing. 1987. "Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum Corneum." *Journal of Investigative Dermatology* 88 (6): 714–18.
- Malten, K. E. 1981. "Thoughts on Irritant Contact Dermatitis." *Contact Dermatitis* 7 (5): 238–47.
- Man, M.-Q., L. Wood, P. M. Elias, and K. R. Feingold. 1999. "Cutaneous Barrier Repair and Pathophysiology Following Barrier Disruption in IL-1 and TNF Type I Receptor Deficient Mice." *Experimental Dermatology* 8 (4): 261–66.
- Mano, Nariyasu, Yoshiya Oda, Koji Yamada, Naoki Asakawa, and Kouichi Katayama. 1997. "Simultaneous Quantitative Determination Method for Sphingolipid Metabolites by Liquid Chromatography/Ionspray Ionization Tandem Mass Spectrometry." *Analytical Biochemistry* 244 (2): 291–300.
- Mao, G., C. R. Flach, R. Mendelsohn, and R. M. Walters. 2012. "Imaging the Distribution of Sodium Dodecyl Sulfate in Skin by Confocal Raman and Infrared Microspectroscopy." *Pharmaceutical Research* 29 (8): 2189–2201.
- Mao-Qiang, Man, K. R. Feingold, and P. M. Elias. 1993. "Inhibition of Cholesterol and Sphingolipid Synthesis Causes Paradoxical Effects on Permeability Barrier Homeostasis." *Journal of Investigative Dermatology* 101 (2): 185–90.
- Mao-Qiang, Man, Mahendra Jain, Kenneth R. Feingold, and Peter M. Elias. 1996. "Secretory Phospholipase A2 Activity Is Required for Permeability Barrier Homeostasis." *Journal of Investigative Dermatology* 106 (1): 57–63.
- Mao-Qiang, M., K. R. Feingold, M. Jain, and P. M. Elias. 1995. "Extracellular Processing of Phospholipids Is Required for Permeability Barrier Homeostasis." *Journal of Lipid Research* 36 (9): 1925–35.
- Marks, F., G. Fürstenberger, and K. Müller-Decker. 1998. "Arachidonic Acid Metabolism as a Reporter of Skin Irritancy and Target of Cancer Chemoprevention." *Toxicology Letters* 96–97 (August): 111–18.
- Martini, M. C. 2006. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie*. Tec & Doc ; Cachan : Éd. Médicales internationales, 2ème édition, Paris ; Londres ; New York, 448 pp.
- Masukawa, Yoshinori, Hirofumi Narita, Eri Shimizu, Naoki Kondo, Yoshiya Sugai, Tsuyoshi Oba, Rika Homma, et al. 2008. "Characterization of Overall Ceramide Species in Human Stratum Corneum." *Journal of Lipid Research* 49 (7): 1466–76.
- Mathis, A. 1992. Les produits tensioactifs Bulletin de l'Union des Physiciens, 86 (749), pp. 1487–1501
- Matsuki, Masato, Fumiyoshi Yamashita, Akemi Ishida-Yamamoto, Keiko Yamada, Chikako Kinoshita, Shinji Fushiki, Eiichiro Ueda, et al. 1998. "Defective Stratum Corneum and Early Neonatal Death in Mice Lacking the Gene for Transglutaminase 1 (keratinocyte Transglutaminase)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (3): 1044–49.
- Mavon, A, D Redoules, P Humbert, P Agache, and Y Gall. 1998. "Changes in Sebum Levels and Skin Surface Free Energy Components Following Skin Surface Washing." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 10 (5): 243–50.

- Mavon, A., H. Zahouani, D. Redoules, P. Agache, Y. Gall, and Ph. Humbert. 1997. "Sebum and Stratum Corneum Lipids Increase Human Skin Surface Free Energy as Determined from Contact Angle Measurements: A Study on Two Anatomical Sites." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 8 (3): 147–55.
- Maza, A. de la, L. Coderch, O. Lopez, J. Baucells, and J. L. Parra. 1997. "Permeability Changes Caused by Surfactants in Liposomes That Model the Stratum Corneum Lipid Composition." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (1): 1–8.
- McIntosh, Thomas J. 2003. "Organization of Skin Stratum Corneum Extracellular Lamellae: Diffraction Evidence for Asymmetric Distribution of Cholesterol." *Biophysical Journal* 85 (3): 1675–81.
- McNabb, T. J., A. E. Cremesti, P. R. Brown, and A. A. Fischl. 1999. "High-Performance Liquid Chromatography/ Evaporative Light-Scattering Detector Techniques for Neutral, Polar, and Acidic Lipid Classes : A Review of Methods and Detector Models." *Seminars in Food Analysis* 4 (1): 53–70.
- Meguro, S., Y. Arai, Y. Masukawa, K. Uie, and I. Tokimitsu. 2000. "Relationship between Covalently Bound Ceramides and Transepidermal Water Loss (TEWL)." *Archives of Dermatological Research* 292 (9): 463–68.
- Mendelsohn, Richard, Carol R. Flach, and David J. Moore. 2006. "Determination of Molecular Conformation and Permeation in Skin via IR Spectroscopy, Microscopy, and Imaging." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Vibrational Microscopic Imaging: Towards Molecular Pathology*, 1758 (7): 923–33.
- Menon GK, and Elias PM. 1991. "Ultrastructural Localization of Calcium in Psoriatic and Normal Human Epidermis." *Archives of Dermatology* 127 (1): 57–63.
- Merle, C., and A. Baillet-Guffroy. 2009. "Physical and Chemical Perturbations of the Supramolecular Organization of the Stratum Corneum Lipids: In Vitro to Ex Vivo Study." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (5): 1092–98.
- Metze, Dieter, Wolfgang Jurecka, Walter Gebhart, Jolanta Schmidt, Marlene Mainitz, and Gustav Niebauer. 1989. "Immunohistochemical Demonstration of Immunoglobulin A in Human Sebaceous and Sweat Glands." *Journal of Investigative Dermatology* 92 (1): 13–17.
- Misra, Pramila K., Sagarika Panigrahi, Uma Dash, and Asit Baran Mandal. 2010. "Organization of Amphiphiles. Part XI: Physico-Chemical Aspects of Mixed Micellization Involving Normal Conventional Surfactant and a Non-Ionic Gemini Surfactant." *Journal of Colloid and Interface Science* 345 (2): 392–401.
- Mizushima, Junichi, Yoshiaki Kawasaki, Tatsuru Tabohashi, Takeshi Kitano, Kazutami Sakamoto, Makoto Kawashima, Roger Cooke, and Howard I. Maibach. 2000. "Effect of Surfactants on Human Stratum Corneum: Electron Paramagnetic Resonance Study." *International Journal of Pharmaceutics* 197 (1–2): 193–202.
- Mizutani, Yukiko, Susumu Mitsutake, Kiyomi Tsuji, Akio Kihara, and Yasuyuki Igarashi. 2009. "Ceramide Biosynthesis in Keratinocyte and Its Role in Skin Function." *Biochimie, Lipids for the future from agro-resources to human health*, 91 (6): 784–90.
- Mohamadzadeh, Mansour, Markus Miiller, Thomas Hultsch, Alexander Enk, Joachim Saloga, and Jürgen Knop. 1994. "Enhanced Expression of IL-8 in Normal Human Keratinocytes and Human Keratinocyte Cell Line HaCaT in Vitro after Stimulation with Contact Sensitizers., Tolerogens and Irritants." *Experimental Dermatology* 3 (6): 298–303.
- Moore, David J., and R. Mendelsohn. 1999. "Insights into the Molecular Organization of Lipids in the Skin Barrier from Infrared Spectroscopy Studies of Stratum Corneum Lipid Models." *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* 208 (December): 16–22.
- Moore, Peter N., Sudhakar Puvvada, and Daniel Blankschtein. 2003a. "Challenging the Surfactant Monomer Skin Penetration Model: Penetration of Sodium Dodecyl Sulfate Micelles into the Epidermis." *Journal of Cosmetic Science* 54 (1): 29–46.

- . 2003b. “Role of the Surfactant Polar Head Structure in Protein–Surfactant Complexation: Zein Protein Solubilization by SDS and by SDS/C<sub>12</sub>E<sub>n</sub> Surfactant Solutions.” *Langmuir* 19 (4): 1009–16.
- . 2003c. “Role of the Surfactant Polar Head Structure in Protein–Surfactant Complexation: Zein Protein Solubilization by SDS and by SDS/C<sub>12</sub>E<sub>n</sub> Surfactant Solutions.” *Langmuir* 19 (4): 1009–16.
- Moore, Peter N., Anat Shiloach, Sudhakar Puvvada, and Daniel Blankschtein. 2003. “Penetration of Mixed Micelles into the Epidermis: Effect of Mixing Sodium Dodecyl Sulfate with Dodecyl Hexa(ethylene Oxide).” *Journal of Cosmetic Science* 54 (2): 143–59.
- Moser, Bernhard, Marlene Wolf, Alfred Walz, and Pius Loetscher. 2004. “Chemokines: Multiple Levels of Leukocyte Migration Control☆.” *Trends in Immunology* 25 (2): 75–84.
- Mosmann, Tim. 1983. “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63.
- Motta, Stefania, Marcello Monti, Silvia Sesana, Ruggero Caputo, Stephana Carelli, and Riccardo Ghidoni. 1993. “Ceramide Composition of the Psoriatic Scale.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1182 (2): 147–51.
- Mullerdecker, K., G. Furstenberger, and F. Marks. 1994. “Keratinocyte-Derived Proinflammatory Key Mediators and Cell Viability as in Vitro Parameters of Irritancy: A Possible Alternative to the Draize Skin Irritation Test.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 127 (1): 99–108.
- N**ardello-Rataj, V., & Tai, L. H. T. 2006. Formulation des détergents. *Techniques de l'ingénieur J*, 2280, 2008.
- Nemes, Zoltán, Lyuben N. Marekov, Lázló Fésüs, and Peter M. Steinert. 1999. “A Novel Function for Transglutaminase 1: Attachment of Long-Chain  $\Omega$ -Hydroxyceramides to Involucrin by Ester Bond Formation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (15): 8402–7.
- Netzlaff, Frank, Karl-Heinz Kostka, Claus-Michael Lehr, and Ulrich F. Schaefer. 2006. “TEWL Measurements as a Routine Method for Evaluating the Integrity of Epidermis Sheets in Static Franz Type Diffusion Cells in Vitro. Limitations Shown by Transport Data Testing.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63 (1): 44–50.
- Nickoloff, Brian J., and Yathi Naidu. 1994. “Perturbation of Epidermal Barrier Function Correlates with Initiation of Cytokine Cascade in Human Skin.” *Journal of the American Academy of Dermatology* 30 (4): 535–46.
- Nixon, G. A., C. A. Tyson, and W. C. Wertz. 1975. “Interspecies Comparisons of Skin Irritancy.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 31 (3): 481–90.
- Noiret, Nicolas, Thierry Benvegno, and Daniel Plusquellec. 2002. “Tensioactifs À Base de Substances Renouvelables.” *L'Actualité Chimique*, no. 11-12: 70–75.
- Nokhodchi, A., J. Shokri, A. Dashbolaghi, D. Hassan-Zadeh, T. Ghafourian, and M. Barzegar-Jalali. 2003. “The Enhancement Effect of Surfactants on the Penetration of Lorazepam through Rat Skin.” *International Journal of Pharmaceutics* 250 (2): 359–69.
- Norlén, L. 2003. “Skin Barrier Structure, Function and Formation – Learning from Cryo-Electron Microscopy of Vitreous, Fully Hydrated Native Human Epidermis.” *International Journal of Cosmetic Science* 25 (5): 209–26.
- Norlén, Lars. 2001. “Skin Barrier Structure and Function: The Single Gel Phase Model.” *Journal of Investigative Dermatology* 117 (4): 830–36.
- Norlén, L., Ingrid Nicander, Anders Lundsjö, Tomas Cronholm, and Bo Forslind. 1998. “A New HPLC-Based Method for the Quantitative Analysis of Inner Stratum Corneum Lipids with

- Special Reference to the Free Fatty Acid Fraction." *Archives of Dermatological Research* 290 (9): 508–16.
- Nuutinen, Jouni, Esko Alanen, Pekka Autio, Marjo-Riitta Lahtinen, Ilkka Harvima, and Tapani Lahtinen. 2003. "A Closed Unventilated Chamber for the Measurement of Transepidermal Water Loss." *Skin Research and Technology* 9 (2): 85–89.
- O**ECD, 2010, Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, 824 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing
- Oguri, Masashi, Gert S. Gooris, Kotatsu Bito, and Joke A. Bouwstra. 2014. "The Effect of the Chain Length Distribution of Free Fatty Acids on the Mixing Properties of Stratum Corneum Model Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1838 (7): 1851–61.
- Osborne, R., and M. A. Perkins. 1994. "An Approach for Development of Alternative Test Methods Based on Mechanisms of Skin Irritation." *Food and Chemical Toxicology* 32 (2): 133–42.
- Otzen, Daniel. 2011. "Protein–surfactant Interactions: A Tale of Many States." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1814 (5): 562–91.
- Otzen, Daniel E., Pankaj Sehgal, and Peter Westh. 2009. "A-Lactalbumin Is Unfolded by All Classes of Surfactants but by Different Mechanisms." *Journal of Colloid and Interface Science* 329 (2): 273–83.
- Owens, D. K., and R. C. Wendt. 1969. "Estimation of the Surface Free Energy of Polymers." *Journal of Applied Polymer Science* 13 (8): 1741–47.
- Özdemir, G., and Ö. E. Sezgin. 2006. "Keratin–rhamnolipids and Keratin–sodium Dodecyl Sulfate Interactions at the Air/water Interface." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 52 (1): 1–7.
- P**appas, Apostolos. 2009. "Epidermal Surface Lipids." *Dermato-Endocrinology* 1 (2): 72–76. doi:10.4161/derm.1.2.7811.
- Park, E S, S Y Chang, M Hahn, and S C Chi. 2000. "Enhancing Effect of Polyoxyethylene Alkyl Ethers on the Skin Permeation of Ibuprofen." *International Journal of Pharmaceutics* 209 (1-2): 109–19.
- Partearroyo, M. Aránzazu, Helena Ostolaza, Félix M. Goñi, and Emilio Barberá-Guillem. 1990. "Surfactant-Induced Cell Toxicity and Cell Lysis: A Study Using B16 Melanoma Cells." *Biochemical Pharmacology* 40 (6): 1323–28.
- Patil, S. M., P. Singh, and H. I. Maibach. 1994. "Cumulative Irritancy in Man to Sodium Lauryl Sulfate: The Overlap Phenomenon." *International Journal of Pharmaceutics* 110 (2): 147–54.
- Perrenoud, D., D. Gallezot, and G. Van Melle. 2001. "The Efficacy of a Protective Cream in a Real-World Apprentice Hairdresser Environment." *Contact Dermatitis* 45 (3): 134–38.
- Peyrefitte, Gérard, and Jérôme Camponovo. 2008. *Esthétique-cosmétique BTS: Tome 1, Biologie*. Paris: Elsevier Masson.
- Pezron, I., L. Galet, and D. Clause. 1996. "Surface Interaction between a Protein Monolayer and Surfactants and Its Correlation with Skin Irritation by Surfactants." *Journal of Colloid and Interface Science* 180 (1): 285–89.
- Phillips II, Llewellyn, Marshall Steinberg, Howard I. Maibach, and William A. Akers. 1972. "A Comparison of Rabbit and Human Skin Response to Certain Irritants." *Toxicology and Applied Pharmacology* 21 (3): 369–82.
- Piccicuto, Salvator, Christophe Blecker, Jean-Christophe Brohee, Aimée Mbampara, Georges Lognay, Claude Deroanne, Michel Paquot, and Michel Marlier. 2001. "Les esters de sucres: voies de synthèse et potentialités d'utilisation." *Biotechnologie, agronomie, société et environnement* 5 (4): 209–19.

- Piérard, G.E., V. Goffin, and C. Piérard-Franchimont. 1994. "Corneosurfametry: A Predictive Assessment of the Interaction of Personal-Care Cleansing Products with Human Stratum Corneum." *Dermatology* 189 (2): 152–56.
- Pierard, Ge, V. Goffin, and C. Pierardfranchimont. 1994. "Corneosurfametry - a Predictive Assessment of the Interaction of Personal-Cave Cleansing Products with Human Stratum-Corneum." *Dermatology* 189 (2): 152–56.
- Pilgram, Gonneke S. K., A. Marjolein Engelsma- van Pelt, Joke A. Bouwstra, and Henk K. Koerten. 1999. "Electron Diffraction Provides New Information on Human Stratum Corneum Lipid Organization Studied in Relation to Depth and Temperature." *Journal of Investigative Dermatology* 113 (3): 403–9.
- Plasencia, I., L. Norlén, and L. A. Bagatolli. 2007. "Direct Visualization of Lipid Domains in Human Skin Stratum Corneum's Lipid Membranes: Effect of pH and Temperature." *Biophysical Journal* 93 (9): 3142–55.
- Platon, J.-F. 1997. "Les lipides en cosmétologie : Lipides et cosmétologie." *OCL. Oléagineux, corps gras, lipides* 4 (4): 275–81.
- Ponec, Maria. 1992. "In Vitro Cultured Human Skin Cells as Alternatives to Animals for Skin Irritancy Screening." *International Journal of Cosmetic Science* 14 (6): 245–64.
- Polefka, T. G. 1999. "Surfactant interactions with skin". *Surfactant science series*, 433-468.
- Ponec, Maria, Esther Boelsma, Susan Gibbs, and Mieke Mommaas. 2002. "Characterization of Reconstructed Skin Models." *Skin Pharmacology and Physiology* 15 (Suppl. 1): 4–17.
- Ponec, Maria, and Johanna Kempenaar. 1995. "Use of Human Skin Recombinants as an in Vitro Model for Testing the Irritation Potential of Cutaneous Irritants." *Skin Pharmacology and Physiology* 8 (1-2): 49–59.
- Ponec, M., S. Gibbs, G. Pilgram, E. Boelsma, H. Koerten, J. Bouwstra, and M. Mommaas. 2001. "Barrier Function in Reconstructed Epidermis and Its Resemblance to Native Human Skin." *Skin Pharmacology and Physiology* 14 (Suppl. 1): 63–71.
- Potts, R. O., and M. L. Francoeur. 1990. "Lipid Biophysics of Water Loss through the Skin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87 (10): 3871–73.
- Previati, Maurizio, Lucia Bertolaso, Michela Tramarin, Valeria Bertagnolo, and Silvano Capitani. 1996. "Low Nanogram Range Quantitation of Diglycerides and Ceramide by High-Performance Liquid Chromatography." *Analytical Biochemistry* 233 (1): 108–14.
- Proksch, Ehrhardt, Johanna M. Brandner, and Jens-Michael Jensen. 2008. "The Skin: An Indispensable Barrier." *Experimental Dermatology* 17 (12): 1063–72.
- Prottey, C., and T. Ferguson. 1975. "Factors Which Determine Skin Irritation Potential of Soaps and Detergents." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 26 (1): 29 – 8.
- Purohit, P., P. Chandar, A. Vilinska, K. P. Ananthapadmanabhan, and P. Somasundaran. 2014. "Effect of Mixed Surfactants on Stratum Corneum: A Drying Stress and Raman Spectroscopy Study." *International Journal of Cosmetic Science* 36 (4): 379–85.
- Puttnam N.A, 1972. "Attenuated total reflectance studies on the skin", *J. Soc.Cosmet. Chem.* 2 3 209-226
- Q**uerleux, B., S. Richard, J. Bittoun, O. Jolivet, I. Idy-Peretti, R. Bazin, and J.L. L&eacute;y&ecirc;que. 1994. "In Vivo Hydration Profile in Skin Layers by High-Resolution Magnetic Resonance Imaging." *Skin Pharmacology and Physiology* 7 (4): 210–16.
- R**awlings, Anthony V. 2010. "Recent Advances in Skin 'barrier' Research." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62 (6): 671–77.
- Rawlings, Anthony V, and Paul J Matts. 2005. "Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level: An Update in Relation to the Dry Skin Cycle." *The Journal of Investigative Dermatology* 124 (6): 1099–1110.
- Rawlings, A. V. 2003. "Trends in Stratum Corneum Research and the Management of Dry Skin Conditions." *International Journal of Cosmetic Science* 25 (1-2): 63–95.

- Rawlings, A. V., and C. R. Harding. 2004. "Moisturization and Skin Barrier Function." *Dermatologic Therapy* 17 (February): 43–48. doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04S1005.x.
- Rawlings, A. V., P. J. Matts, C. D. Anderson, and M. S. Roberts. 2008. "Skin Biology, Xerosis, Barrier Repair and Measurement." *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, Common skin conditions and disorders, 5 (2): e127–36.
- Rawlings, Av, A. Watkinson, J. Rogers, Am Mayo, J. Hope, and Ir Scott. 1994. "Abnormalities in Stratum-Corneum Structure, Lipid-Composition, and Desmosome Degradation in Soap-Induced Winter Xerosis." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 45 (4): 203–20.
- Rerek, Mark E., Chen, Berislav Markovic, Dina Van Wyck, Patrick Garidel, Richard Mendelsohn, and David J. Moore. 2001. "Phytosphingosine and Sphingosine Ceramide Headgroup Hydrogen Bonding: Structural Insights through Thermotropic Hydrogen/Deuterium Exchange." *The Journal of Physical Chemistry B* 105 (38): 9355–62.
- Rhein, L. D., C. R. Robbins, K. Fernee, and R. Cantore. 1986a. "Surfactant Structure Effects on Swelling of Isolated Human Stratum Corneum." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 37 (3): 125–39.
- . 1986b. "Surfactant Structure Effects on Swelling of Isolated Human Stratum Corneum." *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 37 (3): 125–39.
- Rhein, Linda D., Anthony Simion, Robert L. Hill, Robert H. Cagan, Jairajh Mattai, and Howard I. Maibach. 1990. "Human Cutaneous Response to a Mixed Surfactant System: Role of Solution Phenomena in Controlling Surfactant Irritation." *Dermatology* 180 (1): 18–23.
- Ribaud, Christèle, Jean-Claude Garson, Jean Doucet, and Jean-Luc Lévêque. 1994. "Organization of Stratum Corneum Lipids in Relation to Permeability: Influence of Sodium Lauryl Sulfate and Preheating." *Pharmaceutical Research* 11 (10): 1414–18.
- Rodríguez, Gelen, Lucyanna Barbosa-Barros, Laia Rubio, Mercedes Cócera, Avencia Díez, Joan Estelrich, Ramon Pons, Jaume Caelles, Alfonso De la Maza, and Olga López. 2009. "Conformational Changes in Stratum Corneum Lipids by Effect of Bicellar Systems." *Langmuir* 25 (18): 10595–603.
- Rosenberg, Allan, Roberta Williams, and George Cohen. 1973. "Interaction Forces Involved in Wetting of Human Skin." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 62 (6): 920–22.
- Rosendal, Thomas. 1945. "Concluding Studies on the Conducting Properties of Human Skin to Alternating Current." *Acta Physiologica Scandinavica* 9 (1): 39–49.
- S**aad, P., C. R. Flach, R. M. Walters, and R. Mendelsohn. 2012. "Infrared Spectroscopic Studies of Sodium Dodecyl Sulphate Permeation and Interaction with Stratum Corneum Lipids in Skin." *International Journal of Cosmetic Science* 34 (1): 36–43.
- Saary, Joan, Roohi Qureshi, Valerie Palda, Joel DeKoven, Melanie Pratt, Sandy Skotnicki-Grant, and Linn Holness. 2005. "A Systematic Review of Contact Dermatitis Treatment and Prevention." *Journal of the American Academy of Dermatology* 53 (5): 845.e1–845.e13.
- Sakai, Shingo, Rie Yasuda, Tetsuya Sayo, Osamu Ishikawa, and Shintaro Inoue. 2000. "Hyaluronan Exists in the Normal Stratum Corneum." *Journal of Investigative Dermatology* 114 (6): 1184–87.
- Sarpotdar, P.P., and J.L. Zatz. 1986a. "Percutaneous Absorption Enhancement by Nonionic Surfactants." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 12 (11-13): 1625–47.
- . 1986b. "Evaluation of Penetration Enhancement of Lidocaine by Nonionic Surfactants through Hairless Mouse Skin in Vitro." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 75 (2): 176–81.
- Sato, Junko, Mitsuhiro Denda, Jotaro Nakanishi, Junko Nomura, and Junichi Koyama. 1998. "Cholesterol Sulfate Inhibits Proteases That Are Involved in Desquamation of Stratum Corneum." *Journal of Investigative Dermatology* 111 (2): 189–93.

- Savic, Snezana, Milica Lukic, Ivana Jaksic, Stephan Reichl, Slobodanka Tamburic, and Christel Müller-Goymann. 2011. "An Alkyl Polyglucoside-Mixed Emulsifier as Stabilizer of Emulsion Systems: The Influence of Colloidal Structure on Emulsions Skin Hydration Potential." *Journal of Colloid and Interface Science* 358 (1): 182–91.
- Schilling, M., and O. Thum. 2013. "Hydrophobized Protein Hydrolysate." <http://www.google.com/patents/US20130251658>.
- Schmook, Fritz P., Josef G. Meingassner, and Andreas Billich. 2001. "Comparison of Human Skin or Epidermis Models with Human and Animal Skin in in-Vitro Percutaneous Absorption." *International Journal of Pharmaceutics* 215 (1–2): 51–56.
- Schmuth, Matthias, Mao-Qiang Man, Florian Weber, WenNi Gao, Kenneth R. Feingold, Peter Fritsch, Peter M. Elias, and Walter M. Holleran. 2000. "Permeability Barrier Disorder in Niemann–Pick Disease: Sphingomyelin–Ceramide Processing Required for Normal Barrier Homeostasis." *Journal of Investigative Dermatology* 115 (3): 459–66..
- Schreier, Hans, and Joke Bouwstra. 1994. "Liposomes and Niosomes as Topical Drug Carriers: Dermal and Transdermal Drug Delivery." *Journal of Controlled Release* 30 (1): 1–15.
- Schröter, Annett, Doreen Kessner, Mikhail A. Kiselev, Thomas Hauß, Silva Dante, and Reinhard H. H. Neubert. 2009. "Basic Nanostructure of Stratum Corneum Lipid Matrices Based on Ceramides [EOS] and [AP]: A Neutron Diffraction Study." *Biophysical Journal* 97 (4): 1104–14.
- Schweizer, Jürgen, Paul E. Bowden, Pierre A. Coulombe, Lutz Langbein, E. Birgitte Lane, Thomas M. Magin, Lois Maltais, et al. 2006. "New Consensus Nomenclature for Mammalian Keratins." *The Journal of Cell Biology* 174 (2): 169–74.
- Seddon, Annela M., Paul Curnow, and Paula J. Booth. 2004. "Membrane Proteins, Lipids and Detergents: Not Just a Soap Opera." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Lipid-Protein Interactions*, 1666 (1–2): 105–17.
- Shahi, Vijay, and Joel L. Zatz. 1978. "Effect of Formulation Factors on Penetration of Hydrocortisone through Mouse Skin." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67 (6): 789–92.
- Sheu, Hamm-Ming, Sheau-Chiou Chao, Tak-Wah Wong, Yu-Yun Lee, and Jui-Chen Tsai. 1999. "Human Skin Surface Lipid Film: An Ultrastructural Study and Interaction with Corneocytes and Intercellular Lipid Lamellae of the Stratum Corneum." *British Journal of Dermatology* 140 (3): 385–91.
- Simon, Michel, Nathalie Jonca, Marina Guerrin, Marek Haftek, Dominique Bernard, Cécile Caubet, Torbjörn Egelrud, Rainer Schmidt, and Guy Serre. 2001. "Refined Characterization of Corneodesmosin Proteolysis during Terminal Differentiation of Human Epidermis and Its Relationship to Desquamation." *Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 20292–99.
- Sims, J. E., M. A. Gayle, J. L. Slack, M. R. Alderson, T. A. Bird, J. G. Giri, F. Colotta, et al. 1993. "Interleukin 1 Signaling Occurs Exclusively via the Type I Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (13): 6155.
- Smeden, Jeroen van, Louise Hoppel, Rob van der Heijden, Thomas Hankemeier, Rob J. Vreeken, and Joke A. Bouwstra. 2011. "LC/MS Analysis of Stratum Corneum Lipids: Ceramide Profiling and Discovery." *Journal of Lipid Research* 52 (6): 1211–21.
- Smeden, van J., M. Janssens, G. S. Gooris, and J. A. Bouwstra. 2014. "The Important Role of Stratum Corneum Lipids for the Cutaneous Barrier Function." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, The Important Role of Lipids in the Epidermis and their Role in the Formation and Maintenance of the Cutaneous Barrier*, 1841 (3): 295–313.
- Smith, H. R., G. E. Orchard, E. Calonje, D. A. Basketter, and J. P. McFadden. 2004. "Irritant Threshold and Histological Response of Epidermis to Irritant Application." *Contact Dermatitis* 51 (5-6): 227–30.

- Somasundaran, P. 2006. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. CRC Press.
- Som, Iti, Kashish Bhatia, and Mohd. Yasir. 2012. "Status of Surfactants as Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery." *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 4 (1): 2–9.
- Sotoodian, Bahman, and Howard I. Maibach. 2012. "Noninvasive Test Methods for Epidermal Barrier Function." *Clinics in Dermatology*, Epidermal Barrier Function: Clinical Implications and Therapeutic Relevance, 30 (3): 301–10.
- Steinert, Peter M. 1993. "Structure, Function, and Dynamics of Keratin Intermediate Filaments." *Journal of Investigative Dermatology* 100 (6): 729–34.
- Steinert, Peter M., Tonja Kartasova, and Lyuben N. Marekov. 1998. "Biochemical Evidence That Small Proline-Rich Proteins and Trichohyalin Function in Epithelia by Modulation of the Biomechanical Properties of Their Cornified Cell Envelopes." *Journal of Biological Chemistry* 273 (19): 11758–69.
- Steinert, Peter M., and Lyuben N. Marekov. 1997. "Direct Evidence That Involucrin Is a Major Early Isopeptide Cross-Linked Component of the Keratinocyte Cornified Cell Envelope." *Journal of Biological Chemistry* 272 (3): 2021–30.
- . 1999. "Initiation of Assembly of the Cell Envelope Barrier Structure of Stratified Squamous Epithelia." *Molecular Biology of the Cell* 10 (12): 4247–61.
- Stewart, M. E., and D. T. Downing. 1991. "Chemistry and Function of Mammalian Sebaceous Lipids." *Advances in Lipid Research* 24: 263–301.
- Swartzendruber, D. C., P. W. Wertz, D. J. Kitko, K. C. Madison, and D. T. Downing. 1989. "Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum Corneum." *Journal of Investigative Dermatology* 92 (2): 251–57.
- T**aniuchi, S., T. Kojima, K. Hara Mt, A. Yamamoto, M. Sasai, H. Takahashi, and Y. Kobayashi. 2001. "Increased Serum Nitrate Levels in Infants with Atopic Dermatitis." *Allergy* 56 (7): 693–95.
- Thiele, Jens J., Stefan U. Weber, and Lester Packer. 1999. "Sebaceous Gland Secretion Is a Major Physiologic Route of Vitamin E Delivery to Skin." *Journal of Investigative Dermatology* 113 (6): 1006–10.
- Tornier, Carine, Manon Roquet, and Anne de Brugerolle de Fraissinette. 2010. "Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0.5 cm<sup>2</sup> Tissue Sample." *Toxicology in Vitro* 24 (5): 1379–85.
- Tsai, Tsung-Hua, Shiou-Hwa Jee, Chen-Yuan Dong, and Sung-Jan Lin. 2009. "Multiphoton Microscopy in Dermatological Imaging." *Journal of Dermatological Science* 56 (1): 1–8.
- Tupker, Ra, J Pinnagoda, and Jp Nater. 1989. "The Transient and Cumulative Effect of Sodium Lauryl Sulphate on the Epidermal Barrier Assessed by Transepidermal Water Loss: Inter-Individual Variation." *Acta Dermato-Venereologica* 70 (1): 1–5.
- Tupker, R. A., C. Willis, E. Berardksca, C. H. Lee, M. Fartasch, T. Atinrat, and J. Serup. 1997. "Guidelines on Sodium Lauryl Sulfate (SLS) Exposure Tests." *Contact Dermatitis* 37 (2): 53–69.
- Tupker, Ron. A., Jaliya Pinnagoda, Pieter-Jan Coenraads, and Johan P. Nater. 1989. "The Influence of Repeated Exposure to Surfactants on the Human Skin as Determined by Transepidermal Water Loss and Visual Scoring." *Contact Dermatitis* 20 (2): 108–14.
- U**chida, Yoshikazu, Mariko Hara, Hiroyuki Nishio, Ellen Sidransky, Shintaro Inoue, Fujio Otsuka, Akemi Suzuki, Peter M. Elias, Walter M. Holleran, and Sumiko Hamanaka. 2000. "Epidermal Sphingomyelins Are Precursors for Selected Stratum Corneum Ceramides." *Journal of Lipid Research* 41 (12): 2071–82.
- Uhoda, Emmanuelle, Marc Paye, and Gérald Pierard. 2003. "Comparative Clinical and Electrometric Assessments of the Impact of Surfactants on Forearm Skin." *Exogenous Dermatology : Physical, Chemical, Biological* 2.

- Van Scott, E. J., and J. B. Lyon. 1953. "A Chemical Measure of the Effect of Soaps and Detergents on the Skin<sup>1</sup>." *Journal of Investigative Dermatology* 21 (3): 199–203.
- Varani, James, Andres Astrom, Christopher E. M. Griffiths, and John J. Voorhees. 1991. "Induction of Proliferation of Growth-Inhibited Keratinocytes and Fibroblasts in Monolayer Culture by Sodium Lauryl Sulfate: Comparison with All-Trans Retinoic Acid." *Journal of Investigative Dermatology* 97 (5): 917–21.
- Walters, Kenneth A., W. Bialik, and Keith R. Brain. 1993. "The Effects of Surfactants on Penetration across the Skin\*." *International Journal of Cosmetic Science* 15 (6): 260–71.
- Walters, Russel M., Guangru Mao, Euen T. Gunn, and Sidney Hornby. 2012. "Cleansing Formulations That Respect Skin Barrier Integrity." *Dermatology Research and Practice* 2012 (August): e495917.
- Wang, Xu-Ping, Michael Schunck, Karl-Josef Kallen, Claudia Neumann, Christian Trautwein, Stefan Rose-John, and Ehrhardt Proksch. 2003. "The Interleukin-6 Cytokine System Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis." *Journal of Investigative Dermatology* 123 (1): 124–31.
- Wartewig, Siegfried, and Reinhard H. H. Neubert. 2005. "Pharmaceutical Applications of Mid-IR and Raman Spectroscopy." *Advanced Drug Delivery Reviews, Non-Invasive Spectroscopic and Imaging Techniques in Drug Delivery*, 57 (8): 1144–70.
- Welss, Thomas, David A Basketter, and Klaus R Schröder. 2004. "In Vitro Skin Irritation: Facts and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models." *Toxicology in Vitro* 18 (3): 231–43.
- Welzel, Julia. 2001. "Optical Coherence Tomography in Dermatology: A Review." *Skin Research and Technology* 7 (1): 1–9.
- Wertz, Pw. 1999. "Lipids and Barrier Function of the Skin." *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum* 208 (December): 7–11.
- Wertz, P W, K C Madison, and D T Downing. 1989. "Covalently Bound Lipids of Human Stratum Corneum." *The Journal of Investigative Dermatology* 92 (1): 109–11.
- White, Stephen H., Dorla Mirejovsky, and Glen I. King. 1988. "Structure of Lamellar Lipid Domains and Corneocyte Envelopes of Murine Stratum Corneum. An X-Ray Diffraction Study." *Biochemistry* 27 (10): 3725–32.
- Wickett, R. Randall, and Marty O. Visscher. 2006. "Structure and Function of the Epidermal Barrier." *American Journal of Infection Control* 34 (10, Supplement): S98–110.
- Wigger-Alberti, W., A. Krebs, and P. Elsner. 2000. "Experimental Irritant Contact Dermatitis due to Cumulative Epicutaneous Exposure to Sodium Lauryl Sulphate and Toluene: Single and Concurrent Application." *British Journal of Dermatology* 143 (3): 551–56..
- Wilhelm, Klaus-P., Anastasia B. Cua, Helmut H. Wolff, and Howard I. Maibach. 1993a. "Surfactant-Induced Stratum Corneum Hydration in Vivo: Prediction of the Irritation Potential of Anionic Surfactants." *Journal of Investigative Dermatology* 101 (3): 310–15.
- . 1993b. "Surfactant-Induced Stratum Corneum Hydration in Vivo: Prediction of the Irritation Potential of Anionic Surfactants." *Journal of Investigative Dermatology* 101 (3): 310–15.
- Wilhelm, K-P., M. Samblebe, and C-P. Siegers. 1994. "Quantitative in Vitro Assessment of N-Alkyl Sulphate-Induced Cytotoxicity in Human Keratinocytes (HaCaT). Comparison with in Vivo Human Irritation Tests." *British Journal of Dermatology* 130 (1): 18–23.
- Wilhelm, K.-P., Jennelle C. Saunders, and H.i. Maibach. 1990. "Increased Stratum Corneum Turnover Induced by Subclinical Irritant Dermatitis." *British Journal of Dermatology* 122 (6): 793–98.
- Williams, Adrian C., and Brian W. Barry. 2012. "Penetration Enhancers." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (December): 128–37.

- Williams, Ifor R., and Thomas S. Kupper. 1996. "Immunity at the Surface: Homeostatic Mechanisms of the Skin Immune System." *Life Sciences* 58 (18): 1485–1507.
- Willis, Carolyn M., Catherine J. M. Stephens, and John D. Wilkinson. 1989. "Epidermal Damage Induced by Irritants in Man: A Light and Electron Microscopic Study." *Journal of Investigative Dermatology* 93 (5): 695–99.
- . 1992. "Differential Effects of the Structurally Unrelated Chemical Irritants on the Density of Proliferating Keratinocytes in 48 H Patch Test Reactions." *Journal of Investigative Dermatology* 99 (4): 449–53.
- Wilmer, James L., Florence G. Burlison, Fujio Kayama, Jun Kanno, and Michael I. Luster. 1994. "Cytokine Induction in Human Epidermal Keratinocytes Exposed to Contact Irritants and Its Relation to Chemical-Induced Inflammation in Mouse Skin." *Journal of Investigative Dermatology* 102 (6): 915–22.
- Wolf, Ronni, and Lawrence Charles Parish. 2012. "Effect of Soaps and Detergents on Epidermal Barrier Function." *Clinics in Dermatology, Epidermal Barrier Function: Clinical Implications and Therapeutic Relevance*, 30 (3): 297–300.
- Wu, J., and T. G. Polefka. 2008. "Confocal Raman Microspectroscopy of Stratum Corneum: A Pre-Clinical Validation Study." *International Journal of Cosmetic Science* 30 (1): 47–56.
- Zettersten, Elizabeth, Mao-Qiang Man, Junko Sato, Mitsuhiro Denda, Angela Farrell, Ruby Ghadially, Mary L. Williams, Kenneth R. Feingold, and Peter M. Elias. 1998. "Recessive X-Linked Ichthyosis: Role of Cholesterol-Sulfate Accumulation in the Barrier Abnormality." *Journal of Investigative Dermatology* 111 (5): 784–90.
- Zhai, Hongbo, Rolf Fautz, Anne Fuchs, Sulochana Bhandarkar, and Howard I. Maibach. 2004. "Human Scalp Irritation Compared to that of the Arm and Back." *Contact Dermatitis* 51 (4): 196–200.





**Emmanuelle LEMERY**

STRUCTURE ET PHYSICOCHIMIE DES TENSIOACTIFS, LEURS IMPACTS SUR LA TOXICITE CUTANEE ET LA FONCTION BARRIERE.

Thèse de l'Université Lyon 1

## RESUME

Crèmes, shampoings, savons, gels douche, ces produits cosmétiques quotidiennement utilisés, ont en commun la présence d'une matière première essentielle à leur formulation, à savoir le tensioactif ou émulsifiant. Ces molécules sont donc fréquemment en contact avec la peau. En effet, de par sa structure amphiphile particulière, le tensioactif aide à la stabilisation des émulsions, permet la formation de mousse et apporte les propriétés détergentes des produits cosmétiques nettoyants, en solubilisant les corps gras présents en surface. Ces molécules peuvent également interagir avec les composants de la peau. Une des premières preuves évidente de l'interaction des tensioactifs avec la peau est l'observation des signes cliniques suite à l'exposition prolongée ou chronique à des formules riches en tensioactifs. Ces molécules sont maintenant connues pour engendrer des dermatites de contact d'irritation et font l'objet d'un véritable problème de santé publique concernant les maladies professionnelles aux détergents. Cependant, devant la multitude de tensioactifs présents sur le marché, les mécanismes d'action des tensioactifs sur la peau sont encore mal connus, surtout pour les tensioactifs non ioniques, très utilisés dans les produits de soin et souvent considérés comme non toxiques. Le sodium lauryl sulfate, tensioactif anionique reste à ce jour, la molécule modèle couramment étudiée. La toxicité cutanée est le plus souvent reliée à l'interaction du tensioactif avec les protéines, molécules chargées. De ce fait, les tensioactifs ioniques sont considérés comme étant les plus toxiques pour la peau. De plus, la forme monomérique du tensioactif est décrite comme l'entité responsable de la toxicité cutanée, s'insérant plus facilement dans la bicouche lipidique et pouvant ainsi pénétrer plus facilement dans la peau que sous la forme de micelles. La toxicité du tensioactif est donc également reliée à sa concentration micellaire critique. L'objectif de ce projet de recherche était d'approfondir les connaissances sur différentes propriétés physicochimiques de nombreuses classes de tensioactifs, afin de mieux comprendre leurs interactions ainsi que leurs effets sur la peau. Plusieurs niveaux d'études ont été développés. Après une analyse physicochimique des tensioactifs détaillée, des mesures in vitro ont permis d'évaluer l'effet du tensioactif sur la toxicité cutanée. L'étude portant sur la fonction barrière de la peau (propriétés de surface/détergence, organisation de la matrice lipidique et évaluation de l'extraction lipidique) a été menée via des expérimentations ex vivo. Nos études ont montré une toxicité notable de certains tensioactifs non ioniques et a contrario certains tensioactifs ioniques se sont révélés parfaitement bien tolérés. Les paramètres soulignés dans la littérature tels que la CMC et la charge des tensioactifs ont été remis en question. Plusieurs explications ont été mises en avant considérant l'organisation du tensioactif dans l'eau et son comportement vis-à-vis de la fonction barrière cutanée apportant ainsi de nouvelles pistes pour une meilleure compréhension de l'effet du tensioactif sur la peau. De plus La toxicité des tensioactifs a pu être reliée à un des trois niveaux de perturbation de la barrière cutanée: la désorganisation de la matrice lipidique.

**MOTS CLES :** tensioactif, fonction barrière, stratum corneum, toxicité cutanée, spectroscopie infrarouge, angle de contact, extraction lipidique.

## LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

UMR 5007, Laboratoire d'Automatique et de Génie de Procédés, pôle GEPHARM  
43 Boulevard du 11 novembre 1918, Bâtiment CPE-308G, 69622 Villeurbanne Cedex