HAL
open science

Pénétration transcutanée des substances actives : application en dermocosmétologie

Amandine Georgel

To cite this version:

Amandine Georgel. Pénétration transcutanée des substances actives : application en dermocosmétologie. Sciences pharmaceutiques. 2008. hal-01732837

HAL Id: hal-01732837

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732837v1

Submitted on 14 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1

2008

FACULTE DE PHARMACIE

PENETRATION TRANSCUTANEE DES SUBSTANCES ACTIVES.

APPLICATION EN DERMOCOSMETOLOGIE.

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 25 novembre 2008

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Amandine GEORGEL**
née le 28 juin 1983 à Remiremont (88)

Membres du Jury

Président :	M. Jean-Claude BLOCK,	Professeur et responsable de la Commission de la Recherche
Juges :	Mme Elisabeth BENOIT MORRUZZI,	Pharmacien Assistant en officine à Moulins Les Metz (57)
	Melle Bénédicte CASSAGNOU,	Pharmacien Titulaire d'officine à Anould (88)

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN
Chantal FINANCE
Vice-Doyen
Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie
Pierre LABRUDE
Responsable de la Commission de la Recherche
Jean-Claude BLOCK
Directeur des Etudes
Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales
Janine SCHWARTZBROD
Responsable de la Communication
Francine KEDZIEREWICZ
Responsable de la Commission Hygiène Sécurité
Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine : Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH : Jean-Michel SIMON
(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMAN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire
Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité) …….. Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON ……. Pharmacologie
Gilles AULAGNER ……. Pharmacie clinique
Alain BAGREL ……. Biochimie
Jean-Claude BLOCK ……. .. Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON ……. Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE …… Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL ……... Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU…… Biochimie clinique
Christophe GANTZER ……. Microbiologie environnementale
Max HENRY ……. Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU ……Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE …….. Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR……. Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD…… Pharmacologie
Pierre LEROY…….Chimie physique générale
Philippe MAINCENT……. Pharmacie galénique
Alain MARSURA……...Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN……...Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS……. Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS……. Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN……Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD ……... Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON……...Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON……... Hématologie, Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT……..Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS……Parasitologie
Mariette BEAUD…… Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT…….Communication et Santé
Michel BOISBRUN…… Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX……...Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX……... Chimie thérapeutique
Cédric BOURA……...Physiologie
Gérald CATAU……...Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN…….Chimie générale et minérale
Igor CLAROT…….Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB…….. Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON…… Biochimie
Sébastien DADE…… Bio-informatique
Bernard DANGIEN…… Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN…… Chimie analytique
Béatrice DEMORE……. Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU……. Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY…….. Chimie thérapeutique

François DUPUIS……... Pharmacologie
Raphaël DUVAL…… Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE……Hématologie
Luc FERRARI…… Toxicologie
Stéphane GIBAUD……. Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN……. Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT…… Chimie organique
Frédéric JORAND…….. Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ……Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT…….Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER…… Biochimie
Stéphanie MARCHAND…… Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI…….....Hématologie biologique
Patrick MENU…… Physiologie
Christophe MERLIN……...Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU……Pharmacognosie
Dominique NOTTER……..Biologie cellulaire
Francine PAULUS…….. Informatique
Christine PERDICAKIS……. Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO……... Pharmacologie
Virginie PICHON……... Biophysique
Anne SAPIN……... Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER……Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY……Santé publique
Gabriel TROCKLE……. Pharmacologie
Mohamed ZAIOU……...Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI…… Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER……. Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD…….. Anglais

ASSISTANT

Annie PAVIS…….. Bactériologie

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)

Anne-Pascale PARRET…….. Directeur
Frédérique FERON……. Responsable de la section Pharmacie-Odontologie

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

> **D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**
>
> **D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**
>
> **De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A tous les membres du jury,
Merci d'avoir accepté d'être présents ce jour et de juger mon travail.

A Bénédicte Cassagnou,
Merci d'avoir accepté avec tant d'enthousiasme de juger mon travail.
Merci d'être présente ce jour parmi ma famille et mes amis.
Merci pour votre gentillesse, votre écoute et votre générosité.

A mon tendre chéri, Arnaud,
Merci pour ton soutien et ta patience au cours de ces longues années. Merci de m'avoir toujours encouragée à réaliser mon rêve.

A mes parents,
Merci pour toute votre aide et pour la confiance que vous m'avez accordée.
Merci pour la fierté que vous avez envers moi.

A ma famille :
A mon frère et à Honorine, à mes grands-mères, à mes grands-pères à qui je pense, mes oncles et tantes, cousins et cousines.

A mes beaux-parents :
Merci pour votre gentillesse et votre soutien.

A Aude :
Merci pour cette belle amitié qui s'est créée entre nous deux.
Merci pour ces moments intenses et ces fou-rires partagés lors de notre colocation !!

A mes amis :
Merci à vous tous pour tous les bons moments passés ensemble : Hélène, Seb, Arnaud, Carole, Nadine, Bastien, Henri-Paul, Thibaut, Xavier, Paul, Le Jaune, Paupiette, Geoffroy, Julie

A l'équipe de la pharmacie LE BERRE :
Merci à vous de m'avoir appris le métier de pharmacien durant ces étés passés en votre compagnie.
Merci pour votre gentillesse et vos valeurs éthiques et morales.
Merci de m'avoir proposé mon premier remplacement en tant que pharmacien qui a été très formateur pour moi.

A toute l'équipe de la pharmacie CASSAGNOU :
Merci pour votre accueil et votre gentillesse.
Merci pour la confiance que vous m'accordez au quotidien.

SOMMAIRE

INTRODUCTION **1**

1° PARTIE : **4**

PHYSIOLOGIE DE LA PEAU ET SON ROLE DE BARRIERE **4**

I. HISTOLOGIE ET PHYSIOLOGIE **5**

1.1. L'épiderme **5**

1.1.1. Structure de l'épiderme 6

1.1.1.1. Couche basale (germinative) = *stratum germinativum* 7

1.1.1.2. Couche épineuse (corps muqueux de Malpighi) = *stratum spinosum* 7

1.1.1.3. Couche granuleuse = *stratum granulosum* 8

1.1.1.4. Couche cornée = *stratum corneum* 9

1.1.1.5. Cellules de l'épiderme 11

1.1.2. La kératinisation 13

1.1.3. Physiologie du *stratum corneum* 15

1.1.3.1. Barrière mécanique 15

1.1.3.2. Gradient d'hydratation et perte insensible en eau 16

1.1.3.3. Rôle de réservoir 18

1.1.3.4. Rôle esthétique 19

1.1.3.5. pH cutané 19

1.2. Jonction dermoépidermique **20**

1.3. Le derme (29,35,45) **21**

1.3.1. Derme superficiel = adventiciel = papillaire 21

1.3.2. Derme réticulaire 22

1.3.3. Cellules du derme 22

1.3.4. Protéines 23

1.3.5. Gel interfibrillaire 25

1.4. L'hypoderme (tissu sous-cutané) **26**

1.4.1. Structure 26

1.4.2. Physiologie 27

1.4.2.1. Lipogenèse 27

1.4.2.2. Lipolyse 28

1.5. Annexes cutanées **30**

1.5.1. Glandes sudoripares 30

1.5.1.1. Glandes sudoripares eccrines 30

1.5.1.2. Glandes sudoripares apocrines 32
1.5.2. Follicules pilosébacés 33
1.5.2.1. Structure et physiologie de la sécrétion 34
1.5.2.2. Composition et rôle du sébum 34
1.6. Vascularisation 36
1.6.1. Architecture 36
1.6.2. Variations selon la localisation et l'âge 37
1.7. Innervation 37
1.7.1. Végétative 38
1.7.2. Sensitive 38
1.8. Flore cutanée 39

II. FONCTION BARRIERE 40

2.1. Le film hydrolipidique 40
2.1.1. Localisation et composition 40
2.1.2. Evolution 41
2.1.3. Rôles 41
2.2. Pigmentation cutanée 42
2.2.1. Les mélanines 42
2.2.2. Mécanisme de pigmentation 44
2.2.3. Rôle de barrière vis-à-vis des rayons solaires 46
2.2.4. Influence de la race et phototypes 47
2.3. Etude de la fonction barrière : modèles de peau reconstruite 48
2.3.1. Modèle simple (épiderme, derme, kératinocytes) 49
2.3.2. Modèle pigmenté (épiderme, derme, kératinocytes, mélanocytes) 50
2.3.3. Modèle aux 3 cellules (épiderme, derme, kératinocytes, mélanocytes, précurseurs des cellules de Langerhans) 51
2.3.4. Epiderme sur équivalent dermique 52
2.3.5. Le modèle de « peau âgée » 52
2.3.6. Divers modèles : Epiderm®, Episkin®, Skinethic® 53
2.3.6.1. Etude comparant la reproductibilité des 3 modèles en observant la pénétration de 3 substances (34). 54
2.3.6.2. Etude du profil de pénétration et de distribution au sein de l'épiderme du mannitol au niveau des modèles Epiderm® et Episkin® (18). 56
2.4. Autres fonctions barrière 57
2.4.1. Barrière thermique 58
2.4.2. Barrière immunologique 58
2.4.3. Barrière mécanique 58

III.PHYSIOLOGIE DE LA PENETRATION CUTANEE 59

3.1. Mécanismes et voies d'absorption **59**
3.1.1. Cinétique de l'absorption cutanée 59
3.1.2. Organisation du stratum corneum 61
3.1.3. Voie transcellulaire/intercellulaire/annexielle 61
3.2. Facteurs d'influence **63**
3.2.1. Etat de la peau et âge 63
3.2.2. Site d'application 64
3.2.3. Epaisseur de la couche appliquée, surface et fréquence d'application 65
3.2.4. Occlusion et hydratation de la peau 66
3.2.5. Nature physico-chimique de la substance active 67
3.2.6. Influence du véhicule 68
3.2.7. Influence de la forme galénique 71
3.2.8. Evaporation 72
3.2.9. Température et humidité 73
3.2.10. Durée d'exposition 73
3.2.11. Pathologies cutanées (ichtyose, psoriasis, dermatite atopique) 73
3.3. Méthodes de mesure **74**
3.3.1. *In vivo* 74
3.3.1.1. Dosage dans les excreta 74
3.3.1.2. Suivi du taux plasmatique 75
3.3.1.3. Mesure de l'effet local 76
3.3.1.4. Disparition d'un isotope radioactif 76
3.3.1.5. Bulle de succion 76
3.3.1.6. Microdialyse 77
3.3.1.7. Dosage dans le *stratum corneum* 78
3.3.1.8. Mesure de la quantité disparue (méthode des différences) 78
3.3.2. *In vitro* 78
3.3.2.1. Protocole 78
3.3.2.2. Comparaison avec les études *in vivo* 80
3.4. Stratégies pour altérer la fonction barrière **81**
3.4.1. Substances chimiques : véhicules promoteurs d'absorption ou « enhancers » 82
3.4.2. L'occlusion 83
3.4.3. Méthodes physiques 84

2° PARTIE : **85**

LES COSMETIQUES ET LEUR ABSORPTION PERCUTANEE **85**

I. LEGISLATION CONCERNANT LES COSMETIQUES **86**

II. LES SUBSTANCES AMINCISSANTES **88**

2.1. Rappels de physiologie 88
2.1.1. Les adipocytes et leur localisation 88
2.1.2. La cellulite 88
2.1.2.1. Stades et évolution 89
2.1.2.2. Etiologie 89
2.2. Divers principes actifs et leur mécanisme d'action 90
2.2.1. Substances limitant la lipogenèse 90
2.2.2. Substances favorisant la lipolyse 90
2.2.3. Substances agissant sur la circulation capillaire 91
2.2.4. Substances agissant sur le tissu conjonctif 92
2.3. Les différentes formes galéniques 93
2.3.1. Comparaison de la biodisponibilité de différentes formes contenant de la caféine 93
2.3.2. Comparaison de deux émulsions (L/H et H/L/H) contenant de la caféine 96
2.3.3. Influence de différents paramètres au sein d'une émulsion H/L 98
2.4. Etude d'un gel amincissant : ELANCYL® 103

III. LES SUBSTANCES « ANTI-RIDES» 106

3.1. Physiologie du vieillissement cutané 106
3.1.1. Modifications structurales et conséquences fonctionnelles 106
3.1.1.1. Au niveau de l'épiderme 106
3.1.1.2. Au niveau de la jonction dermo-épidermique 107
3.1.1.3. Au niveau du derme 107
3.1.1.4. Autres 108
3.1.2. Premier signe du vieillissement : la ride 108
3.1.2.1. Définitions et répartition 108
3.1.2.2. Mécanisme de formation 108
3.1.3. Facteurs favorisants 110
3.1.3.1. Intrinsèques 110
3.1.3.2. Extrinsèques 110
3.2. Substances actives utilisables dans le traitement du vieillissement cutané et mécanisme d'action 111
3.2.1. Substances de nature protéique 111
3.2.2. Substances de nature non protéique 113
3.3. Exemple de la vitamine A et son dérivé : le rétinaldéhyde 114
3.3.1. Généralités sur la vitamine A et ses dérivés 114
3.3.2. Métabolisme cutané des rétinoïdes et leurs récepteurs 115
3.3.3. Effets cellulaires et tissulaires des rétinoïdes 116
3.3.4. Pénétration du rétinaldéhyde et intérêt de son association avec l'acide glycolique 117
3.4. Les AHA 120

3.4.1. Présentation et effets cutanés 120
3.4.2. Pénétration transcutanée des AHA 121

IV. LES PRODUITS SOLAIRES 125

4.1. Rayonnements UV et leurs effets sur la peau 125
4.2. Les substances photoprotectrices 128
4.2.1. Ecrans solaires 128
4.2.2. Filtres solaires 129
4.2.3. Les pièges à radicaux libres : anti-oxydants 130
4.3. Méthodes d'évaluation photobiologique des produits solaires 130
4.3.1. Evaluation de l'effet anti-erythématogène 130
4.3.2. Evaluation de la protection anti-UVA 131
4.3.3. Evaluation de la protection anti-IR 132
4.3.4. Evaluation de la résistance à l'eau 132
4.4. Etudes d'absorption cutanée et de distribution au sein du stratum corneum 132
4.4.1. Substances minérales : les écrans 132
4.4.2. Comparaison substance minérale/substance organique 135
4.4.3. Substances organiques : les filtres 136
4.5. Passage systémique et toxicité potentielle 143
4.6. Techniques utilisées pour limiter la pénétration des filtres 145

CONCLUSION 148

ANNEXES 152

TABLEAUX ET FIGURES 160

BIBLIOGRAPHIE 164

SITES INTERNET 171

INTRODUCTION

Selon la définition établie par la Commission Economique Européenne, un produit cosmétique est « une substance ou une préparation destinée à être mise en contact avec différentes parties superficielles du corps (épiderme, cheveux, ongles, lèvres, organes génitaux externes) ou avec les dents ou les muqueuses de la cavité buccale en vue de les nettoyer, parfumer, modifier l'aspect et/ou corriger les odeurs corporelles et/ou les protéger ou les conserver en bon état ».
De plus, un produit cosmétique ne doit pas nuire à la santé humaine lorsqu'il est appliqué selon des conditions normales d'utilisation.

Par conséquent, si l'on se réfère à la définition même d'un produit cosmétique, ce dernier doit avoir une action « de surface » et n'agir qu'au niveau des « couches supérieures de l'épiderme », ce que mentionnent de très nombreuses marques sur leurs produits.
Cependant, certaines substances pénètrent à travers la peau : cette pénétration transcutanée offre l'avantage d'une activité ciblée des principes actifs qui pourront se concentrer au sein même de leur lieu d'action.
Par exemple, il semble indispensable que des actifs amincissants pénètrent jusqu'aux couches graisseuses de la peau, là où ils pourront y exercer leur action lipolytique.
Ce ciblage s'avère indispensable afin d'assurer l'efficacité des produits, et leur innocuité.

Nous verrons au cours de cet exposé que malgré sa structure élaborée et un effet barrière relativement important, la peau n'est pas imperméable à toutes les molécules et que certaines pénètrent très aisément jusqu'aux couches les plus profondes et peuvent se retrouver dans la circulation générale d'où l'importance de connaitre la réalité et les proportions de ce passage.
Comme nous l'avons défini auparavant, une des qualités essentielles d'un cosmétique après son efficacité est son innocuité.
Mais est-ce encore bien réel lorsque la molécule a un passage systémique ? Quelles peuvent être les conséquences d'un tel passage sur l'organisme ?

Préalablement à l'étude de la pénétration transcutanée, nous donnerons quelques rappels d'histologie de physiologie des différentes couches cutanées afin de comprendre leur rôle de barrière vis-à-vis des agents extérieurs.
Une description de différents modèles de peaux permet de mieux comprendre toutes les études de pénétration décrites au cours de mon travail.
Ces dernières reflètent les voies de passage possibles et les facteurs permettant d'optimiser ou au contraire de réduire le passage des cosmétiques à travers la peau.

Dans une deuxième partie, nous avons choisi comme exemple trois grandes familles de cosmétiques : les produits amincissants, les produits anti-âge et les solaires.
Nous essayerons d'évaluer dans un premier temps l'efficacité pour certains de ces produits.
Il semble donc important d'étudier d'une part les principes actifs et leurs propriétés et d'autre part le fait qu'ils puissent agir aux endroits désirés.
Dans un second temps, il apparait essentiel d'évaluer l'innocuité de ces produits et un éventuel passage systémique.
Lorsque l'on s'aperçoit du passage sanguin d'une molécule, il est indispensable d'en évaluer l'importance et toutes les conséquences que ce dernier peut avoir sur l'organisme.

Les ventes des produits amincissants étaient en perte de vitesse ces dernières années car les utilisatrices étaient déçues et n'obtenaient pas les résultats escomptés.
Nous avons tenté d'analyser la pénétration de ces produits à travers la peau afin de savoir s'ils étaient capables d'atteindre les couches les plus profondes de la peau : les couches adipeuses.
En connaissant la réalité du passage de ces produits, il semble déjà plus évident de conclure à une éventuelle efficacité.

Le problème semble similaire avec les produits anti-âge qui n'empêchent pas l'apparition des rides et les font encore moins disparaitre.
Concernant ces produits, les laboratoires sont revenus sur leurs propos en modifiant la dénomination de leurs produits.
Aux anciens termes « anti-rides » ont succédé toute une série de termes prometteurs : « anti-âge », « coup d'éclat », « tenseur », « raffermissant », « lissant »…
Nous verrons si les actifs ont réellement ces propriétés et s'ils agissent bien au niveau des couches cutanées concernées.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux produits solaires dont l'efficacité n'est plus à démontrer (chacun d'entre nous a pu tester l'exposition solaire avec ou sans crème et constater la différence !!).
Il a paru intéressant de savoir si ces produits largement utilisés (surtout sur les nourrissons et les enfants) pénètrent dans les couches profondes de la peau et ont un éventuel passage systémique.
Si passage il y a, quelles peuvent en être les conséquences ?

1° PARTIE :

PHYSIOLOGIE DE LA PEAU ET SON ROLE DE BARRIERE

I. HISTOLOGIE ET PHYSIOLOGIE

1.1. L'épiderme

La peau est un des organes les plus complexes du corps humain. La surface cutanée varie selon la taille et le poids du sujet et se situe aux environs de 2 m² pour un poids d'environ 3kg (45).
La peau est constituée de trois couches bien distinctes auxquelles sont associées des annexes, tel que les glandes sudoripares et les follicules pilosébacés (35,45).

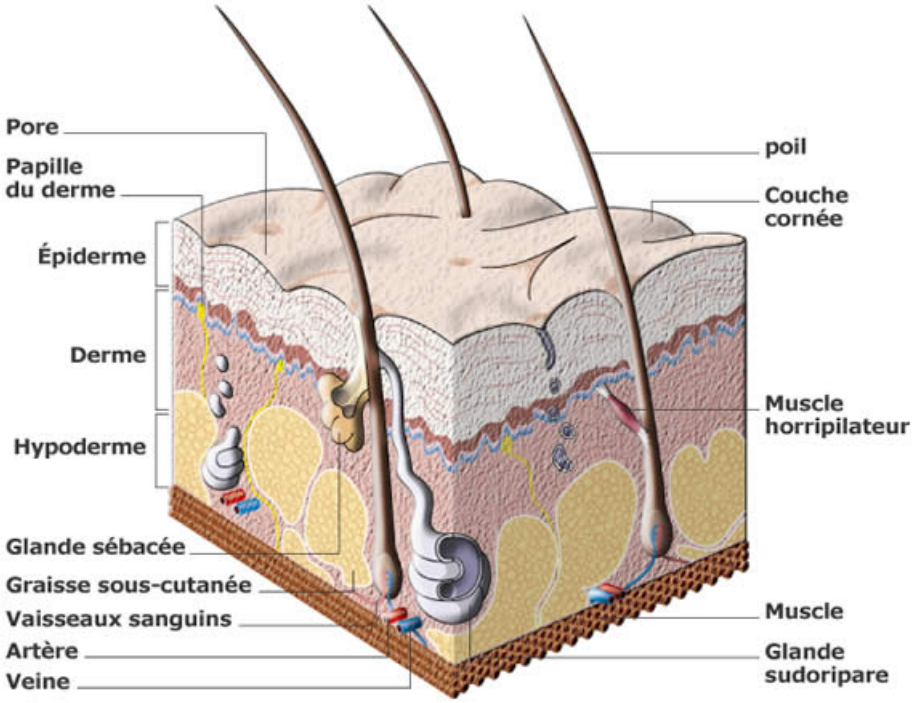


Figure 1 : Schéma de la structure de la peau

(http://www.sante-naturelle.info/Cellulite)

On peut donc distinguer, de l'extérieur vers l'intérieur :

- l'épiderme
- le derme
- l'hypoderme

1.1.1. Structure de l'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé constitué de cellules vivantes : les kératinocytes (ainsi que des mélanocytes, cellules de Langerhans et de Merkel) (4,28,45).

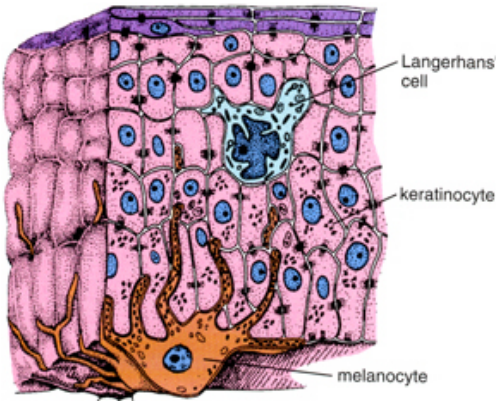


Figure 2 : Les différentes cellules de l'épiderme

(http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/lecture.f04/integument.f04/integumentf04.html)

Son épaisseur varie selon sa localisation : de 0,04 mm pour les paupières jusqu'à 1,6 mm pour la plante des pieds et la paume des mains (45).

Des trois couches constituant la peau, l'épiderme est la seule à ne pas être vascularisée (35).

On peut distinguer au sein de l'épiderme quatre couches cellulaires, de l'intérieur vers l'extérieur :

- la couche basale ou germinative = *stratum germinativum*
- la couche épineuse (corps muqueux de Malpighi) = *stratum spinosum*
- la couche granuleuse = *stratum granulosum*
- la couche cornée = *stratum corneum (26,28,29,35,45)*

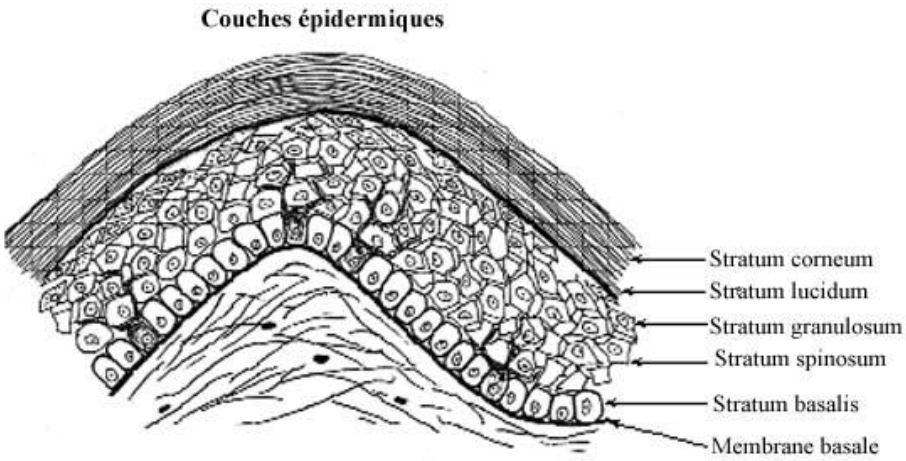


Figure 3 : Couches cellulaires de l'épiderme

(http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/Images/Pageh084.jpeg)

1.1.1.1. Couche basale (germinative) = *stratum germinativum*

Cette couche est formée d'une seule assise de cellules cubiques implantées sur les papilles du derme superficiel, ce sont les kératinocytes. Ces cellules ont la particularité de posséder un appareil de Golgi très développé (29,45).

Le *stratum germinativum* est le siège d'une intense activité mitotique puisque 10% de ses cellules se divisent chaque jour, les cellules qui en dérivent étant empilées par groupes d'environ 10 cellules (45).

Ces cellules, en migrant vers les couches plus superficielles de l'épiderme, deviennent polyédriques, s'aplatissent et finalement, perdent leur noyau pour devenir des cornéocytes, principales cellules constituant le *stratum corneum* (45,46). La différenciation implique pour les cellules la perte de la capacité à se diviser.

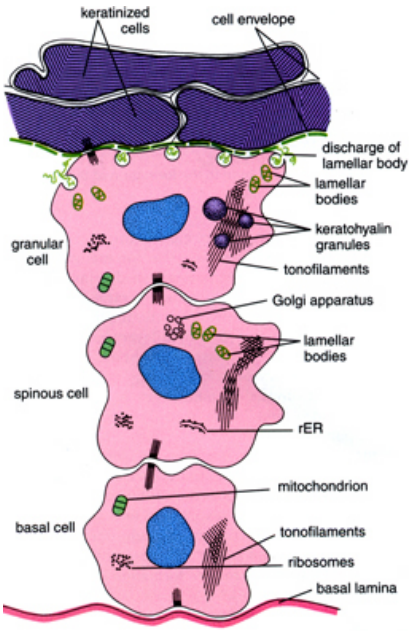


Figure 4 : Cycle de vie et différenciation d'un kératinocyte

(http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/lecture.f04/integument.f04/integumentf04.html)

Le pH de la couche basale est voisin de celui du derme : environ 7,2 et sa teneur en eau est une des plus importante de la peau : 70% environ (45).

1.1.1.2. Couche épineuse (corps muqueux de Malpighi) = *stratum spinosum*

La couche épineuse est formée de 3 à 4 couches de cellules polyédriques reposant sur le *stratum germinativum.* Ces cellules proviennent de la couche basale et migrent vers la couche granuleuse.

Elles sont pourvues de spicules ou épines d'où leur nom de cellules épineuses.

Ces épines sont en fait des desmosomes auxquels s'attachent les tonofibrilles. Toutes ces cellules sont donc solidement attachées les unes aux autres (26,29,35,45,46).

1.1.1.3. Couche granuleuse = *stratum granulosum*

La couche granuleuse comporte environ 3 assises de cellules aplaties, fusiformes et parallèles.
Ces cellules synthétisent :

- les granules de kératohyaline qui contient une protéine riche en cystine (qui contribue à la formation du ciment interfibrillaire) et une protéine riche en histidine, la profilaggrine (précurseur de la filaggrine qui agrège les cellules de la couche cornée entre elles) (35,46).

Ainsi, la kératohyaline a pour fonction de stabiliser les tonofibrilles au niveau des cornéocytes, en contribuant à la formation de la matrice insoluble du *stratum corneum* (45).

- les corps lamellaires (corps d'Odland) ou kératinosomes.

Ces éléments se réunissent aux pôles cellulaires, fusionnent avec la membrane plasmique et déversent leurs lamelles dans les espaces intercellulaires. Ils sont riches en phospholipides, en lipides non polaires et en protéines et contribueraient à former, à la surface externe des lamelles cornées, un ciment intercellulaire.
Egalement très riches en hydrolase, ils pourraient participer à la séparation et à la desquamation des cellules de la couche cornée (26,45).

Remarque : au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds, il existe une couche de 2 assises de cellules située entre la couche granuleuse et la couche cornée. Il s'agit de la couche claire = *stratum lucidum* également appelée couche de transition.

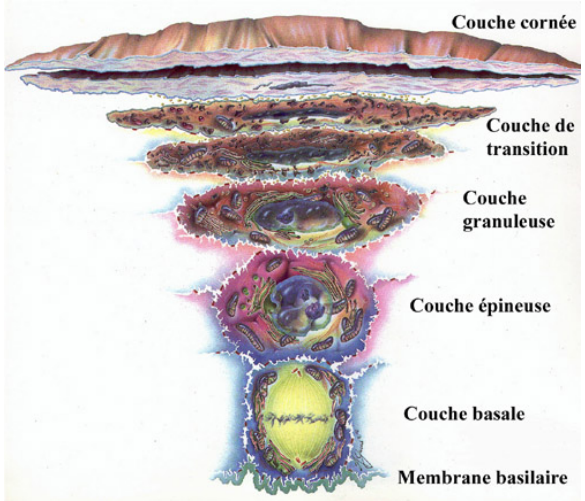


Figure 5 : Couches cellulaires de l'épiderme
(www.theses.ulaval.ca/2005/22895/ch01.html)

Les cellules sont dépourvues de noyaux et d'organites cellulaires mais contiennent de la kératohyaline et des filaments.
Elles renferment une substance semi-liquide, l'éléidine, qui jouerait un rôle dans l'élaboration de la kératine palmo-plantaire (45).

1.1.1.4. Couche cornée = *stratum corneum*

La couche cornée est une superposition de cellules anucléées et complètement kératinisées, les cornéocytes, formant des lamelles très allongées (45).
Son épaisseur est d'environ 10 µm sauf au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds où il est environ 10 fois plus épais (1).
La membrane cellulaire persiste, devient plus dense, s'épaissit et est recouverte d'une couche lipidique dans l'espace intercellulaire (45).
La cohésion des cellules entre elles est permise grâce au ciment intercellulaire, constitué d'un mélange d'acides gras polyinsaturés, de cholestérol et de céramides (35).
La liaison entre les membranes cellulaires et le ciment est permise par des liaisons covalentes et les cornéodesmosomes (1,46).
Les lipides constituant le ciment intercellulaire sont sécrétés par les corps d'Odland à l'interface *stratum granulosum-stratum corneum* et sont disposés en couches parallèles aux membranes cellulaires (1,46).

Le stratum corneum peut donc être représenté schématiquement comme un « mur de briques » contenant des cellules protéiques hydrophiles entourées d'un ciment lipophile lié de façon covalente aux protéines de la membrane cellulaire (4,46).
85% des protéines de cornéocytes sont représentés par la kératine.
Le nombre de couches cellulaires est très variable selon la région : généralement de 15 à 20 couches, ce nombre peut atteindre plusieurs centaines au niveau de la région palmoplantaire (45).

Au niveau du *stratum corneum*, on peut encore distinguer 2 couches distinctes :

- le *stratum compactum* : couche compacte dont les cellules kératinisées sont étroitement liées par le ciment intercellulaire et par des desmosomes (maintenant transformés en cornéosomes).
- le *stratum disjunctum* : couche superficielle, beaucoup plus lâche, où a lieu la desquamation. Il y a une nette diminution du nombre de cornéodesmosomes (26,29,35,45,46).

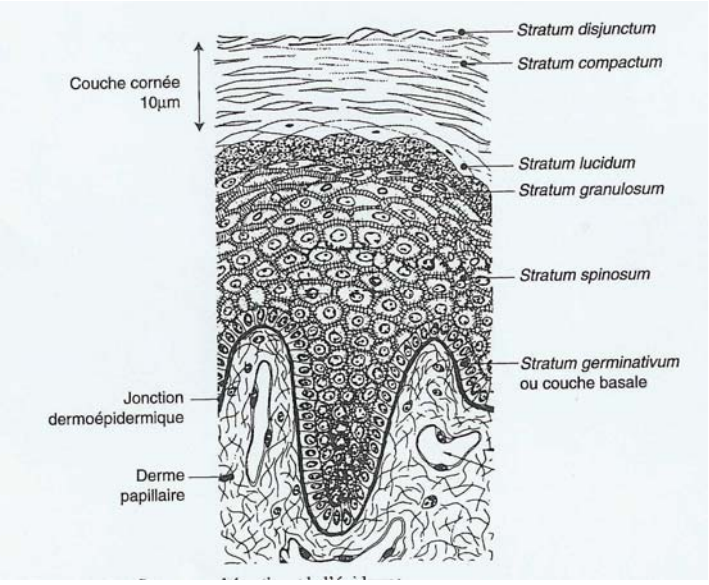


Figure 6 : Structure schématique de l'épiderme et détail de la couche cornée

(Martini, 2003)

Le mécanisme le plus probable concernant la desquamation serait que les kératinosomes fournissent les enzymes nécessaires (dont des hydrolases et des enzymes protéolytiques trypsine et chymotrypsine-like) et déversent leur contenu dans les espaces intercellulaires. Ceci participerait à la dégradation du ciment intercellulaire et d'une protéine permettant la liaison entre les cornéosomes : la cornéodesmosine (35,45).

Les cellules n'auraient plus aucune cohésion entre elles et seraient éliminées de la surface de la peau grâce aux frottements, à la transpiration…

Le *stratum corneum* est complètement renouvelé tous les 15 jours (1,45).

Le pH du *stratum corneum* varie entre 4,2 et 6,8, ce qui confère à la peau ses propriétés antibactériennes et antifongiques (35,45).

La teneur en eau est faible (10%) mais est permise grâce au facteur naturel d'hydratation = NMF (Natural Moisturizing Factor), mélange de substances hygroscopiques qui ont la propriété de retenir l'eau (29,45).

Le *stratum corneum* est recouvert d'un film hydrolipidique, constitué d'eau et d'acides gras provenant de la sécrétion sébacée, de la sueur et des produits de dégradation des kératinocytes (29,35).

1.1.1.5. Cellules de l'épiderme

L'épiderme comprend 4 types de cellules ayant chacune une structure et des fonctions bien précises :

- les kératinocytes : éléments cellulaires dominants de l'épiderme (80% des cellules épidermiques), ils ont une forte activité mitotique au sein de la couche basale de l'épiderme.

Ils renferment des filaments de kératine.

Au fur et à mesure de leur migration vers les couches superficielles, ils s'aplatissent, perdent leur noyau et leurs organites pour se transformer en cornéocytes (4,45).

Ils ont donc pour fonction principale la kératinisation.

- les mélanocytes : ces cellules sont situées au sein de la couche basale et s'intercalent entre les kératinocytes.

Elles insinuent leurs dendrites entre les kératinocytes et leur transmettent des granules pigmentaires qu'elles sécrètent : les mélanosomes (1,26,35,45).

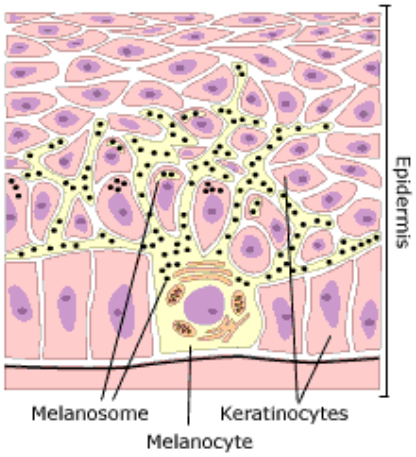


Figure 7 : Schéma d'un mélanocyte

(http://www.hhmi.org/cgi-bin/askascientist/highlight.pl?kw=&file=answers%2Fstructure%2Fans_003.html)

L'ensemble du mélanocyte et des kératinocytes se nomme « l'unité épidermique de mélanisation » (UEM) et cette unité est constituée d'un mélanocyte pour environ 36 kératinocytes (1,26,29,35,45).

Les mélanocytes sont ainsi responsables de la pigmentation de la peau.

Ils sont au nombre de 800 à 1000 par mm² d'épiderme, leur répartition variant selon la région du corps (26).

- les cellules de Langerhans : situées dans la couche épineuse, elles côtoient les cellules à épines.

Elles représentent 3 à 4% de la population cellulaire épidermique.

Elles comportent un cytoplasme clair, un noyau lobulé et des organites appelés granules de Langerhans.

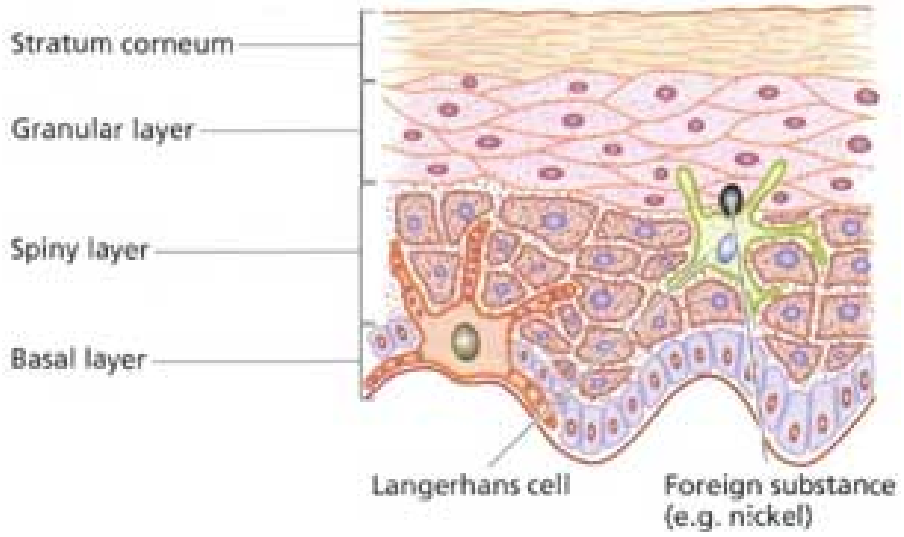


Figure 8 : Couches épidermiques et cellule de Langerhans

(http://www.pg.com/science/skincare/Skin_tws_40.htm)

Elles constituent une population épidermique stable et autonome, se renouvelant par elles-mêmes ; elles sont mobiles et peuvent migrer (45).

A leur surface se trouvent des récepteurs qui ont de nombreuses fonctions dans la réponse immunitaire (phagocytose des complexes immuns et cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)), dans la prolifération cellulaire, la différenciation et la kératinisation (45).

Elles ont des propriétés phagocytaires et enzymatiques et sont chargées de capter les allergènes pour les présenter aux lymphocytes T. Elles déclenchent une réponse immunitaire de type cellulaire ce qui est responsable de l'allergie de contact de type IV ou hypersensibilité retardée.

Elles peuvent quitter l'épiderme pour migrer dans le derme et générer la réponse inflammatoire et erythémateuse caractéristique de l'allergie de contact (35).

Les cellules de Langerhans jouent probablement un rôle dans certaines dermatoses à index mitotique rapide comme le psoriasis (45).

- <u>les cellules de Merkel :</u> elles sont présentes dans la couche basale et dispersées entre les kératinocytes.

Ces cellules sont assez rares et ne représentent que 1% des cellules épidermiques (35).

Elles sont associées aux terminaisons nerveuses et l'ensemble forme les disques de Merkel (45).

Ainsi, elles agissent comme des récepteurs sensitifs : elles enregistrent les stimuli vibratoires qu'elles transmettent à la terminaison nerveuse avec laquelle elles sont en rapport (35).

De plus, ces cellules épithéliales sont également neuroendocrines puisqu'elles produisent des neuromédiateurs et hormones tout en exprimant des cytokératines ou l'antigène de membrane épithéliale (35).

Certains travaux montrent que ces cellules participent à la mise en place du muscle arrecteur du poil ainsi qu'au développement des glandes sudorales eccrines, des follicules pileux, des ongles et des nerfs de la peau (26).

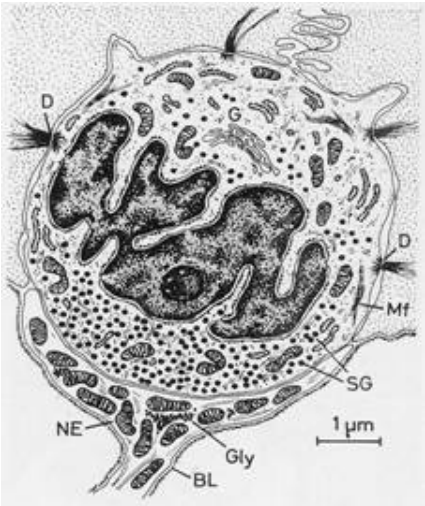


Figure 9 : Cellule de Merkel

(FREINKEL, 2001)

1.1.2. La kératinisation

L'épiderme est en renouvellement constant pour compenser les cellules qui desquament. Au niveau de la couche basale, il y a une synthèse permanente de kératinocytes qui vont ensuite se diviser. Cependant, seulement 10 à 17% de ces cellules seraient en phase de division (45).

La proportion de cellules basales en prolifération pour un temps donné représente la fraction de croissance (45).

Le temps de renouvellement cellulaire varie de 6 à 19 jours (45).

La kératinisation correspond à la différenciation cellulaire et peut être divisée en 2 phases selon le fait que les cellules soient nucléées (kératinocytes) ou non (cornéocytes).

✓La maturation : elle correspond à la migration des kératinocytes de la couche basale où ils sont formés jusqu'à la surface de la couche granuleuse (45,46).

Ces cellules, en migrant, deviennent polyédriques, s'aplatissent et finalement, perdent leur noyau et leur organites pour devenir des cornéocytes, principales cellules constituant le *stratum corneum* (26,35,45).

La cohésion intercellulaire diminue à cause de la destruction des composants du ciment et la diminution du nombre de desmosomes.

Les cornéocytes sont des cellules « mortes » remplies de kératine, protéine fibreuse en hélice α riche en acides aminés soufrés (méthionine, histidine, cystine-cystéine) (4).

Cette phase durerait environ entre 26 et 42 jours selon de nombreux auteurs (45,46).

✓La desquamation : ce phénomène est le reflet de la migration du kératinocyte à travers le *stratum corneum,* pendant une période d'environ 14 jours (1,26,45,46).

Le *stratum corneum* étant constitué d'environ 15 couches, il faut environ 24 heures pour synthétiser une nouvelle couche (46).

On peut distinguer 2 types de kératine :

- la kératine « dure » à teneur élevée en cystine, au niveau des ongles et des poils.
- la kératine « molle » à teneur faible en cystine, au niveau de l'épiderme (4).

La kératine a pour propriété de s'hydrater facilement, ce qui confère souplesse, élasticité et flexibilité au *stratum corneum*.

Elle se présente sous forme de faisceaux de fibres et est issue des tonofilaments synthétisés par les kératinocytes.

Ainsi, la kératinisation permet la synthèse d'éléments indispensables à l'hydratation du *stratum corneum* : ce sont les grains de kératohyaline et les kératinosomes (4).

La kératohyaline est synthétisée par les cellules de la couche granuleuse. Elle est constituée de molécules de profilaggrine transformées en filaggrine au sein du *stratum corneum*. Celle-ci contribue à la formation de la matrice interfibrillaire dans les cellules cornées (4,46).

Elle sera détruite dans les couches superficielles ce qui contribuera à la formation du facteur naturel d'hydratation (NMF) (4,46).

Les kératinosomes ou corps d'Odland contribuent à la formation du ciment intercellulaire qui est le facteur principal de la régulation du flux d'eau physiologique transépidermique (4).

Ainsi, le temps total de renouvellement épidermique correspond au temps de reproduction des cellules germinatives additionné au temps de migration des kératinocytes (maturation) et des cornéocytes (desquamation).
Malgré des divergences entre les différentes estimations, il est raisonnable de penser que ce temps se situe entre 45 et 65 jours (45).

1.1.3. Physiologie du *stratum corneum*

Couche cellulaire constituant la partie la plus externe de l'épiderme, le *stratum corneum* joue un rôle indispensable au sein de la peau de part sa structure et son contact avec le milieu extérieur.
Elle constitue la principale barrière de la peau vis-à-vis des agressions physiques (rayons UV…), chimiques (produits cosmétiques…), mécaniques (coupure, pincement…).
De plus, elle joue un rôle de réservoir des substances appliquées sur la peau et elle participe de façon très active au phénomène d'hydratation de la peau (35).

1.1.3.1. Barrière mécanique

Malgré son épaisseur minime d'environ 10µm, la couche cornée est l'élément protecteur principal de la peau grâce à sa structure particulière (35).
Les cornéocytes, cellules kératinisées et très allongées, se recouvrent entre eux comme les tuiles d'un toit et sont presque totalement deshydratés. La kératine est une protéine hydrophile qui leur confère une résistance très importante (35).
De plus, ils sont recouverts d'une enveloppe protéique qui leur assure protection, imperméabilité et permet l'attachement des filaments de kératine (26).
Ces cellules sont reliées entre elles par un ciment constitué d'un mélange d'acides gras polyinsaturés, de cholestérol et de céramides.
Leur cohésion est de plus assurée par des liens protéiques qui sont les cornéosomes (35).

Ainsi, cette structure compacte et dense va ralentir voire empêcher la diffusion de substances exogènes mais il est important de souligner qu'elle va également ralentir la diffusion de l'eau en provenance des couches externes du derme, ce qui participe à l'hydratation cutanée (35).

Soulignons que pour que cette fonction soit exercée correctement, il est indispensable que le *stratum corneum* soit présent dans toute son intégrité (45).
En effet, diverses expériences montrent que si avec un adhésif on arrache successivement les couches du *stratum corneum* (technique de stripping), la perméabilité de la peau totale augmente.
Il en est de même si l'on procède à des brûlures, frottements ou scarifications (35,46).
Ainsi, il est évident que les muqueuses (yeux, bouche, muqueuse génitales…) constituent des barrières très perméables (45).
Dans le cas d'une peau extrêmement desséchée, elle perd sa souplesse et se craquelle. Ce phénomène est dû à l'altération de la cohésion entre les cornéocytes qui conduit à une augmentation de la perte en eau (la PIE augmente). De plus, on observe une altération dans la constitution des lipides épidermiques. Tout ceci diminue considérablement l'effet barrière de la peau (35,46).

1.1.3.2. Gradient d'hydratation et perte insensible en eau

Une bonne hydratation cutanée est indispensable pour conférer à la peau souplesse, élasticité et une certaine imperméabilité.
On peut distinguer une eau mobilisable (capable de transiter dans les diverses couches épidermiques) et une eau non mobilisable (fortement liée aux molécules biologiques) (1,35).
Le derme est le principal réservoir d'eau de la peau, grâce à des protéoglycanes tel que l'acide hyaluronique, molécules ayant des propriétés hygroscopiques exceptionnelles. Sa teneur en eau est de 80% (35).

De la couche basale à la couche granuleuse, l'épiderme humain contient de 65 à 70% d'eau mais ce taux diminue au niveau du *stratum compactum* où il n'est plus que de 40% (45).
La couche superficielle de la couche cornée (*stratum disjunctum*) ne contient plus quant à elle que 15% d'eau (26,45,46).
Ce gradient est dû à la disparition de constituants ayant la capacité de retenir l'eau : acides nucléiques, protéines et phospholipides (46).

Ce gradient d'hydratation décroissant permet à l'eau libre du derme de diffuser des couches les plus profondes jusqu'aux plus superficielles (4). Le principal chemin de diffusion est représenté par les espaces lipidiques intercellulaires : si par diverses méthodes on altère ces lipides, la perte en eau se trouve alors augmentée (46).
Il existe du derme jusqu'à la surface de la peau, un flux d'eau constant représenté par 2 étapes distinctes : la diffusion de l'eau du derme jusqu'au *stratum corneum*, puis son évaporation à la surface de la peau.

Ce phénomène porte le nom de PIE (Perte Insensible en Eau) ou TEWL (TransEpidermal Water Loss).
La PIE sera le reflet de l'intégrité du *stratum corneum* : une PIE peu élevée reflète une fonction barrière efficace (3,4).
Ce terme de perte n'est pas tout à fait approprié car malgré une évaporation permanente, les pertes sont constamment compensées par la diffusion constante de l'eau provenant des couches profondes.
Ainsi, nous perdons en moyenne 250 à 300 mL d'eau par jour à travers la peau, ce qui correspond à un flux d'environ 5g/cm²/heure (26,35).
La teneur en eau diminue ainsi tout au long de la vie, le *stratum corneum* ne contenant plus que 7% d'eau chez la personne âgée (45).

Pour maintenir une bonne hydratation cutanée, la peau a le pouvoir de :

- diminuer l'évaporation.
- augmenter la fixation de l'eau lors de son passage à travers le *stratum corneum* (35).

L'évaporation est limitée par le ciment intercellulaire. En effet, l'eau, les molécules polaires et les substances lipophiles ne peuvent traverser le *stratum corneum* qu'en passant à travers les espaces intercellulaires.
Les cornéocytes ayant une membrane imperméable à l'eau, celle-ci doit passer à travers un chemin tortueux, sur une distance beaucoup plus importante que l'épaisseur du *stratum corneum* en lui-même (26).

Ce sont les céramides qui, de part leur structure chimique, ont un rôle essentiel dans la régulation du flux d'eau transépidermique. Ces molécules amphiphiles forment des feuillets organisés en bicouches lipidiques ce qui crée une structure lamellaire très stable, renforcée par la présence de longues chaînes carbonées et de liaisons hydrogènes reliant les céramides entre eux (4,26,46).
Le film hydrolipidique recouvrant la surface du *stratum corneum* freine également cette perte en eau (4).

Les cornéocytes sont quant à eux responsables de la fixation de l'eau de part leur richesse en kératine très hydrophile et en facteur d'hydratation naturelle (NMF= Natural Moisturizing Factor), ayant la propriété de retenir l'eau (4,35,45).
Le NMF est constitué d'un mélange de substances hygroscopiques dont le PCA Na (provenant de la cyclisation de l'acide glutamique libéré par la décomposition de la profilaggrine) et les lactates sont les substances les plus hygroscopiques (4,35).
Les lactates, l'urée, les acides aminés et le NaCl proviennent de la sueur eccrine.

CONSTITUANTS	PROPORTION (%)
Acides aminés libres (sérine, citrulline…)	40
Sel de sodium de l'acide pyrrolidone carboxylique ou PCA Na	12
Lactates	12
Urée	7
Cl^-	6
Na^+	5
K^+	4
Ca^{2+}	1,5
Mg^{2+}	1,5
NH_3, acide urique, glycosamine, créatinine	1,5
Phosphates	0,5
Citrates, formiates	0,5
Fraction non identifiée	±10

Tableau 1 : Composition du NMF

(Pruniéras, 1989)

Toute atteinte à la perméabilité de la membrane des cornéocytes (immersions prolongées, eau chaude), aboutirait à une fuite du NMF donc à un dessèchement du *stratum corneum* (1).

1.1.3.3. Rôle de réservoir

Ce rôle est connu depuis 1955, où Malkinson et Ferguson suggérèrent que l'excrétion urinaire lente et continue pendant environ 7 jours de l'hydrocortisone appliquée par voie topique était due à l'existence d'un réservoir épidermique.

En 1963, Vickers démontra que les corticostéroïdes topiques appliqués sous occlusion pendant 156 heures produisent un blanchiment cutané. Après nettoyage de la surface cutanée celui-ci disparaît.

Vickers remarqua alors qu'une simple occlusion sans nouvelle application du produit fait réapparaître son effet vasoconstricteur.

Ce phénomène n'est pas reproductible si l'on injecte le produit dans le derme ou si l'on procède à un stripping (19,45,46).

Ceci prouve bien que le produit est stocké au sein de l'épiderme, l'occlusion empêchant l'évaporation de l'eau qui est retenue au sein des cornéocytes. Ceux-ci deviennent alors hyperperméables et ne jouent plus leur rôle de barrière. Le produit accumulé au sein du ciment intercellulaire peut alors diffuser librement jusqu'aux couches profondes et agir au niveau des capillaires.

Ce phénomène de stockage est extrêmement important pour les substances lipidiques, qui ont une grande affinité pour les lipides du ciment. En effet, les céramides, qui sont des sphingolipides, sont organisés en structures lamellaires capables d'intégrer d'autres molécules à l'intérieur des bicouches (26,35).

Les substances peuvent ainsi rester stockées pendant plusieurs jours, parfois même jusque 15 jours (46).

1.1.3.4. Rôle esthétique

Etant donné que le *stratum corneum* est la couche la plus externe de la peau, c'est donc la plus visible.

Son rôle dans l'esthétique de l'individu est primordial : il est en relation avec sa capacité de desquamation et son état d'hydratation (35).

Le phénomène de desquamation est régulé par la cohésion entre les cornéocytes assurée par le ciment et les cornéodesmosomes (35).

Les cornéodesmosomes sont reliés entre eux par des cadhérines et la cornéodesmosine, elle-même régulée par des enzymes protéolytiques trypsine et chymotrypsine-like (35).

Un excès de desquamation est donc lié à un défaut de cohésion des cellules entres elles, conséquence d'une perte en eau excessive ce qui entraînera une rugosité de la peau, perte d'élasticité, de souplesse, sensation de tiraillement, une peau blanchâtre, écaillée, craquelée donc inesthétique (35).

1.1.3.5. pH cutané

Le pH du derme, situé entre 7,2 et 7,4, se transforme en pH acide aux environs de 4,2 à 6,8 à la surface de la peau (35,45,46).

Cependant au niveau des aisselles, périnée, plis interdigitaux et inter-orteils, le pH est proche de la neutralité (1).

Cette augmentation considérable d'acidité est due aux hydrolases qui génèrent plusieurs acides hydrosolubles (acides urocanique, pyrrolidone carboxylique, lactique) (35).

Ces acides sont issus principalement de la dégradation de la filaggrine qui agrège les cornéocytes entre eux.

Le pH cutané peut être modifié par la sécrétion des glandes sudorales eccrines composée d'acides lactique, undécylénique et urocanique (1,35).

Les acides gras libres du sébum contribuent également à l'acidité de la surface cutanée (35).

Cette acidité est indispensable à la trophicité de la peau. En effet, il a été observé que quasiment toutes les dermatoses s'accompagnent d'une alcalinisation cutanée. Elle représente également un moyen de défense antibactérien et antifongique (1,35,45).

A l'inverse, de faibles augmentations de l'acidité active la prolifération de *Propionibacterium acnes*, bactérie impliquée dans l'acné (1).
Le pH cutané est influencé par plusieurs facteurs : il augmente avec l'âge, l'agression chimique par les détergents et il est plus alcalin chez les femmes (35).

Pour lutter contre les agents chimiques alcalins agressifs pour la peau, celle-ci possède un pouvoir tampon efficace. Il permet ainsi de rétablir le pH initial de la peau environ 2 heures après le contact, mais des agressions répétitives vont finir par altérer l'efficacité de ce système (35).

Le pH va également avoir une influence sur l'absorption cutanée. En effet, il a une influence directe sur le degré d'ionisation des substances chimiques qui seront au contact de la peau et seule la forme non ionisée est capable de pénétrer à travers la peau (45,46).
Ceci s'explique par le fait que l'ionisation augmente la solubilité dans l'eau et diminue ainsi l'affinité du principe actif pour le *stratum corneum* (35).

Le *stratum corneum* a donc un rôle physiologique indispensable, son absence conduisant à une fuite d'eau et de liquides extracellulaires ainsi qu'à la pénétration des rayons UV, à des agressions chimiques ou physiques, mettant en jeu le pronostic vital.

1.2. Jonction dermoépidermique

Cette structure particulière permet l'adhérence entre le derme et l'épiderme. Elle se trouve aux frontières de deux tissus, l'un épithélial, l'autre conjonctif.
Cette couche mince située sous la couche basale est constituée de la membrane basale (formée par les membranes plasmiques des cellules basales) et de plusieurs couches de substances dermiques telles que glycoprotéines, collagène de type IV, fibronectine (35).
Elle est traversée par les annexes de la peau.
Chez les peaux jeunes, l'ensemble couche basale/jonction dermoépidermique a une structure ondulée en raison des papilles dermiques qui s'imbriquent dans l'épiderme, ce qui augmente considérablement la surface de contact (4,46).
De plus, la présence d'un système de fibres élastiques sous-jacent lui assure des fonctions de support élastique de l'épiderme (4).
Au cours du vieillissement, cette structure s'aplatit et la peau se distend (35).

Elle assure la cohésion dermo-épidermique en jouant un rôle d'ancrage pour les cellules de la couche basale de l'épiderme ; elle permet la diffusion contrôlée des nutriments en provenance des vaisseaux sanguins ainsi que des échanges de type cellulaire (processus de cicatrisation, inflammatoires ou immunologiques) (28).

1.3. Le derme (29,35,45)

Il s'agit d'un tissu conjonctif fibro-élastique composé de cellules, les fibroblastes, (ainsi que des macrophages, lymphocytes, polynucléaires éosinophiles) et d'une matrice intercellulaire.
La matrice est formée de protéines fibreuses (collagène, élastine, réticuline) et d'un gel interfibrillaire composé de protéoglycanes, glycoprotéines, sels et eau.
Le derme comprend également d'importantes ramifications vasculaires, un vaste réseau nerveux et des annexes cutanées.
Son épaisseur varie considérablement selon le sujet et la région mais on pense qu'elle est comprise entre 1 et 4mm.
Il assure à la peau souplesse, hydratation, nutrition et élasticité (46).

1.3.1. Derme superficiel = adventiciel = papillaire

Il représente 1/5 de l'épaisseur totale du derme (4).
Cette zone est formée de tissu conjonctif lâche composé de fines fibres de collagène de type I associé au type III, souvent orientées vers la membrane basale dermo-épidermique.
Sont également présentes des fibres élastiques dirigées verticalement dans les papilles dermiques (45).
Une grande densité de fibroblastes permet une activité métabolique intense et la synthèse des nombreux protéoglycanes.
Par conséquent, le derme papillaire contient une plus grande proportion de gel interfibrillaire que le derme réticulaire (45). Son épaisseur varie de 50 à 200 µm (1).
Dans cette zone du derme, on retrouve un vaste réseau sanguin et lymphatique assurant la nutrition des épithéliums sus-jacents ainsi que les échanges hormonaux (1).
Il contrôle en partie l'absorption percutanée grâce au débit sanguin et lymphatique (1).
Il exerce une fonction architecturale, héberge l'essentiel des terminaisons nerveuses responsables de la fonction sensorielle de la peau (1).
Il contribue à la fonction immunitaire de la peau en permettant le transit des cellules immunocompétentes (1).

1.3.2. Derme réticulaire

Il représente les 4/5 de l'épaisseur totale du derme (4).
Il se distingue du derme papillaire par un tissu conjonctif dense, constitué de fibres grossières d'élastine, de faisceaux de collagène de type I parallèles à la surface cutanée et d'une faible quantité de gel interfibrillaire (4,45).
C'est un tissu pratiquement dépourvu de cellules et sans vascularisation, d'une épaisseur de 750 µm à 3mm (45).
Il héberge les annexes cutanées (1).

1.3.3. Cellules du derme

Les principales cellules constituant le derme sont des fibrocytes, dénommés fibroblastes lorsqu'ils reprennent une activité proliférative (45).
Les fibrocytes (B) sont des cellules plus fusiformes, ayant un noyau plus condensé, un cytoplasme moins abondant et plus pauvre en organites que celui des fibroblastes (A).
Le fibroblaste est une cellule étoilée qui émet de nombreux prolongements cytoplasmiques en direction des cellules adjacentes. La richesse de son cytoplasme en organites lui permet la synthèse de protéines actives exportables (http://homepage.mac.com/danielbalas/teaching.html).
Ce sont des cellules fusiformes qui synthétisent des protéines et protéoglycanes.

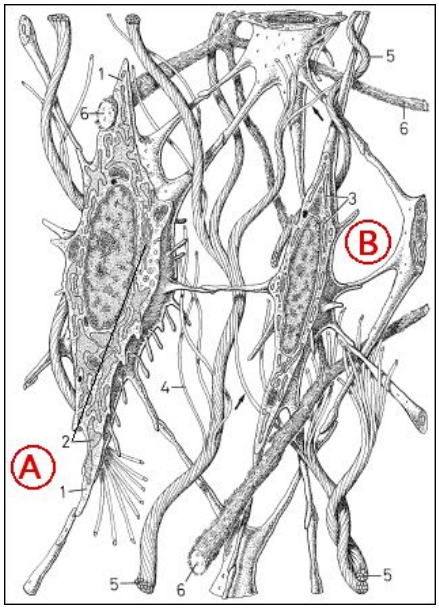


Figure 10 : Fibroblaste (A) et fibrocyte (B)
(http://homepage.mac.com/danielbalas/HISTOLOGIE/HISTGENE/histgen1/histgen2/histgen2b.htm)

Les autres cellules (histiocytes, mastocytes…) ont un rôle de défense et sont impliquées dans les processus inflammatoires et de cicatrisation (29,45).

1.3.4. Protéines

Elles sont synthétisées par les fibroblastes et sont de natures diverses :

- collagène : c'est quantitativement la plus importante de toutes les protéines de la peau puisqu'elle représente environ 70% du poids sec de la peau.

Sa principale fonction est de maintenir la résistance et l'intégrité structurale des tissus.

La molécule de base, appelée tropocollagène est composée de trois chaînes polypeptidiques (chaînes α) enroulées autour d'un axe central. Cet ensemble forme alors une superhélice qui correspond aux fibres de collagène.

Chaque chaîne contient environ 1000 acides aminés, répartis en triplets, un triplet étant constitué d'une molécule de glycine, proline et hydroxyproline.

Il existe 7 types de collagène différents ; dans le derme, on trouve surtout :

- Collagène de type I (pauvre en OH-lysine) : au niveau du derme réticulaire.
- Collagène de type III (riche en OH-proline) : au niveau du derme papillaire, associé au type I.
- Collagène de type IV (riche en OH-lysine) : constituant des membranes basales de la jonction dermoépidermique (45).

Spontanément, les molécules de collagène I sont polymérisées en fibrilles puis en fibres striées qui se groupent en faisceaux, eux-mêmes s'organisant en réseaux tridimensionnels plus ou moins complexes.

Initialement, la cohésion entre molécules de collagène est due à des liaisons faibles instables en solution saline à pH neutre : c'est le collagène natif neutro-soluble. Lors de la maturation, des pontages intra et intermoléculaires vont se mettre en place.

Chez l'enfant et l'adulte jeune, on trouve un collagène natif acido-soluble qui est extensible, souple, élastique et a une grande capacité de rétention d'eau.

Chez l'adulte, apparaît une insolubilisation progressive et une augmentation de la résistance mécanique des fibres : c'est le collagène natif fibreux insoluble (4).

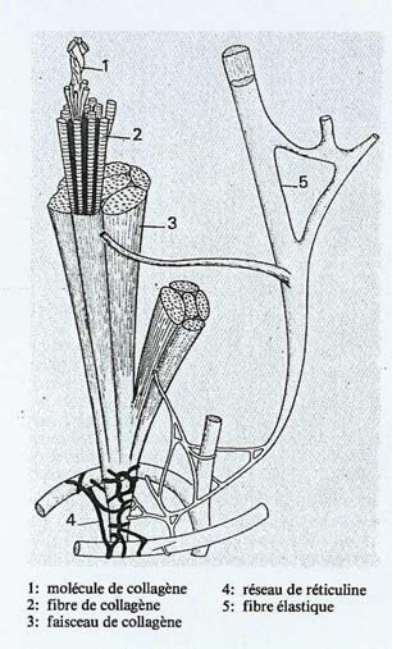


Figure 11 : Fibres du derme

(Pruniéras, 1981)

- <u>élastine :</u> macromolécule s'organisant en faisceaux essentiellement localisés dans la couche papillaire du derme (35). Les fibres sont constituées d'une charpente de glycoprotéines incluse dans un ciment amorphe protéique : l'élastine (4).

Elles diffèrent du collagène par leur faible teneur en OH-proline mais surtout par la présence de desmosine et isodesmosine, acides aminés caractéristiques de l'élastine.

Ils assurent les pontages entre polypeptides et confèrent aux fibres élastiques une structure tridimensionnelle en filet (4).

Les fibres élastiques ont pour rôle de rétablir la disposition fibreuse normale à la suite d'une déformation par des forces mécaniques externes. En clair, comme leur nom l'indique, elles sont responsables de l'élasticité de la peau (29,45).

Ceci n'est permis que si l'élastine est pontée et que le degré de pontage est suffisant pour permettre le retour à l'état initial après la cessation des forces (45).

Ces fibres s'étendent de la jonction dermo-épidermique jusqu'à l'hypoderme (26).

Des modifications de ces fibres seront observées dans le processus de cicatrisation et dans certaines affections comme l'élastose solaire, le lupus érythémateux ou encore les vergetures (45).

Les fibres oxytalanes sont des fibres élastiques particulières, situées transversalement, par rapport aux autres. Elles sont très fragiles car contiennent peu d'élastine et sont localisées principalement dans le derme papillaire (35).
Les fibres élaunines contiennent quant à elles une plus grande quantité d'élastine que les précédentes et se retrouvent au niveau du derme moyen (4).

- réticuline : protéine regroupée en fibres qui seraient probablement des fibres de collagène très fines (35).
Ces fibres sont présentes au niveau de la jonction dermo-épidermique, à proximité des annexes cutanées, vaisseaux et nerfs, à la fois dans le derme papillaire et réticulaire (45).

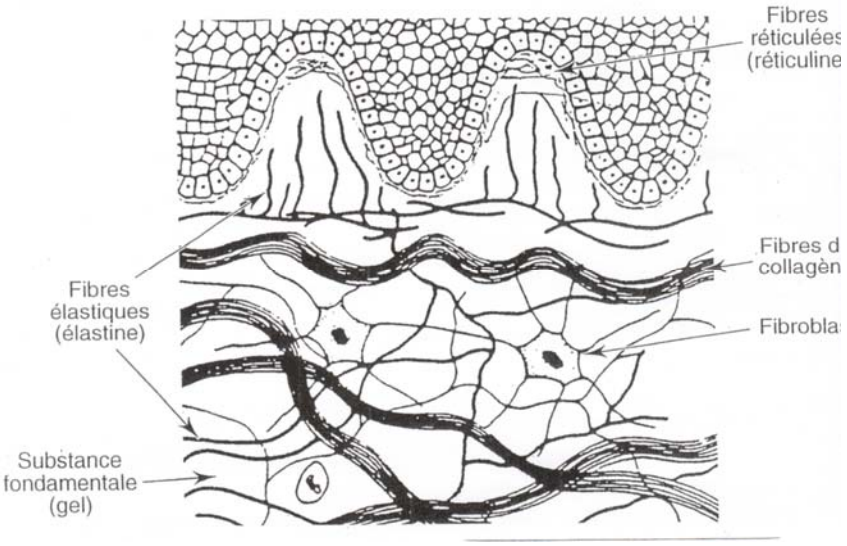


Figure 12 : Fibres du derme
(http://www.scientic.ca/affiche_Article.asp?IdArticle=676&dest=selection)

1.3.5. Gel interfibrillaire

Le gel contient la substance fondamentale (protéoglycanes, glycoprotéines, sels et eau) qui remplit les interstices entre les fibres de collagène et d'élastine et assure la cohésion des fibroblastes (4,45).

- protéoglycanes : ce sont de longues chaînes de glycosaminoglycanes acides (mucopolysaccharides) liées à des protéines porteuses (35,45).
Les principaux glycosaminoglycanes dermiques sont l'acide hyaluronique (50% des glycosaminoglycanes), le dermatane-sulfate, la chondroïtine-sulfate et l'héparane-sulfate (45).

L'acide hyaluronique a un rôle prépondérant dans la rétention de l'eau au sein de la matrice intercellulaire ce qui permet une bonne hydratation et une certaine visco-élasticité du derme. Au cours du vieillissement, une importante diminution de sa teneur est observée (29,45).
De plus, les glycosaminoglycanes forment une gaine autour des fibres de collagène ce qui permet d'éviter leur rapprochement (4).

- glycoprotéines de structure : il s'agit d'une chaîne polypeptidique unie à des molécules glucidiques. Ce qui différencie les chaînons glucidiques des glycosaminoglycanes est l'absence du caractère répétitif des sous-unités (4,45).
Ces glycoprotéines sont représentées par les microfibrilles des fibres élastiques, la fibronectine et la laminine (45).
La fibronectine est synthétisée par les fibroblastes et est responsable de leur ancrage dans la trame fibreuse (45).

1.4. L'hypoderme (tissu sous-cutané)

1.4.1. Structure

C'est un tissu conjonctif lâche qui possède la même structure que le derme mais on observe une prédominance de fibres de collagène, de protéoglycanes et de tissu graisseux ce qui engendre une brusque transition entre ces deux couches (26,35,45).
Il isole le derme des membranes fibreuses enveloppant les parties sous-jacentes profondes telles que les muscles (45).
Dans certaines régions (paupières, verge, scrotum, oreilles…), cette couche cutanée est constituée uniquement de tissu graisseux appelé pannicule adipeux (45).

Le tissu graisseux est divisé en larges lobes adipeux par des cloisons (septa) conjonctives servant de passage aux vaisseaux et aux nerfs destinés au derme. Au niveau des cloisons se trouvent également de nombreux faisceaux de collagène tandis que les fibres élastiques sont plus fines et plus rares que dans le derme (45).
Chaque lobe est à son tour divisé en lobules adipeux arrondis.
Les lobules sont formés de cellules graisseuses, ce sont les adipocytes (45).
Ces cellules se forment à partir des préadipocytes, cellules fusiformes, qui s'arrondissent et se remplissent de gouttelettes lipidiques. Leur fusion engendre la formation d'une vacuole lipidique (35,36).

Les adipocytes produisent des triglycérides et peuvent les emmagasiner en très grande quantité, de telle sorte que le cytoplasme entier peut être de nature lipoïdique (45).

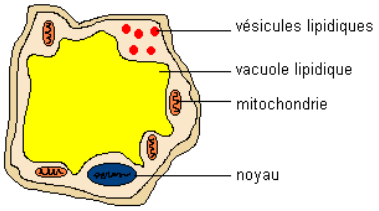


Figure 13 : Schéma d'un adipocyte

(http://bio.m2osw.com/gcartable/cellules/adipocytes.htm)

L'épaisseur de cette couche cutanée est en moyenne de 6,5mm (29,45).
Ce tissu sous-cutané constitue une réserve d'énergie et de nutriments, il modèle la silhouette, assure une certaine protection mécanique aux structures sous-jacentes et joue un rôle essentiel dans le processus de thermorégulation (29,45).

1.4.2. Physiologie

Couche cutanée la plus profonde, c'est un tissu conjonctif lâche essentiellement constitué de cellules graisseuses : les adipocytes (35).
Ces derniers peuvent contenir des gouttelettes de triglycérides, qui seront une source d'énergie importante permettant de s'affranchir des variations quotidiennes des apports énergétiques.
Afin de constituer des réserves d'énergie puis de les restituer par la suite, 2 phénomènes étroitement liés vont se dérouler au sein même des adipocytes : la lipogenèse et la lipolyse.

1.4.2.1. Lipogenèse

C'est une voie métabolique qui permet la synthèse des triglycérides à partir d'acétyl-CoA et de L-glycérol provenant de la glycolyse (28).
Ainsi, les substrats de base à cette réaction sont le glucose et les acides gras circulants qui seront captés par les adipocytes grâce à un système de protéines de transport, nommés GLUT-1 et GLUT-4 pour le glucose (35).
La présence d'acides gras circulants dépend de l'activité des lipoprotéines lipases qui hydrolysent les lipoprotéines circulantes riches en triglycérides pour produire des acides gras (28).

L'entrée du glucose dans l'adipocyte sera activée par l'insuline (35).

Plusieurs facteurs vont favoriser ce phénomène :
- la présence de récepteurs α-adrénergiques sur les adipocytes qui vont inhiber la production d'AMP (adénosine monophosphate) cyclique (molécule impliquée dans l'activation de la lipolyse).
- la présence d'une phosphodiestérase antagoniste de l'AMP cyclique (35,36).
- la présence du neuropeptide Y libéré par les terminaisons nerveuses sympathiques et du peptide YY libéré par les cellules endocrines de l'intestin, freinant aussi la production d'AMP cyclique.
- l'insuline, qui active la phosphodiestérase (35). Ainsi, la lipogenèse prédomine en période post-prandiale, lorsque le taux d'insuline est élevé (36).

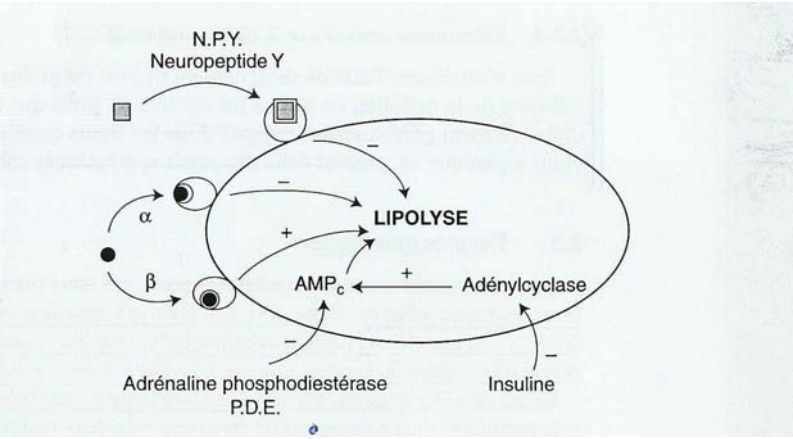


Figure 14 : Facteurs influant sur la lipolyse

(Martini, 2003)

1.4.2.2. Lipolyse

Cette étape correspond au catabolisme des triglycérides stockés en acides gras et glycérol, qui pourront être utilisés par les tissus périphériques comme substrats énergétiques (28,35,36).
Au sein de l'adipocyte, la voie principale qui conduit à la lipolyse est celle qui agit sur l'AMP cyclique et la protéine kinase A (PKA) (28).
La stimulation des récepteurs β-adrénergiques (β_1, β_2, β_3) active la protéine Gs. Ainsi, l'adénosine triphosphate (ATP) intracellulaire est transformée sous l'action de l'adényl cyclase en AMP cyclique.
L'AMPc va stimuler la phosphorylation d'une lipase hormonosensible (LHS) par la protéine kinase A (PKA) ce qui va lui permettre d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides et acides gras libres.
Puis les diglycérides sont ensuite transformés en monoglycérides puis en glycérol (28,36).

Toute cette cascade réactionnelle peut être inhibée par stimulation des récepteurs α_2-adrénergiques qui activent une protéine Gi.

Celle-ci va alors stimuler des phosphatases qui suppriment les phosphates sur la lipase hormonosensible.

Par ailleurs, l'AMPc peut être dégradée en AMP par une phosphodiestérase activée par l'insuline. Ainsi, toute molécule capable d'inhiber la phosphodiestérase conduira à augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc et stimulera la lipolyse (28,35).

Une diminution de la concentration cellulaire d'AMPc orientera donc le métabolisme vers le stockage.

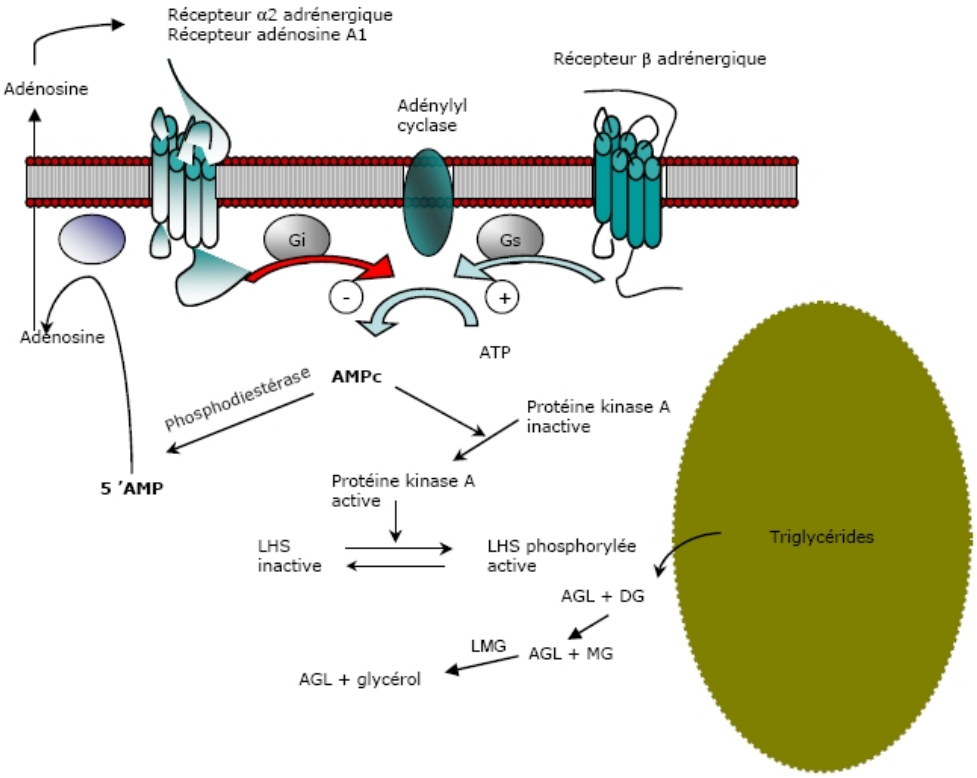


Figure 15 : Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain

(http://docinsa.insa-lyon.fr/these/2006/girotti-chanu/these.pdf)

Les récepteurs cellulaires seront stimulés par deux neuromédiateurs : l'adrénaline et la noradrénaline.

Diverses études ont montré que les catécholamines à faible concentration ont une affinité plus importante pour les récepteurs α_2 que pour les récepteurs β (28).

Ceci implique que les récepteurs α_2 sont impliqués dans la modulation de la lipolyse basale de repos tandis que les récepteurs β interviennent lors d'un exercice physique ou d'une activité entraînant une activation importante du système nerveux sympathique (28).

Dans ce cas, il y a augmentation de la concentration en catécholamines, ce qui stimule les récepteurs β de façon plus importante que les récepteurs α_2 ; il y a alors stimulation de la lipolyse.

Ceci explique bien le phénomène de libération d'énergie à partir des réserves lipidiques lors d'un effort ou d'un stress intense.
La membrane cellulaire de l'adipocyte est également munie d'une forte densité de récepteurs A_1 où se fixe l'adénosine. Etant reliés à une protéine Gi, il est donc évident que l'adénosine inhibe la lipolyse (malgré une faible affinité pour son récepteur) (28).

1.5. Annexes cutanées

Ce sont des invaginations profondes dans le derme, allant jusqu'à l'épiderme. Elles correspondent aux glandes sudoripares et aux follicules pilosébacés (35,45).

1.5.1. Glandes sudoripares

Ce sont des glandes sécrétant la sueur. On les divise en deux types : les glandes sudoripares eccrines et apocrines.

1.5.1.1. Glandes sudoripares eccrines

Anatomie : Elles sont constituées d'un tube sudorifère d'environ 5mm de longueur et 50µm de large, d'un canal excréteur dermique et d'une unité canalaire intra-épidermique (43,45).
Le tube sudorifère forme un peloton à la jonction dermo-épidermique, dont les deux tiers sont constitués d'un tube sécréteur et dont le dernier tiers correspond au canal excréteur.
Ce canal dermique pénètre dans l'épiderme habituellement au niveau d'une crête épidermique interpapillaire. Sa structure se modifie alors profondément en un conduit spiralé se terminant par un pore (45).

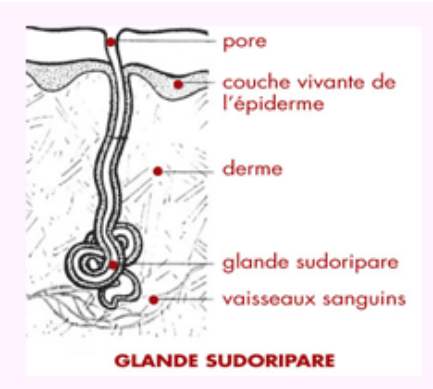


Figure 16 : Schéma d'une glande sudoripare eccrine
(http://www.sweatup.com/default.asp?file=pg20-2_fr)

Physiologie :

Le tube sécréteur fabrique à partir du plasma une sueur primaire, dont la pression osmotique est identique à celle du plasma.

Lors de son passage dans le canal excréteur, la sueur primaire change de composition en raison des phénomènes de réabsorption de sodium qui ont lieu le long du canal intradermique (45).

La sueur excrétée est donc hypotonique (26).

Mais la sueur n'est pas simplement un filtrat de plasma : en effet, certaines substances pénètrent dans le tube sécréteur par un processus de sécrétion actif (3).

Le processus de réabsorption est toutefois limité de telle sorte qu'en cas de sudation intense, les capacités de réabsorption sont débordées et la concentration de la sueur finale en chlorure de sodium augmente proportionnellement avec la quantité de sueur émise (1,26).

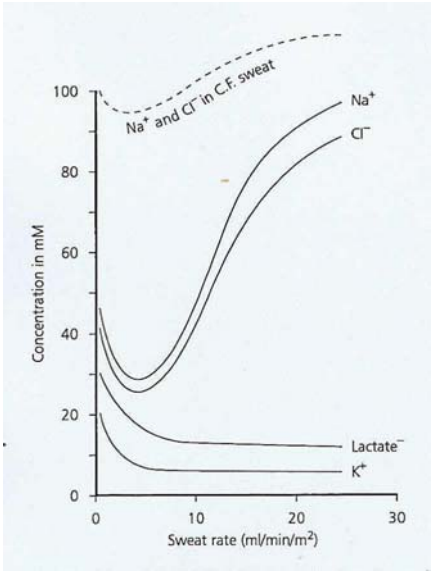


Figure 17 : Relation entre les concentrations en électrolytes dans la sueur et le débit sudoral par m²

(Freinkel, 2001)

Une faible quantité de sueur est sécrétée de façon permanente, c'est la perspiration insensible, qui correspond à une perte d'environ 600mL d'eau sous forme de vapeur (45).

Dès la naissance, la sueur sécrétée est incolore, inodore, fluide et salée. Elle est constituée de 99 à 99,5% d'eau, le reste étant constitué de solides (50% de sels inorganiques dont la plus grande partie est représentée par le chlorure de sodium ; 50% de sels organiques avec en majorité de l'urée).

La sueur contient également du potassium, ammoniaque, acide lactique et des protéines.

Son pH varie de 4 à 6,8 et le débit sudoral peut varier de 1,3L/24h jusqu'à plus de 10L/24h dans des conditions extrêmes (35,45).

La sécrétion de ces glandes est moindre chez les femmes, ceci étant dû non pas à une plus faible proportion de glandes mais plutôt à une activité plus faible chez ces dernières (26).

La sueur eccrine est un des constituants de la partie aqueuse du film hydrolipidique. Elle permet ainsi à la peau de conserver ses propriétés d'hydratation (acide lactique et urée) et d'élasticité.
De plus, elle participe à l'élaboration du NMF (1,35,43,45).

1.5.1.2. Glandes sudoripares apocrines

Anatomie :

Ces glandes sont constituées d'un tube sudorifère plus long et plus épais que celui des glandes eccrines. Celui-ci s'étend jusqu'à l'hypoderme.
Le canal excréteur est court, non spiralé, et se déverse dans l'entonnoir folliculaire au–dessus du canal excréteur de la glande sébacée (45). La sueur sécrétée s'écoule ainsi dans la gaine épithéliale du poil puis à la surface de la peau au niveau des embouchures pilaires.

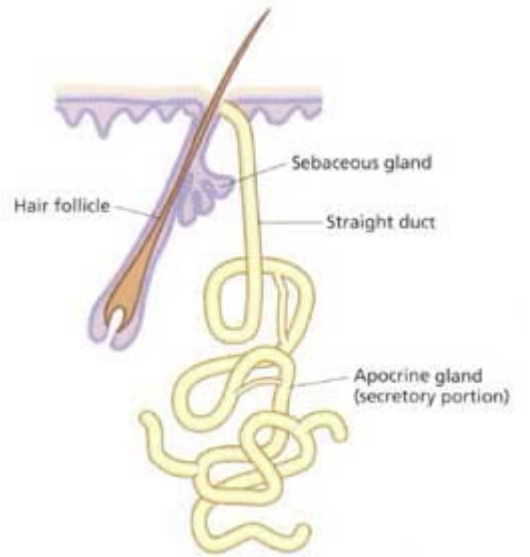


Figure 18 : Structure schématique d'une glande apocrine
(http://www.pg.com/science/skincare/Skin_tws_35.htm)

Physiologie :

Le mode de fonctionnement de ces glandes est peu connu. Il semblerait que la sécrétion de ces glandes soit expulsée avec une partie de la cellule où elle est accumulée.
Leur développement se termine à la puberté, période où elles sont le plus actives (43,45).

Leur sécrétion est minime (0,01mL/24h) et rythmique (45).

La sueur sécrétée est visqueuse, d'apparence laiteuse, riche en cholestérol et acides gras. Elle possède parfois une couleur particulière (brunâtre ou rougeâtre) et peut devenir malodorante sous l'action combinée de l'oxygène de l'air et de sa décomposition en acides gras à chaînes courtes par les enzymes de la microflore cutanée (35,45).

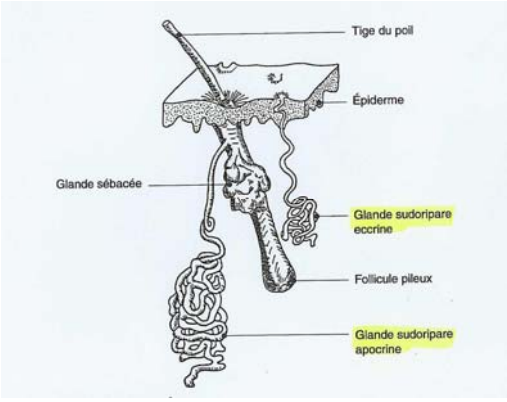


Figure 19 : Annexes cutanées

(Martini, 2003)

1.5.2. Follicules pilosébacés

Ces structures correspondent à l'association d'un follicule pileux avec une ou plusieurs glandes sébacées. Ces structures sont toujours associées à un muscle horripilateur ou arrecteur, ce qui constitue l'appareil pilosébacé (45).

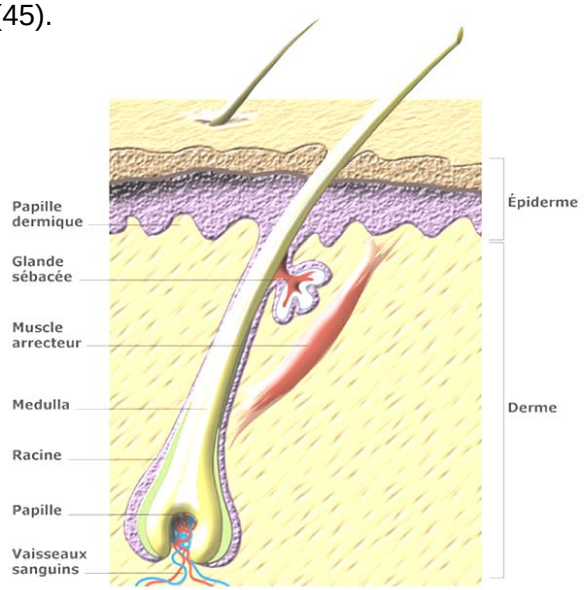


Figure 20 : Schéma d'un follicule pilosébacé

(http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doschim/imgArt/cheveux/racine.html)

1.5.2.1. Structure et physiologie de la sécrétion

Le follicule pileux correspond à une invagination de l'épiderme dans le derme. Il est composé d'un orifice externe appelé *ostium*, d'un entonnoir formé par les couches de l'épiderme et du derme (acro-infundibulum et infra-infundibulum), d'un canal se rendant jusqu'à l'hypoderme. Il se divise en 2 gaines épithéliales externe et interne (45).

La racine du poil correspond à la partie centrale.

La papille dermique est une structure hautement vascularisée, constituant l'élément nourricier du poil (45).

De plus, cette papille produit sans cesse des cellules dont l'empilement et la kératinisation donnent naissance au poil (45).

Le poil est une structure kératinisée composée d'une tige (au-dessus de l'épiderme), renflée à la base (bulbe).

La glande sébacée est située dans le derme moyen, c'est une glande de type holocrine, c'est-à-dire que le produit de sécrétion est excrété avec les cellules qui le contiennent. Cette glande multiacineuse est munie d'un canal excréteur qui déverse le sébum vers l'extérieur le long du canal pileux (1,35,46).

Il s'écoule ensuite dans les sillons principaux de la surface cutanée et imprègne les espaces intercellulaires du *stratum disjonctum* (1).

La glande contient des cellules périphériques, contenant de nombreux tonofilaments, et des cellules centrales, volumineuses, contenant des vacuoles lipidiques (26).

Les glandes les plus volumineuses et les plus productrices sont localisées au niveau du visage, de l'abdomen et du dos (45).

Lorsqu'elles sont peu nombreuses, les glandes ont tendance à avoir une structure unilobulaire tandis que dans les régions où elles sont nombreuses, leur structure est multiacineuse (26).

1.5.2.2. Composition et rôle du sébum

Mono-, di- et triglycérides	57,5%
Acides gras libres	10-25%
Cires et esters supérieurs	26%
Squalène	12%
Cholestérol estérifié	3%
Cholestérol libre	1,5%

Tableau 2 : Composition du sébum

(Martini, 2003)

Le sébum véritable est le produit de sécrétion de la glande sébacée mais ce que l'on prélève sur la peau est en réalité un mélange de : - sébum transformé (une partie des triglycérides serait hydrolysée par des lipases bactériennes en acides gras libres et une grande partie du cholestérol est estérifié par *Staphylococcus epidermidis*).

- cellules cornées desquamées de l'épithélium infundibulaire et du canal sébacé.

- colonies bactériennes et fongiques (1,43,45).

Ainsi, se différencient les termes de sécrétion sébacée qui correspond au sébum véritable, et d'excrétion sébacée qui correspond au sébum modifié (1,43,45).
Des analyses de la composition du sébum ont montré que lors d'une baisse de sécrétion, sa composition s'enrichit en cholestérol (d'origine épidermique) et inversement, la proportion de squalène augmente lors des phases séborrhéiques.

Le sébum, de part ses propriétés physico-chimiques, a plusieurs rôles :

- Lubrification du poil (1).

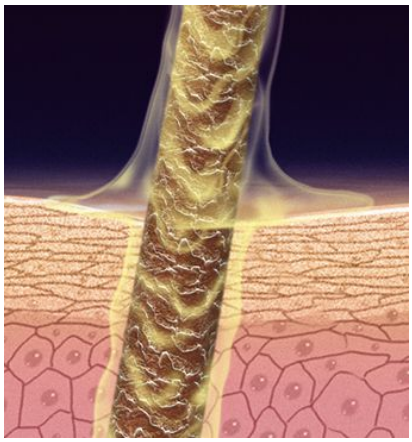


Figure 21 : Schéma d'un poil englué dans le sébum
(http://www.scf-online.com/english/24_e/frontpage_24_e.htm)

- Bactério- et fongistatique par maintien de l'acidité du pH cutané grâce à ses acides gras libres (1,45).
- Protection, souplesse et hydratation de la peau en participant à l'élaboration du film hydrolipidique (1,26,45).

L'élévation de la température cutanée augmente l'humidité du *stratum corneum* grâce à la sudation et l'accroissement de la Perte Insensible en Eau (Transepidermal Water Loss = TEWL).
Ceci faciliterait l'étalement du sébum sur la peau ce qui permet une sécrétion plus abondante.

1.6. Vascularisation

1.6.1. Architecture

La vascularisation cutanée est assurée par un système artério-veineux et lymphatique. Elle est indispensable à la nutrition des structures avasculaires comme l'épiderme ou encore les annexes (1,46).

Les artères sous-cutanées traversent l'hypoderme et forment, au niveau de la jonction derme/hypoderme, un réseau irrégulier et anastomotique dénommé plexus sous-dermique.
De ce plexus émanent des collatérales jusqu'au derme destinées aux glandes sudoripares et follicules pilosébacés, ce sont les artérioles (35,45).
Elles s'étalent dans le derme papillaire pour former le plexus artériel sous-papillaire. Plusieurs artérioles forment les anses capillaires d'où partent les capillaires artériels (35,45).

Les veines sont positionnées parallèlement aux artères et forment les mêmes plexus : les veines sous-cutanées forment le plexus dermique profond puis les veinules qui en émanent forment le plexus veineux sous-papillaire (35).
Dans les papilles dermiques, le réseau artériel est ascendant alors que le réseau veineux est descendant (4).

Ces vaisseaux ont la particularité d'être entourés de fibres musculaires lisses pour les plus profonds et de péricytes pour les plus superficiels ce qui leur confère une contractilité et une résistance mécanique importante (1).
Les voies lymphatiques, parallèles aux voies veineuses, créent un plexus sous-dermique uni par des vaisseaux communicants à un plexus sous-papillaire (45).
Le flux global diminue peu avec l'âge même si l'on observe une régression vasculaire en surface chez le vieillard (1).
Il joue un rôle considérable dans l'évacuation des déchets macromoléculaires ne pouvant être éliminés par voie sanguine (35).
Il contrôle la pression osmotique notamment en cas d'oedèmes (45).
Enfin, en cas d'inflammation, il draine les médiateurs inflammatoires (45).

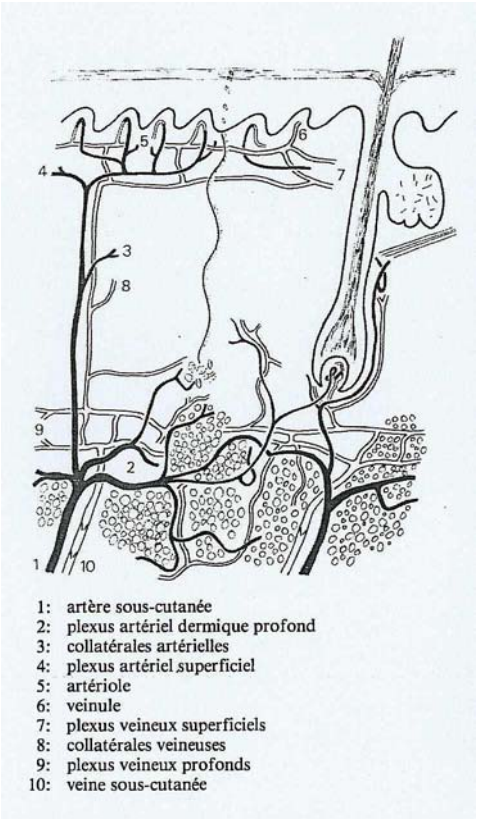


Figure 22 : Vascularisation cutanée

(Pruniéras, 1981)

1.6.2. Variations selon la localisation et l'âge

La tête et les extrémités se distinguent par une densité vasculaire particulièrement élevée.

A la microcirculation assez riche et homogène du nouveau-né, fait suite une régression vasculaire, surtout en surface, aboutissant à un teint plus terne.

Cependant, le flux global diminue peu (1).

1.7. Innervation

Elle concerne le derme et l'épiderme, ce dernier ne recevant toutefois que des terminaisons nerveuses sans renfermer de réseau de nerfs (35).

1.7.1. Végétative

Egalement appelée innervation motrice, elle innerve principalement les annexes cutanées et les vaisseaux sanguins.
Elle est attribuable aux fibres sympathiques du système nerveux autonome. Elles sont amyélinisées et issues des chaînes sympathiques paravertébrales (35,45).

1.7.2. Sensitive

L'innervation sensitive est à la base du sens du toucher.
A l'origine, les axones sensitifs sont issus des ganglions sensitifs rachidiens ou crâniens.
Ils sont myélinisés dans le derme et amyéliniques dans l'épiderme.
Au niveau du derme profond, ils constituent un plexus d'où les fibres nerveuses montent vers la surface pour en former un deuxième à la jonction des dermes réticulaire et papillaire.
Ces fibres forment ensuite plusieurs sortes de terminaisons : libres (au niveau des poils et des glandes sébacées), dilatées (poils) et corpusculaires (visage, mains, pieds, organes génitaux).

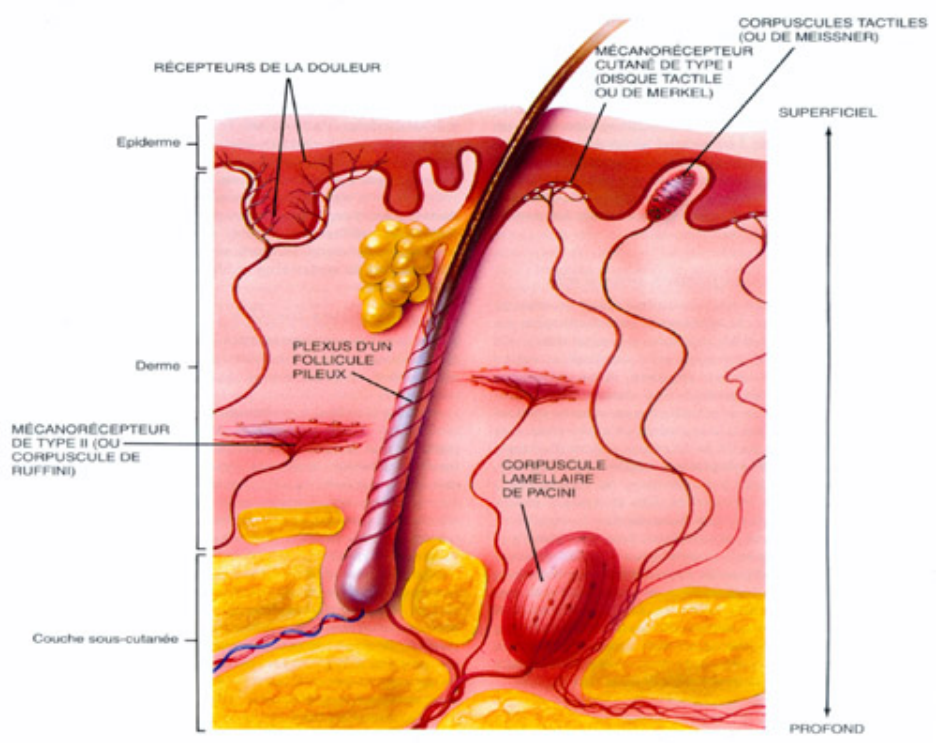


Figure 23 : Innervation de la peau

(http://www.theses.ulaval.ca/2005/22895/ch01.html)

1.8. Flore cutanée

La peau est colonisée, peu après la naissance, par des bactéries, levures, champignons, dont le nombre et la nature varient au cours de l'avancée en âge.
La flore cutanée du jeune enfant se compose de *Staphylococcus albus* et *aureus*, de streptocoques, de corynébactéries, d'*Escherichia coli*.
Chez l'adulte, la flore résidente est surtout composé de bactéries Gram + : *Staphylococcus epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, corynébactéries, *Propionibacterium acnes*, *P.granulosum*, *P.avidum*.
La flore cutanée fongique est moindre par rapport à la flore bactérienne. On retrouve surtout : *Pityrosporum ovale* = *Malassezia furfur*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton*, *Candida albicans*.
Dans certaines circonstances (modification de l'humidité ou du pH cutané, manque d'hygiène, altération de l'épithélium), la population fongique augmente et peut être responsable de mycoses.
Chez le vieillard, on note principalement une augmentation du nombre de *Candida albicans*.

Les zones les plus riches en micro-organismes sont, par ordre décroissant : la main (10^8/cm²), le cuir chevelu, les aisselles, le front, les membres, le dos (10^2/cm²).

Cette flore saprophyte, constituée en partie de germes pathogènes, participe à la défense de la peau. Seule une prolifération exagérée des germes est dangereuse.
A titre d'exemple, une augmentation du nombre de colonies de *Propionibacterium acnes* sera responsable de l'acné (35).

II. FONCTION BARRIERE

Chaque cellule, chaque couche cutanée et tous les éléments constituant la peau vont avoir une fonction et un métabolisme différent, en relation étroite avec leur architecture et leur milieu environnant. Ainsi, différents phénomènes vont être rencontrés au sein de la peau : la pigmentation cutanée ainsi que les phénomènes contribuant à l'effet barrière de la peau vis-à-vis de la pénétration des substances extérieures.

2.1. Le film hydrolipidique

2.1.1. Localisation et composition

Le film hydrolipidique est déposé à la surface du *stratum corneum*, c'est une émulsion eau/huile (4,35). L'eau est représentée par les sécrétions sudorales et les acides gras proviennent de la sécrétion sébacée (96% des lipides), de la sueur et des produits de dégradation des kératinocytes issus de la desquamation (4,35,45).

CONSTITUANTS	PROPORTION (%)	ORIGINE
Triglycérides	43	Sébum +++ Epiderme +
Acides gras libres	16	Sébum +++ Epiderme +
Cires	25	Sébum
Squalènes	12	Sébum
Cholestérol (libre et estérifié)	4	Epiderme

Tableau 3 : Composition de la phase lipophile du film hydrolipidique

(Pruniéras, 1989)

Il est important de souligner que le sébum natif ne contient pas d'acides gras libres : ils proviennent de l'hydrolyse des triglycérides au niveau du canal pilosébacé et à la surface de la peau par des lipases bactériennes (4).

L'ensemble triglycérides+acides gras libres représente environ 60 % du film lipidique et est constant chez tous les individus. Ce qui varie est la proportion de chacun selon l'activité enzymatique bactérienne de *Propionibacterium acnes* (4).
Le cholestérol n'existe qu'en très faible quantité dans le sébum primitif et semble provenir des constituants structuraux de la cellule plutôt que de sa sécrétion. En effet, il a été démontré que le sébocyte est dépourvu d'enzymes nécessaires à la transformation du squalène en cholestérol (4).

2.1.2. Evolution

La composition et la quantité du film hydrolipidique varient avec l'âge :
- le fœtus est recouvert d'une cire, le *vernix caseosa*, qui marque le début de la sécrétion sébacée. Celui-ci disparaît à la naissance et les glandes ne fonctionnent plus jusqu'à la puberté.
- le jeune enfant a une peau relativement sèche car le film est constitué uniquement de lipides cutanés, la sécrétion sébacée étant absente.
- à l'adolescence, le film hydrolipidique a une proportion de plus en plus importante en lipides, liée à l'expansion de la sécrétion sébacée.
- vers 50 ans, s'amorce une diminution progressive de la sécrétion sébacée d'où une modification de la composition du film cutané (35).

2.1.3. Rôles

De part sa composition en acides gras qui lui confèrent un pH entre 5 et 6, il a un rôle dans le maintien du pH acide de la peau (4,35).
Sa composante lipophile crée une barrière à l'évaporation de l'eau et freine ainsi la perte insensible en eau.
Ainsi, il joue un rôle dans l'établissement de la barrière cutanée en freinant également la pénétration de substances hydrophiles (35,45).
En effet, comme nous l'avons vu, les cornéocytes, cellules kératinisées et très allongées, se recouvrent entre eux comme les tuiles d'un toit et sont recouverts d'une enveloppe protéique qui leur assure protection et imperméabilité.
De plus, ces cellules sont reliées entre elles par un ciment lipophile (35).

Ainsi, les substances chimiques ne pourront se frayer un chemin à travers cette structure qu'en ayant la capacité à s'intégrer à la membrane des cellules ou en s'intégrant au ciment lipophile afin de passer entre les cellules.
Ce passage ne sera possible que si la nature physico-chimique de ces substances le permet.

Il intervient dans l'esthétisme de la peau en la rendant lisse (35).
En revanche, il n'a aucun rôle dans la protection contre les rayonnements solaires.
La faible quantité d'acide urocanique contenu dans la sueur est insuffisante pour assurer une absorption convenable des ondes les plus dangereuses (35).

2.2. Pigmentation cutanée

La couleur de la peau résulte de la superposition de 4 couleurs : le jaune des caroténoïdes, le rouge de l'oxyhémoglobine des capillaires dermiques, le bleu de l'hémoglobine des veinules dermiques et surtout le brun de la mélanine des kératinocytes (1,29).
Celle-ci est majoritairement responsable de la pigmentation cutanée, qui s'intensifie sous l'effet des rayonnements solaires, c'est le phénomène de bronzage.

2.2.1. Les mélanines

Il s'agit d'un groupe hétérogène de pigments représenté par deux familles :

- ✓ Les phaéomélanines : de couleur jaune ou rouge, riches en soufre, prédominant chez les sujets roux. Elles sont synthétisées à partir de 2 acides aminés : la tyrosine et la cystéine (1,26,29).
- ✓ Les eumélanines : de couleur noire ou marron, pauvres en soufre, présentes chez les sujets bruns et noirs. Elles sont synthétisées à partir de la tyrosine (1,26,29,43).

La plupart des individus synthétisent les deux familles mais une seule prédomine.
La mélanine est synthétisée par les mélanocytes situés dans la couche basale. Elle se présente sous la forme de particules solides sphériques de 20 à 40 nm de diamètre, ce sont les mélanosomes (1).
La couleur de la peau ne dépend pas du nombre de mélanocytes mais de leur fonctionnement, c'est-à-dire du nombre et de la taille des mélanosomes (26,45).
Les mélanosomes des individus à peau foncée sont plus gros et plus nombreux que ceux des individus à peau claire. Ainsi, la quantité de mélanine synthétisée est supérieure chez les individus à peau foncée (29).

De plus, les mélanosomes contenant la phaéomélanine (appelés phaéomélanosomes) sont sphériques et ont une structure interne mal organisée (26).
Les eumélanosomes sont ovalaires et ont une structure interne lamellaire (26).
Ils sont synthétisés sous forme de prémélanosomes dérivant du reticulum endoplasmique lisse puis subissent une maturation dans l'appareil de Golgi. Ces derniers contiennent un empilement de mélanofilaments où la mélanine sera déposée de manière ordonnée. Les mélanosomes ainsi pigmentés pourront être transférés aux kératinocytes avoisinants (26,29,43,45).

A l'origine de la synthèse de mélanine se trouve une hormone : la POMC (Pro-OpioMélanoCortine).
Elle est sécrétée par la glande pituitaire des mammifères et clivée en MSH (Melanocyte Stimulating Hormon ou Mélanotropine) et ACTH (AdénoCorticoTropin Hormon) par des enzymes appelées proconvertases (26).
L'α et la β-MSH se lient à des récepteurs situés sur diverses cellules. Les récepteurs présents sur la membrane des mélanocytes sont les MC1-R (26).
En se liant au récepteur, la MSH stimule la mélanogenèse (l'α-MSH ne stimulant que la synthèse de l'eumélanine) (26).
Des observations ont montré que les kératinocytes possèdent aussi ce récepteur et semblent donc participer à la réponse induite par la MSH (26).

Après liaison de la MSH, il y a oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénylalanine) par une enzyme, la tyrosinase (26).
Cette enzyme oxyde ensuite la DOPA en dopaquinone (26).
A partir de là, deux voies métaboliques bien distinctes apparaissent, l'une conduisant aux eumélanines et l'autre aux phaéomélanines (où il y a intervention d'une molécule de cystine) (26,43).

D'autres hormones interviennent également dans ce processus :

- les oestrogènes, responsables notamment du masque de grossesse car hypersécrétés durant cette période (26).
- la vitamine D, dont le récepteur se situe dans le cytoplasme des mélanocytes. Elle active la phospholipase qui aide à la formation d'acide arachidonique. Ceci conduit à la formation de prostaglandines stimulant la division des mélanocytes (26,35).
- les leucotriènes, stimulant les mitoses des mélanocytes (26).

Les eicosanoïdes et les interleukines pourraient altérer la formation de mélanine. Etant ubiquitaires au sein de l'épiderme, on leur confère également un rôle dans la réaction inflammatoire post-exposition (26).

2.2.2. Mécanisme de pigmentation

Les mélanocytes transportent les mélanosomes et les transfèrent aux kératinocytes avoisinants grâce aux prolongements cellulaires (dendrites) qu'ils émettent en direction de ces derniers, au sein de la couche basale (1,26,29,35,45).
Les dendrites contiennent de l'actine et des microtubules qui joueraient un rôle dans l'extension dendritique ainsi que dans le mouvement des mélanosomes (26).
Ce phénomène a lieu au sein de l'Unité Epidermique de Mélanisation.

Le transfert des mélanosomes aux kératinocytes s'effectue selon 3 mécanismes :

- par cytophagocytose : le kératinocyte phagocyte l'extrémité du dendrite mélanocytaire.
- par injection directe du mélanosome au kératinocyte par fusion des membranes plasmiques des deux cellules et communication des cytoplasmes.
- par libération du mélanosome dans l'espace intercellulaire puis capture par le kératinocyte (35).

Durant sa migration de la couche basale au *stratum corneum*, le kératinocyte transporte la mélanine. Aucune enzyme connue n'est à ce jour capable de détruire la mélanine.
Celle-ci disparaîtra en même temps que la desquamation des cornéocytes (26).
Par contre, les mélanosomes sont quant à eux entièrement dégradés avant que la cellule n'arrive au niveau du *stratum corneum* (sauf pour les phototypes V et VI où ils desquament avec la cellule) (26).

Après une exposition aux UVB (290 à 320 nm), les mélanocytes sont stimulés et prolifèrent d'où une production accrue de mélanine et sont transfert vers les kératinocytes.
Ces derniers sont eux aussi stimulés et prolifèrent, ce qui a pour effet d'augmenter la concentration en mélanine dans l'épiderme (1).
Les UVB sont donc responsables de la pigmentation tardive ou vrai bronzage. Le hâle débute 2 jours après l'exposition, atteint son maximum vers le 20° jour et disparaît progressivement en l'absence d'une nouvelle exposition (1,26,29,43).
Il s'agit d'une photo-oxydation profonde, enzymatique (45).
La pigmentation survient toujours après une réaction inflammatoire appelée érythème actinique, persistant environ 36 heures (1,45).

Après une exposition aux UVA (320 à 400 nm), on trouve beaucoup de mélanine dans les mélanocytes et les kératinocytes de la couche basale alors que dans le reste de l'épiderme, la concentration en mélanine reste inchangée (1).

Les UVA provoquent une pigmentation immédiate connue sous le nom de phénomène de Meirowski ou IPD (Immediate Pigment Darkening). Elle apparaît dans les minutes qui suivent l'exposition et disparaît en quelques heures (1,26,29,43,45).
Si la dose d'UV délivrée est suffisamment élevée, la pigmentation est intense et persiste plusieurs jours. Il s'agit d'une pigmentation grisâtre, qui est due à une photo-oxydation de la mélanine présente avant la stimulation des mélanocytes ainsi qu'à une modification de la répartition des mélanosomes dans les kératinocytes (1,45).
Avec les UVA, la pigmentation précède la réaction inflammatoire, la dose pigmentante étant inférieure à la dose erythémateuse. Les UVA déclenchent donc un bronzage sans coup de soleil (1).
Celui-ci s'estompe progressivement 1 à 4 semaines après la fin de l'exposition (1).
La pigmentation immédiate n'a pas d'action protectrice vis-à-vis de l'érythème actinique dû aux UVB, pouvant même faciliter l'apparition d'un érythème par un phénomène de photo-addition (1).

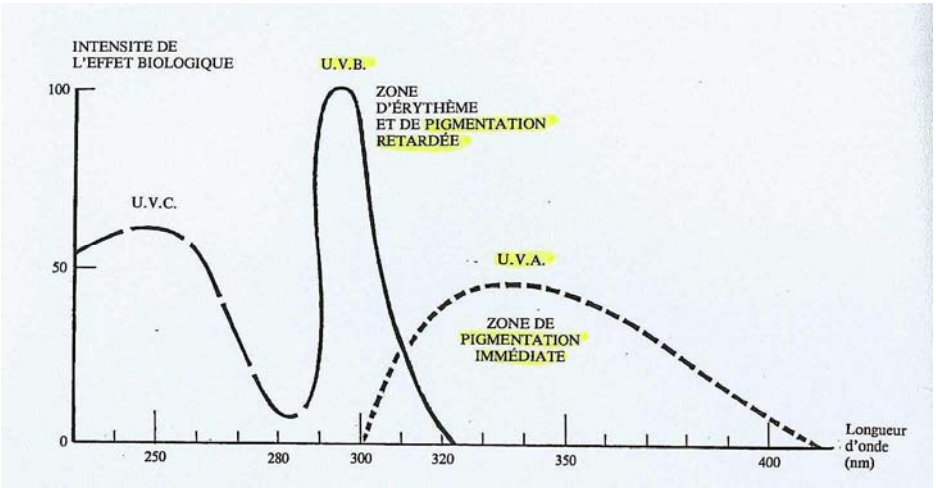


Figure 24 : Radiations UV

(Robert, 1985)

La lumière visible provoque aussi une hyperpigmentation sans réaction inflammatoire mais cette dernière n'apparaît qu'après exposition à de fortes doses de rayonnements (1).

La pigmentation correspond en fait à un mécanisme de protection naturelle des cellules contre l'effet néfaste des rayonnements UV. Le facteur de protection solaire de la mélanine est de 1,6 à 2, c'est-à-dire qu'elle est capable d'absorber 50% des rayonnements solaires (26).
Mais pour que cette protection soit réellement efficace, il faut que la mélanine absorbe le rayonnement et se situe au-dessus de l'emplacement de l'ADN, principale cible des UV.

Ceci s'observe bien au microscope, où l'on peut voir les mélanosomes regroupés et formant une sorte d'ombrelle au-dessus du noyau du kératinocyte (1,26,43).

Les preuves de ce rôle photoprotecteur ont été bien établies : l'incidence des cancers de la peau des zones découvertes est nettement plus faible chez les individus dont la peau est pigmentée que chez ceux à peau claire ; la dose minimale provoquant un érythème d'une peau très claire est plus basse que celle d'une peau mate…(1).

C'est la photoprotection naturelle induite progressivement qui est la plus efficace contre les UVB avec le paradoxe qu'un bronzage efficace permet une exposition solaire plus importante donc des effets néfastes à long terme (1).
Des études *in vivo* ont montré que le maximum d'absorption de la mélanine se situe à une longueur d'onde de 335 nm, ce qui correspond aux UVA. On peut donc en déduire que la mélanine procure une protection plus efficace vis-à-vis de ces rayons (1).

La mélanine formée reste bien limitée aux zones irradiées, cependant des études ont montré que l'exposition UV pouvait induire un accroissement de la population mélanocytaire non seulement au sein de la peau exposée mais également de la peau protégée, surtout chez les sujets à peau très claire (1,26).
Cette observation prouve qu'il existe une substance libérée par la peau irradiée qui stimulerait la prolifération mélanocytaire et la mélanogenèse dans les zones non exposées (26).
Ceci explique ainsi la grande densité de mélanocytes au sein des organes génitaux qui ne sont habituellement pas exposés au soleil (26).

2.2.3. Rôle de barrière vis-à-vis des rayons solaires

Parallèlement au mécanisme de pigmentation, plusieurs phénomènes vont apparaitre afin de limiter la pénétration des rayons solaires à travers la peau et par conséquent les dommages occasionnés tant au niveau tissulaire que cellulaire :

- <u>Epaississement de la barrière cornée :</u> l'irradiation UVB induit une augmentation du nombre et de l'épaisseur des différentes couches de kératinocytes dans l'épiderme vivant, une kératinisation accrue et un épaississement de la couche cornée (1,35).
Le nombre de cornéocytes se trouve pratiquement doublé.

Le but de cet épaississement est de soustraire les cellules de la couche basale (où ont lieu toutes les mitoses des cellules épidermiques, permettant ainsi son élaboration) à l'atteinte des UV les moins pénétrants, ceux-ci étant épuisés avant d'atteindre la couche germinative (43).
Avec la répétition des expositions, moins d'UVB responsables d'érythème parviennent dans les papilles dermiques et le matériel génétique est soustrait à l'action mutagène des UV (43).
Cependant, certaines études montrent que le rôle photoprotecteur de l'épaisseur de la couche cornée est néanmoins modeste (45).

- Acide urocanique et lipides de surface : l'acide urocanique est sécrété à la surface de la peau par la sueur eccrine. Il est produit par la désamination de l'histidine sous l'influence d'une histidinase activée par les UV (1,29,35,45).
Cette molécule absorbe les UVB et UVC (1,29,31,45).
L'exposition aux UVA et UVB induit une augmentation des lipides, en particulier des céramides, dans le *stratum corneum* (1).
Ceux-ci contribuent à filtrer les UVB (29,31,45).

2.2.4. Influence de la race et phototypes

La détermination d'un phototype permet de prédire les réactions de la peau vis-à-vis des rayons UV.
On retrouve deux grandes classifications : la classification de Fitzpatrick qui repose sur la susceptibilité à bronzer et à brûler aux UV et une autre reposant sur les caractères phénotypiques tels que la carnation, la couleur des cheveux et la présence d'éphélides (taches de rousseur).

Carnation	**Phototype**	**Coup de soleil**	**Bronzage**
Blanche	I	Brûle toujours	Ne bronze pas
	II	Brûle	Bronze légèrement
	III	Brûle modérément	Bronze progressivement
	IV	Brûle très peu	Bronze toujours bien
Mate (méditerranéenne, asiatique, arabes)	V	Brûle rarement	Bronze intensément
Noire	VI	Ne brûle jamais	Bronze très intensément

Tableau 4 : Classification des phototypes selon Fitzpatrick
(Agache, 2000)

Pour les sujets de phototype clair, la dose d'UVB déclenchant le bronzage est supérieure à celle provoquant le coup de soleil : ces sujets brûlent avant de bronzer. C'est l'inverse pour les sujets de phototype foncé (1).

Phototype	Cheveux	Carnation	Ephélides	Coup de soleil	Bronzage
0	Blancs	Albinos	0	Constant +++	0
I	Roux	Laiteuse	+++	Constant ++	0
II	Blonds	Claire	++	Constant +	Hâle léger
III	Blonds Châtains	Claire Mate	+ 0	Fréquent Fréquent	Clair Moyen
IV	Bruns	Mate	0	Rare	Foncé
V	Bruns	Brune	0	Exceptionnel	Très foncé
VI	Noirs	Noire	0	Absent	Noir

Tableau 5 : Classification des phototypes tenant compte des caractères phénotypiques

(Agache, 2000)

2.3. Etude de la fonction barrière : modèles de peau reconstruite

La peau est un tissu vivant à part entière et sa structure très élaborée lui permet de se protéger contre les agressions extérieures.

C'est la couche la plus externe, le *stratum corneum*, qui joue un rôle prépondérant dans la protection des couches inférieures et joue ainsi le rôle d'une véritable barrière de sécurité.

Afin d'élaborer et de vérifier l'innocuité des substances dermocosmétiques, les chercheurs pratiquent divers essais cliniques tant sur de la peau humaine, qu'animale ou encore de la peau synthétique.

Tout ceci permet de déterminer la vraie puissance de cette barrière selon la nature des substances appliquées, l'épaisseur de l'application, l'humidité ambiante…

Ces modèles crées en laboratoires pour la première fois en 2003 ont permis de mieux comprendre la biologie et la physiologie de la peau. Le premier modèle a été utilisé pour identifier une sous-population de kératinocytes présentant les caractéristiques des cellules souches somatiques.

Depuis, ces modèles de peau n'ont cessé d'être améliorés : le modèle pigmenté, qui intègre des mélanocytes ; le modèle avec cellules de Langerhans ; le modèle épiderme + derme…

Ces modèles nous permettent ainsi de comprendre :

- les effets du soleil sur le derme et d'évaluer l'efficacité des filtres solaires
- les mécanismes du vieillissement cutané
- le rôle des kératinocytes dans la maturation et la dégradation des mélanosomes
- le rôle des cellules de Langerhans dans la réponse immunitaire cutanée

Ils permettent également d'évaluer le pouvoir de pénétration de substances, l'efficacité des produits, leur toxicité et leur éventuel potentiel d'irritation cutanée.

Les laboratoires L'Oréal, grâce à leur plate-forme d'ingéniérie tissulaire, ne cessent d'élaborer des modèles de peau et de les moderniser afin de parfaire les connaissances actuelles (http://www.loreal.fr).

2.3.1. Modèle simple (épiderme, derme, kératinocytes)

Il s'agit du premier modèle d'épiderme, ayant servi de socle pour la conception des modèles les plus complexes.

A partir d'une biopsie de peau issue de la chirurgie plastique, l'épiderme est séparé du derme au niveau de la jonction dermo-épidermique par l'action d'enzymes : les protéases.

Les kératinocytes isolés de la biopsie sont mis en culture.

Les cellules du derme sont ensuit éliminées par congélations et décongélations successives.

Ce derme inerte dé-épidermisé permet l'ensemencement localisé des kératinocytes grâce à un anneau en plastique.

Une phase d'immersion de 4 jours permet la prolifération horizontale des kératinocytes.

Une phase d'émersion à l'air pendant 10 jours induit la différenciation verticale des kératinocytes et finalement, la formation d'une couche cornée fonctionnelle (http://www.loreal.fr).

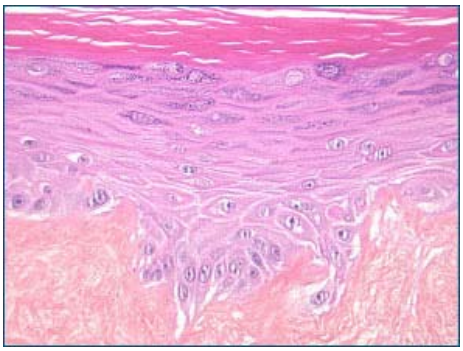


Figure 25 : Coupe histologique d'un épiderme reconstruit à partir d'une sous-population de kératinocytes enrichis en cellules souches somatiques

(http://www.invitroskin.com/_int/_fr/topic/topic_sousrub.aspx?tc=R_HOME_IN_VITRO_SKIN^R_POURQUOI_DES_MODELES_DE_PEAUX^R_POUR_COMPRENDRE&cur=R_POUR_COMPRENDRE)

2.3.2. Modèle pigmenté (épiderme, derme, kératinocytes, mélanocytes)

A partir d'une biopsie de peau issue de la chirurgie plastique, l'épiderme est séparé du derme au niveau de la jonction dermo-épidermique par l'action d'enzymes : les protéases.
Les kératinocytes et les mélanocytes isolés de la biopsie sont mis en culture.
Les cellules du derme sont ensuite éliminées par congélations et décongélations successives.
Ce derme inerte dé-épidermisé permet l'application d'un anneau et l'ensemencement localisé des kératinocytes et mélanocytes.
Une phase d'immersion de 4 jours permet la prolifération horizontale des cellules.
Une phase d'émersion à l'air pendant 10 jours induit la différenciation verticale des kératinocytes et finalement, la formation d'une couche cornée fonctionnelle.
De plus, la synthèse de la mélanine par les mélanocytes et son transfert aux kératinocytes assurent la pigmentation de l'épiderme.

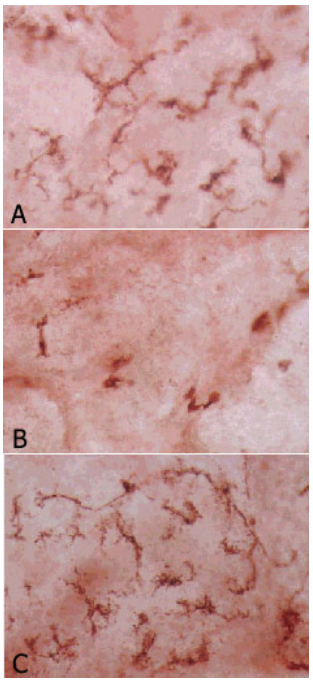
Sous l'action des rayons UV, ce modèle est capable de reproduire les mécanismes du bronzage. Ceci permet alors d'étudier les effets des UVA et UVB sur la peau, ce qui s'avère moins dangereux que le fait d'exposer des volontaires à ces rayons.
Enfin, il sera possible de déterminer le rôle particulier des kératinocytes dans la maturation et la dégradation des mélanosomes (http://www.loreal.fr).

Figure 26 : Modèle de peau pigmenté reproduisant les mécanismes du bronzage
(http://www.invitroskin.com/_int/_fr/topic/topic_sousrub.aspx?tc=R_HOME_IN_VITRO_SKIN^R_POURQUOI_DES_MODELES_DE_PEAUX^R_POUR_COMPRENDRE&cur=R_POUR_COMPRENDRE)

2.3.3. Modèle aux 3 cellules (épiderme, derme, kératinocytes, mélanocytes, précurseurs des cellules de Langerhans)

A partir d'une biopsie de peau issue de la chirurgie plastique, l'épiderme est séparé du derme au niveau de la jonction dermo-épidermique par l'action d'enzymes : les protéases.
Les kératinocytes et les mélanocytes isolés de la biopsie sont cultivés séparément. Des précurseurs des cellules de Langerhans (CD34+) sont rajoutés à ces cellules.
Les cellules du derme sont ensuit éliminées par congélations et décongélations successives.
Ce derme inerte dé-épidermisé permet l'application d'un anneau et l'ensemencement localisé des kératinocytes, mélanocytes et précurseurs des cellules de Langerhans.
Une phase d'immersion de 4 jours permet la prolifération horizontale des cellules.
Une phase d'émersion à l'air pendant 10 jours induit la différenciation verticale des kératinocytes et finalement, la formation d'une couche cornée fonctionnelle.
Les mélanocytes sont ainsi localisés dans la couche basale et les cellules de Langerhans dans les couches suprabasales.
L'épiderme possède des mélanocytes et des cellules de Langerhans, il reproduit ainsi les fonctions de mélanogenèse et immunitaire d'un épiderme normal.
Les cellules de Langerhans, lorsqu'elles sont exposées aux rayonnements solaires, changent de morphologie, diminuent en nombre et relarguent des cytokines, reflet de l'inflammation post-exposition.
Elles répondent également à des produits de référence provoquant des allergies et permettront ainsi de comprendre leur rôle dans les phénomènes allergiques et immunitaires (http://www.loreal.fr).

Figure 27 : Modèle aux 3 cellules :
A : cellules de Langerhans
B : après irradiation UV, modification de leur morphologie et diminution de leur nombre
C : après application d'un produit filtrant, les cellules sont protégées



(http://www.invitroskin.com/_int/_fr/topic/topic_sousrub.aspx?tc=R_HOME_IN_VITRO_SKIN^R_POURQUOI_DES_MODELES_DE_PEAUX^R_POUR_COMPRENDRE&cur=R_POUR_COMPRENDRE)

2.3.4. Epiderme sur équivalent dermique

Pour construire ce modèle, des fibroblastes ont été pré-traités à la trypsine et sont mélangés à un gel de collagène I.
En parallèle, une biopsie de peau issue de la chirurgie plastique permet d'isoler les kératinocytes mis en culture.
On observe ensuite une polymérisation du collagène avec les fibroblastes : la condensation des fibrilles de collagène et l'organisation des fibroblastes provoquent une contraction contrôlée du gel.
Le support dermique formé après la contraction du gel est collé au fond de la boite et un anneau permet un ensemencement localisé des kératinocytes.
Une phase d'immersion de 7 jours permet la prolifération horizontale des kératinocytes.
Une phase d'émersion à l'air de 7 jours induit la différenciation verticale des kératinocytes et finalement, la formation d'une couche cornée fonctionnelle (http://www.loreal.fr).

Ce modèle a permis de comprendre les effets du soleil sur le derme en remarquant une apoptose des fibroblastes 6 heures après l'exposition aux UVA et la disparition de la plupart des cellules après 48 heures.
La régénération du derme se fait les 2 semaines suivantes, par la prolifération des fibroblastes survivants et la synthèse de matrice extracellulaire.
Ces connaissances sont indispensables pour évaluer l'efficacité des filtres solaires (http://www.loreal.fr).

2.3.5. Le modèle de « peau âgée »

Un des mécanismes impliqués dans le vieillissement cutané consiste en une réaction chimique ayant lieu dans le derme : c'est la réaction de glycation. Elle a pour conséquence la formation de ponts entre les macro-molécules du derme, ce qui contribue à la rigidité et la perte d'élasticité du derme avec l'âge.
Les chercheurs ont incubé du collagène avec un sucre, le ribose, pour induire la réaction de glycation.
Ils ont ensuite construit avec ce collagène pré-glyqué un équivalent dermique, utilisé comme support pour reconstruire un épiderme en ensemençant des kératinocytes dessus.
L'ensemble est placé en émersion à l'air pour permettre la formation de la couche cornée.
Ce modèle permet d'étudier cette réaction impliquée dans le vieillissement cutané mais aussi de cribler les molécules anti-glycation candidates à la formulation de produits anti-âge (http://www.loreal.fr).

2.3.6. Divers modèles : Epiderm®, Episkin®, Skinethic®

Le modèle Episkin® correspond à un modèle d'épiderme sous la forme d'une plaque de 12 puits contenant chacun une unité épidermique.

Les kératinocytes humains proviennent de plasties mammaires ou abdominales obtenues auprès de donneurs adultes. Les cellules sont ensuite mises en culture.

Dans chaque puits, un support constitué d'une sous-couche de collagène I recouverte d'un film de collagène IV est fixé à une nacelle.

Les kératinocytes sont alors ensemencés sur ce support.

Une phase d'immersion de 3 jours permet une prolifération horizontale des kératinocytes.

Une phase d'émersion à l'air de 10 jours induit la différenciation verticale des kératinocytes et finalement, la formation d'une couche cornée fonctionnelle (http://www.loreal.fr).

Figure 28 : Modèle Episkin® avec ses plaques de 12 puits

(http://www.invitroskin.com/_int/_fr/topic/topic_sousrub.aspx?tc=R_HOME_IN_VITRO_SKIN^R_POURQUOI_DES_MODELES_DE_PEAUX^R_POUR_EVALUER&cur=R_POUR_EVALUER)

Ces trois modèles de peau ont été élaborés afin de développer des méthodes alternatives à celles couramment utilisées chez l'homme ou l'animal.

Ils sont utilisés afin de tester la tolérance cutanée ou l'efficacité de produits cosmétiques, chimiques ou pharmaceutiques.

L'avantage est de pouvoir quantifier les effets de ces produits et de sélectionner les mieux tolérés, sans utiliser de volontaires et prendre le risque de leur faire subir quelconque dommage.

Mais pour pouvoir être utilisées par les laboratoires, ces méthodes doivent être validées, grâce à des modèles de peau et la validation sera réalisée en 2 étapes : une pré-validation et optimisation (détermination du modèle et élaboration d'une méthode reproductible) et une validation formelle (confirmation de la reproductibilité inter-laboratoire et de la performance de la méthode) (http://www.loreal.fr).

Ainsi, les laboratoires Mattek Inc. à Ashland aux USA ont crée le modèle Epiderm® ; Episkin® a été développé par les laboratoires Episkin SNC de Lyon, oeuvrant en collaboration avec L'Oréal ; la conception du modèle Skinethic® a quant à elle été le fruit du travail des laboratoires Skinethic de Nice (34).

2.3.6.1. Etude comparant la reproductibilité des 3 modèles en observant la pénétration de 3 substances (34).

Une étude réalisée en 2002 (« Permeation and Skin Absorption…. ») eut pour objectif de comparer la reproductibilité des 3 modèles en observant la pénétration de 3 substances de natures physicochimiques très différentes (acide laurique, caféine, mannitol).

Ces 3 substances ont des pouvoirs hydrophiles bien différents et par conséquent, des pouvoirs de pénétration variés. L'acide laurique pénètre très facilement à travers la peau, suivi par la caféine et le mannitol.

La reproductibilité a été évaluée au sein d'un même modèle et entre les modèles.

Les substances ont été marquées au Carbone 14 et la radioactivité des compartiments récepteurs mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Il ressort de cette étude que l'efficacité de la fonction barrière n'est pas constante entre les modèles.

Si l'on considère le pourcentage de la dose appliquée de mannitol retrouvée dans le compartiment récepteur (donc ayant traversé l'épiderme en entier) au bout de 24 heures, on peut voir qu'il est de :

-14,5% pour le modèle Skinethic®.

- 0,6% pour le modèle Episkin®.

- quasi nul pour le modèle Epiderm®.

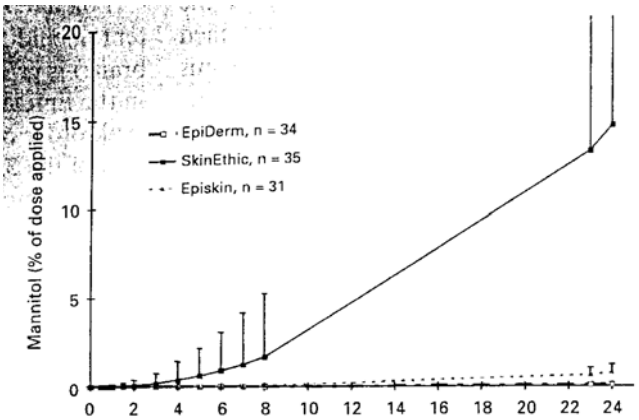


Figure 29 : Vitesse de pénétration du mannitol à travers les 3 modèles de peau testés

(LOTTE, 2002)

Ainsi, pour le mannitol, la fonction barrière du modèle Skinethic® est plus faible que celle des 2 autres.

Les chiffres pour la caféine sont de :

- 72,2% pour le modèle Skinethic®
- 20% pour le modèle Epiderm®
- 10,8% pour le modèle Episkin®

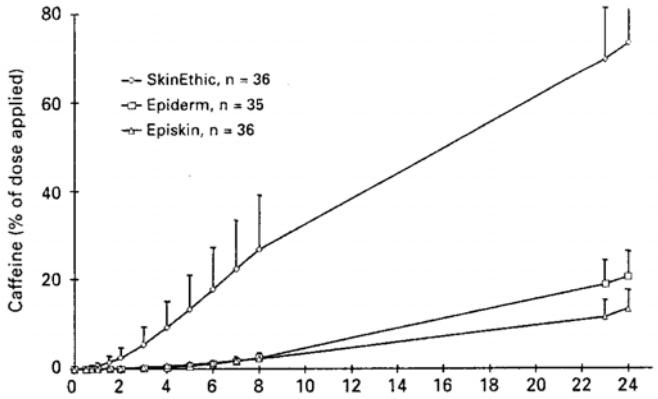


Figure 30 : Vitesse de pénétration de la caféine à travers les 3 modèles de peau testés

(LOTTE, 2002)

Enfin, concernant l'acide laurique :

- 78,3% pour le modèle Epiderm®
- 69,6% pour le modèle Skinethic®
- 23,6% pour le modèle Episkin®

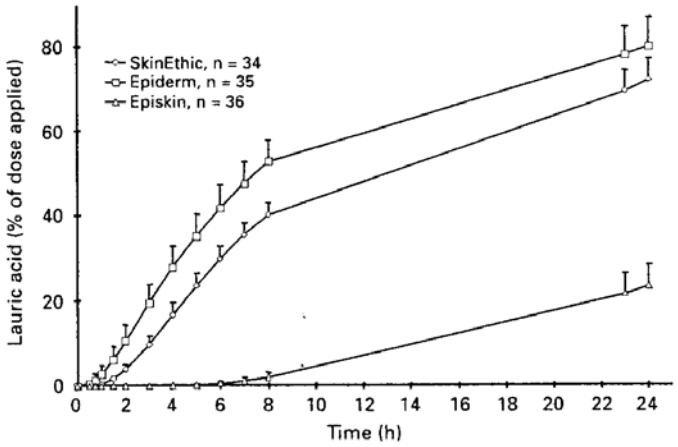


Figure 31 : Vitesse de pénétration de l'acide laurique à travers les 3 modèles de peau testés

(LOTTE, 2002)

Ainsi, la plus faible reproductibilité entre les 3 modèles est observée pour le mannitol, qui a un faible pouvoir de pénétration.
Ceci montre bien que le profil de pénétration d'une molécule peut varier selon le modèle utilisé.
Ces résultats sont confortés par le fait que c'est au sein du modèle Episkin® que la plus grande quantité de substance a été retrouvée, ceci pour les 3 molécules.
Une grande rétention au niveau de la peau induit par conséquent un faible passage.

Concernant la reproductibilité au sein d'un même modèle, celle-ci s'avère bien meilleure.

.

2.3.6.2. Etude du profil de pénétration et de distribution au sein de l'épiderme du mannitol au niveau des modèles Epiderm® et Episkin® (18).

En 2002, l'étude « Improvement of the Experimental Setup to Assess …. » a permis d'étudier le profil de pénétration et de distribution au sein de l'épiderme du mannitol au niveau des modèles Epiderm® et Episkin®.
Le mannitol est marqué au Carbone 14 et appliqué en dose infinie sur les 2 modèles ainsi que sur de la peau humaine.
Les échantillons de peau humaine, résidus de chirurgie de l'abdomen, sont montés sur des cellules de diffusion.
Le liquide du compartiment récepteur est prélevé toutes les heures durant 24 heures.

On peut ainsi clairement remarquer que les 3 profils de pénétration sont similaires.
Après 24 heures, 0,11% du mannitol est retrouvé dans le compartiment récepteur pour le modèle Epiderm® ; 0,23% pour le modèle Episkin® et 0,01% pour la peau humaine.

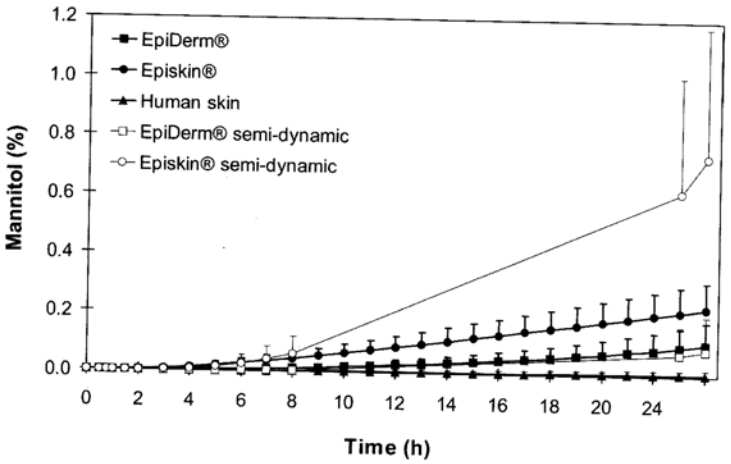


Figure 32 : Pénétration du mannitol à travers les 2 modèles testés et la peau humaine
(DREHER, 2002)

De plus, les quantités de mannitol absorbé (c'est-à-dire les quantités contenues dans l'épiderme, le support et le compartiment récepteur) par ces 3 modèles sont comparables.
On peut donc en déduire que Epiderm® et Episkin® ont le même profil de rétention du mannitol que la peau humaine malgré un taux supérieur de mannitol dans l'épiderme du modèle Epiderm®.

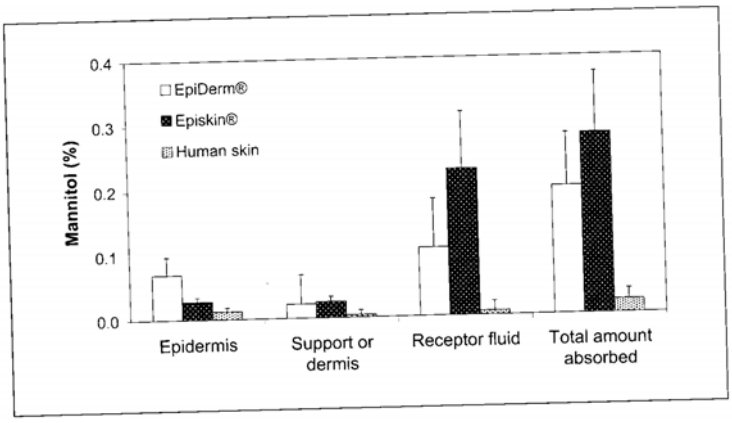


Figure 33 : Comparaison de la distribution cutanée du mannitol entre les 2 modèles et la peau humaine après 24h d'application

(DREHER, 2002)

Ainsi, les profils de pénétration et de distribution au sein de l'épiderme du mannitol sont similaires pour les 2 modèles étudiés et la peau humaine *ex vivo*.

Tout ceci conduit les chercheurs à croire en la performance de leurs modèles de peau. Cependant, de plus amples études sont nécessaires afin d'extrapoler ces résultats à de nombreuses autres substances chimiques afin d'être sûr de la fiabilité de ces modèles pour tous les principes actifs.

2.4. Autres fonctions barrière

La peau, comme nous l'avons vu précédemment, est dotée d'une structure élaborée lui permettant de se protéger contre toutes les agressions extérieures.
L'effet barrière est donc multiple et malgré le rôle prépondérant du *stratum corneum* à ce niveau, toutes les couches cellulaires entrent en jeu afin de protéger les structures sous-jacentes des agressions diverses.

2.4.1. Barrière thermique

Notre peau contribue efficacement au maintien de la température constante de notre corps. En cas de chaleur, l'évacuation de l'excès est assurée par la dilatation active des petits vaisseaux du derme et par la sudation.

Suite à une exposition au froid, la vasoconstriction des petits vaisseaux, le coussin graisseux de l'hypoderme et la contraction des muscles arrecteurs des follicules pilosébacés (chair de poule) s'opposent au refroidissement de l'organisme.

2.4.2. Barrière immunologique

Lorsque des allergènes, bactéries, virus ou autres agents agressifs pour l'organisme pénètrent à travers la peau, ils sont pris en charges par les cellules de défense de l'épiderme : les cellules de Langerhans.
Situées au sein de la couche épineuse, elles ont des propriétés phagocytaires et enzymatiques et sont chargées de capter les allergènes pour les présenter aux lymphocytes T.
A leur surface se trouvent des récepteurs qui ont de nombreuses fonctions dans la réponse immunitaire (phagocytose des complexes immuns et cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)).
Elles peuvent quitter l'épiderme pour migrer dans le derme et générer la réponse inflammatoire et erythémateuse caractéristique de l'allergie de contact (35).

2.4.3. Barrière mécanique

Les agressions mécaniques sont nombreuses et variées : tiraillement, pincement, choc, griffure, frottement, coupure…
Chaque couche cutanée permet une protection vis-à-vis de ce type d'agression.
- Au niveau de l'épiderme, la kératine, protéine fibreuse et résistante, offre une certaine souplesse à la peau et lui permet de se déformer sous l'effet de contraintes mécaniques afin de retrouver sa structure initiale lorsque les contraintes ont cessé.
- Les fibres du derme telles que le collagène, l'élastine et la réticuline lui offrent une certaine résistance et élasticité.
- La couche graisseuse de l'hypoderme offre une structure de protection des muscles et des os sous-jacents contre les pressions et les chocs importants.

III.PHYSIOLOGIE DE LA PENETRATION CUTANEE

Le terme de « pénétration » ou de « perméation cutanée » décrit le cheminement d'une molécule appliquée sur la peau, depuis sa fixation au sein du *stratum corneum* jusqu'à son éventuel passage systémique.
Les substances cosmétiques, selon leur définition, ne devraient pas traverser la peau dans toute son épaisseur, cette action étant réservée aux produits thérapeutiques. Cependant, certaines molécules actives peuvent dépasser cette limite et se retrouver dans la circulation générale d'où l'importance de connaître la réalité et les proportions de ce passage.

3.1. Mécanismes et voies d'absorption

3.1.1. Cinétique de l'absorption cutanée

L'absorption transcutanée est un phénomène de diffusion passive qui s'exerce au niveau de chacune des couches de la peau (35) et se divise en plusieurs étapes.

La molécule doit d'abord quitter son excipient et se dissoudre dans le film hydrolipidique pour traverser la barrière cutanée. Elle pénètre dans le *stratum corneum* à travers les espaces intercellulaires : c'est la « pénétration ».
La distribution de la molécule se fait selon une concentration linéairement décroissante vers les couches les plus profondes (1). Une partie reste à ce niveau et constitue un réservoir.

Puis elle diffuse dans les différentes couches de l'épiderme totalement hydratées pour ensuite continuer à diffuser dans le derme, également hydrophile (35). La diffusion d'une couche à l'autre est appelée « perméation ».

Au niveau du derme, elles entrent en contact avec le système vasculaire capillaire qui se charge d'en résorber une partie, qui passe alors dans la circulation générale pour fournir une action systémique. C'est la « résorption ».
La diffusion peut se poursuivre dans l'hypoderme et même dans les tissus sous-cutanés (35).
Chaque étape se caractérise par une vitesse propre et la vitesse du processus global dépendra surtout de l'étape la plus lente (45).
.

L'étude de la cinétique de diffusion d'une molécule à travers la peau montre que le flux ne devient constant qu'après un temps de latence variable d'une substance à l'autre. La courbe devient ensuite linéaire en atteignant un état d'équilibre (35).

La diffusion d'une substance à travers une membrane semi-perméable est proportionnelle à la différence de concentration de part et d'autre de la membrane.
Elle obéit à la loi de Fick :

$$\mathbf{J = Kp \times \Delta c = (Km \times D \times \Delta c) / e}$$

J = flux percutané (µg/cm²/h)

Kp = coefficient de perméabilité (cm/h) = (Km × D) / e.
Il traduit la vitesse de diffusion. Il est fonction de l'épaisseur de la membrane (plus elle augmente et plus Kp diminue) et de la nature de la molécule et des excipients. La valeur de Kp des substances liposolubles serait 50 fois supérieure à celle des substances hydrosolubles (45).

Δc = différence de concentration de part et d'autre de la membrane (C1-C2).

Km = coefficient de partage couche cornée/véhicule.
Il correspond au rapport de solubilité de la substance diffusante dans la couche cornée et dans l'excipient. Une valeur élevée de Km indique une affinité importante pour la couche cornée.

D = coefficient de diffusion (cm²/s).
Il traduit la facilité avec laquelle une substance peut traverser les couches de l'épiderme et atteindre la circulation systémique. Plus la molécule à une masse moléculaire élevée et plus la diffusion est faible.
Ce paramètre traduit également la valeur de l'imperméabilité des différentes couches de la peau. (D = 10^{-9} cm²/s pour le *stratum corneum* et 10^{-6} cm²/s pour l'épiderme et le derme, ce qui signifie que la couche cornée est 1000 fois plus imperméable que les couches sous-jacentes).

e = épaisseur de la couche cornée (µm).
Le flux est inversement proportionnel à e. Ce paramètre n'est donc pas constant, l'épaisseur du *stratum corneum* pouvant varier considérablement d'une région du corps à une autre (26,35,45).

La vitesse d'absorption transcutanée est fonction de plusieurs processus pouvant se développer simultanément :

- diffusion de la molécule active dans le véhicule.
- libération de la molécule de son véhicule.
- changement d'activité thermodynamique de la molécule à la surface de la peau.
- changement du taux d'hydratation de la peau.
- diffusion de la molécule dans la couche cornée.
- diffusion de la molécule dans les autres couches cutanées.

3.1.2. Organisation du stratum corneum

La couche cornée est une superposition de cornéocytes, formant des lamelles très allongées (45).
Elle peut être représentée schématiquement comme un « mur de briques » contenant des cellules protéiques hydrophiles entourées d'un ciment lipophile lié de façon covalente aux protéines de la membrane cellulaire (4,46).

Ainsi, la pénétration transcutanée des substances dépendra à la fois de leur nature physico chimique et de leur affinité pour les différentes couches cutanées.
Diverses voies de pénétration coexistent : les molécules peuvent diffuser par le biais du ciment intercellulaire, par passage transcellulaire ou encore grâce aux annexes cutanées.

3.1.3. Voie transcellulaire/intercellulaire/annexielle

<u>Le passage transcellulaire</u> direct est surtout emprunté par les molécules de petite taille. Il ferait intervenir la voie des cornéosomes qui réalisent des pontages entre les cellules et peuvent, étant donné leur nature protéique, devenir suffisamment amphiphiles (35).
De plus, les substances doivent être capables de s'intégrer à la double couche de phospholipides constituant les membranes cellulaires pour pouvoir y pénétrer (19).
Cette voie pourrait donc être suivie par des molécules amphiphiles ou plus ou moins lipophiles.
La vitesse de pénétration par cette voie est très lente mais est compensée par le fait que la surface est très importante.

Kligman pense que le volume intercellulaire s'élevant peut-être à 1% du volume total est beaucoup trop faible pour une pénétration (19).
De plus, les cornéocytes offriraient une grande résistance à la diffusion.

Le passage intercellulaire emprunte la voie tortueuse du ciment lipidique. Celle-ci serait la plus couramment utilisée par toutes les molécules amphiphiles ou lipophiles (35), non chargées et de faible poids moléculaire (46).
Albery suggère que cette voie peut être une voie majeure de pénétration pour les petites molécules car bien que la surface relative soit faible, la résistance diffusionnelle des espaces intercellulaires est beaucoup plus basse que celle des cornéocytes (19).
De plus, ces espaces peuvent être dilatés par des solvants ou par des véhicules non polaires.
L'extraction des lipides par des solvants augmente la perméabilité cutanée, or le ciment est le constituant de la peau le plus riche en lipides (19).
Lorsque l'on ôte les lipides de la couche cornée, la perméabilité de l'eau augmente : la PIE est supérieure. Cela montre donc que les lipides intercellulaires jouent un rôle dans la fonction barrière (46).
Cette voie serait une étape limitante concernant la perte en eau, étant donné la très faible affinité de l'eau pour les lipides intercellulaires (46).

La voie annexielle correspond : - au passage transfolliculaire. Etant donné que les follicules pilosébacés sont localisés dans des invaginations profondes de l'épiderme dans le derme, ils peuvent conduire les molécules jusqu'au derme réticulaire (35).
De plus, les appareils pilosébacés n'ont pas une couche cornée très développée d'où une pénétration facilitée à ce niveau (19).
Rein observa que l'application de colorants sur la peau engendrait une concentration de ces derniers autour des follicules pileux.
L'application de substances radioactives apporta les mêmes résultats.
Une autre explication à ce passage serait l'affinité de certaines molécules pour le sébum, mais celui-ci ne libèrerait pas les substances fixées.
Diverses études semblent montrer que cette voie serait très empruntée, cependant, elle se heurte à différents écueils : les glandes sébacées ont tendance à capter les substances lipophiles et le flux de sébum s'écoulant de l'intérieur vers l'extérieur contrarie la pénétration de substances exogènes (35).
Cette pénétration pourrait donc être importante dans la phase initiale de la pénétration et peut devenir significative pour de grosses molécules, pénétrant mal, hautement insolubles (19,45,46).
Lorsque la peau est intacte, elle représente pratiquement la seule voie d'absorption pour certaines substances (45).

- au passage par le canal sudoripare des glandes eccrines. Celui-ci est possible mais rarement démontré (35).

C'est le cas pour le chlorure d'aluminium qui pénètre dans les conduits sudoraux et diminue l'écoulement de la sueur en les obturant d'où son emploi en tant qu'anti-transpirant.

Cependant, le passage par la voie sudoripare semble bien minime, les substances y pénétrant devant diffuser contre le flux de sueur qui se dirige vers la surface cutanée (19).

Des chercheurs ont montré que les surfaces cutanées ayant une forte proportion de glandes eccrines ne montrent pas de perméabilité accrue.

3.2. Facteurs d'influence

La pénétration d'une substance à travers la peau est dépendante de multiples paramètres, qui peuvent interagir entre eux. Certains vont agir en synergie en ayant la même influence sur la pénétration (augmentation ou diminution) ; d'autres au contraire vont annuler leurs effets, l'augmentation de l'absorption due à un facteur étant contrecarrée par une inhibition due à l'autre.

3.2.1. Etat de la peau et âge

Une altération de l'intégrité de la peau aura pour conséquence une augmentation de la pénétration.

Ainsi, le stripping, technique consistant à arracher successivement avec un adhésif les différentes couches cellulaires du *stratum corneum*, multiplie l'absorption par 4 (45).

L'occlusion va augmenter la teneur en eau du *stratum corneum* et faire « gonfler » les cornéocytes qui deviennent alors hyperperméables. Ceci multiplie l'absorption par 10 (45).

L'occlusion suivie d'un stripping multiplie l'absorption par 20 (45).

De nombreuses études ont également démontré que la perméabilité cutanée se trouve augmentée dans les dermatoses et autres processus inflammatoires ainsi que chez les grands brûlés, exposés en plus au risque de déshydratation (45).

Les lavages fréquents avec des savons, détergents rendent la couche cornée moins épaisse et augmentent sa perméabilité (19).

Le dégraissage superficiel par des solvants ôte le film hydrolipidique, barrière à la pénétration des substances (19).

Toute modification du pH pourra également retentir sur l'absorption.

Plus la couche cornée est épaisse et moins elle est perméable. Ainsi, les peaux noires, ayant une couche cornée très épaisse, sont moins perméables que les peaux blanches (19,45).
L'exposition au soleil provoquant un épaississement de la barrière cornée engendre aussi une diminution de l'absorption cutanée (19).

Il est important de retenir que la peau de l'enfant semble plus perméable que celle de l'adulte.
De plus, la différence du ratio surface corporelle/poids entre l'adulte et l'enfant fait que l'application d'une même dose de produit peut être plus toxique chez l'enfant, la quantité de substance absorbée par unité de poids étant beaucoup plus importante chez ce dernier (26,45).

Cependant, divers auteurs s'accordent pour affirmer que la couche cornée présente très rapidement un état définitif et que la perméabilité cutanée du nourrisson et du jeune enfant est très voisine de celle de l'adulte (35,46).
En tout cas, avant la puberté, la surface de la peau n'est pas recouverte par des produits de la sécrétion sébacée, encore faible. Ainsi, elle est moins acide et résiste moins aux produits basiques (19).
Seuls les prématurés auraient pendant quelques semaines ou quelques mois une perméabilité cutanée très augmentée, environ 2,5 fois plus perméable que celle des adultes (35,46).

3.2.2. Site d'application

La pénétration cutanée s'effectue selon un ordre décroissant dans les zones suivantes : plantes, paumes, front, dos de la main, scrotum et région rétro-auriculaires, creux axillaires et cuir chevelu, tronc, bras et jambes (45).
Feldman et Maibach ont appliqué de l'hydrocortisone en différents sites et en évaluant son absorption cutanée, ont également établi cette liste (19).
Cette classification s'explique par l'épaisseur croissante de la couche cornée.
Une question se pose cependant : la paume des mains et la plante des pieds semblent être les zones les plus perméables alors que l'épaisseur de la couche cornée y est très importante (19).
Comment expliquer cela alors que nous savons que la pénétration cutanée diminue avec l'épaisseur de la couche cornée ?
En fait, les cellules cornées de ces régions sont sphéroïdales et non aplaties : leur agglomération et leur empilement sont donc moins importants. En effet, le rôle principal de la couche cornée à ce niveau est la protection mécanique et non l'imperméabilité vis-à-vis des substances chimiques (19).

Certaines études eurent pour objectif d'observer les variations de perméabilité entre différents sites anatomiques : il fut conclu que l'abdomen est la région du corps ayant la perméabilité la plus constante (50).

Ainsi, la variabilité de la pénétration selon le site anatomique ne s'explique pas uniquement par l'épaisseur du *stratum corneum* mais aussi par sa structure, la densité des annexes cutanées, le contenu en lipides du ciment intercellulaire, le flux sanguin cutané, l'exposition au soleil…(19,46).

3.2.3. Epaisseur de la couche appliquée, surface et fréquence d'application

Appliquer une substance sur une plus grande surface cutanée contribue à en augmenter l'absorption (19,35).

Wester a comparé l'absorption percutanée de l'hydrocortisone après une seule application et après l'application de la même quantité répartie en plusieurs doses égales.
Il en résulte que l'absorption consécutive à une seule application de haute concentration est supérieure à celle obtenue après l'application de la même concentration divisée en doses égales.
La peau est en effet saturée après les premières administrations, ce qui tend à altérer l'absorption pour les suivantes (19).

C'est pourquoi la plupart des formulations cosmétiques sont à appliquer 1, parfois 2 fois par jour.
Exception faite des crèmes solaires, dont le but est de rester en surface et de couvrir le plus possible la surface cutanée. Il est donc recommandé de les appliquer toutes les deux heures et après chaque baignade.

Le fait d'appliquer la crème, pommade ou gel en couche épaisse crée un effet occlusif qui accroît la vitesse d'absorption.

3.2.4. Occlusion et hydratation de la peau

La perméabilité de la couche cornée normalement hydratée (environ 10%) est 10 fois supérieure à celle du *stratum corneum* sec (45).
Scheuplein et Stoughton ont montré que l'augmentation de l'hydratation du *stratum corneum* multiplie l'absorption cutanée par 10 (45).
Plus précisément, cette hydratation favoriserait la diffusion des substances hydrophiles. En effet, les molécules d'eau encombreraient les têtes polaires des lipides et réduiraient les intéractions entre chaînes carbonées (4).
Lorsque l'on veut augmenter l'hydratation de l'épiderme afin de favoriser la pénétration, on peut favoriser la migration de l'eau des couches profondes vers le *stratum corneum* par un apport externe ou en réalisant une occlusion (3,45).

Cette méthode consiste à couvrir la région d'application d'une membrane et à la fixer au moyen de ruban adhésif.
L'occlusion va augmenter la teneur en eau du *stratum corneum* et faire « gonfler » les cornéocytes qui deviennent alors hyperperméables, ce qui multiplie l'absorption par 10 (45,46).
De plus, elle augmente la température locale (qui passe de 32°C à 37°C), empêche l'évaporation de CO_2 et prolonge le contact de la préparation avec la peau. La PIE se trouve diminuée, l'eau ne pouvant pas s'évaporer (19).
En 1974, Harris et ses collaborateurs ont étudié au microscope électronique des échantillons de peau humaine maintenus sous occlusion grâce à un film de polyéthylène pendant 72 heures.
Ils ont montré que la couche cornée très hydratée avait gonflé et que sa surface avait augmenté de 37% par rapport à celle d'une couche cornée normale, sans occlusion (19).

Les principaux effets nuisibles de l'occlusion prolongée sont la macération, l'augmentation et la modification de la flore microbienne cutanée, l'augmentation du pH cutané et du gaz carbonique (45).

Certaines substances comme les corticoïdes ne doivent jamais être appliquées sous occlusion au risque de favoriser un passage systémique et voir leurs effets indésirables accrus. Leur absorption serait ainsi multipliée par 100 (19).

Une prudence s'impose également concernant les produits traitant l'érythème fessier du nourrisson, la couche créant une occlusion très importante.

3.2.5. Nature physico-chimique de la substance active

Puisque le passage des substances à travers la barrière cutanée se fait selon un mécanisme de diffusion passive, ne pénètrent que les molécules peu encombrantes (masse moléculaire inférieure 1000 Daltons) et sans charge électrique donc non ionisées (45,46).
L'ionisation de la molécule est dépendante de son pKa mais aussi du pH du milieu. Le pKa d'une substance correspond au pH pour lequel un acide faible se présente à 50% sous forme ionisée et à 50% sous forme non ionisée.

- Lorsque le pH correspond au pKa de la molécule, celle-ci est non ionisée, sa diffusion sera donc optimale.
- Lorsque le pKa est supérieur à 7 (substance basique) : - si pH > pKa, la molécule est non ionisée.
- si pH < pKa, la molécule sera ionisée. Le pourcentage de forme ionisée sera d'autant plus important que le pH est faible.

- Lorsque le pKa est inférieur à 7 (substance acide) : - si pH > pKa, la molécule est ionisée, la proportion de forme ionisée étant d'autant plus importante que le pH est élevé.
- si pH< pKa, la molécule sera non ionisée.

Le coefficient de perméabilité (Kp) d'une substance non ionisée sera donc supérieur à celui de la forme ionisée (46).
Plus la molécule est grosse et plus son coefficient de diffusion (D) est faible.
Une exception existe cependant : l'héparine, mucopolysaccharide d'environ 17000 Da, pénètre jusqu'au derme. Ce phénomène serait dû à sa nature acide et polysulfurique (46).

Les substances ayant la meilleure pénétration sont lipophiles, ayant à la fois une certaine hydrophilie (19). Elles sont donc amphiphiles (35).
En effet, la lipophilie est nécessaire pour traverser la couche cornée riche en lipides et l'hydrophilie permet sa résorption dans le derme, l'hypoderme et le système vasculaire (19).

Certains auteurs pensent que la forme de la molécule pourrait aussi avoir une influence, les longues molécules linéaires plus ou moins ramifiées ayant moins de facilité pour s'insinuer entre les cornéocytes que les molécules de forme plus ramassée (35).

3.2.6. Influence du véhicule

Le véhicule, comme son nom l'indique, a pour rôle de transporter le principe actif de la formulation galénique jusqu'à la couche cornée de la peau, tout en facilitant sa pénétration. Le principe actif doit en effet diffuser hors du véhicule puis traverser la barrière cutanée pour parvenir à son site d'action (19,46).

Pour faciliter la pénétration, l'excipient peut agir de diverses façons :

- en solubilisant le principe actif
- en favorisant le partage véhicule-peau
- en augmentant l'hydratation par occlusion
- en modifiant le degré d'ionisation du principe actif
- en facilitant la pénétration du principe actif (urée, DMSO…) (45)

✓ Plus la proportion de principe actif solubilisé dans l'excipient est grande et plus la quantité susceptible d'être absorbée augmente aussi (45). En effet, seule la fraction soluble peut diffuser dans le véhicule et être apte à traverser la barrière.

Pour cela, la solubilisation ne doit pas empêcher la diffusion du principe actif : il faut donc que le coefficient de partage Km reste élevé (19,46).

En effet, lorsque le principe actif est très soluble dans le véhicule, il aura tendance à y demeurer. Son action ne pourra être que superficielle, à la surface de contact avec la peau (35).

La dissolution du principe actif sera facilitée par la petite taille des particules (19) et l'ionisation (46).

De plus, de nombreuses études ont démontré que la libération du principe actif à partir du véhicule est optimale quand celui-ci contient la concentration minimale de solvant requis pour solubiliser complètement le produit (19).

Si la concentration est trop faible, le principe actif est en suspension et le passage est moins bon.

Inversement, s'il y a trop de solvant, l'affinité du principe actif pour le véhicule augmente et le coefficient de partage Km diminue.

✓ Le coefficient de partage (Km) est le rapport de la concentration du principe actif au niveau de la peau sur la concentration dans le véhicule. Il traduit donc l'index d'affinité du principe actif entre la peau et le véhicule (19).

La libération d'une substance dans la peau sera favorisée par la sélection de véhicules à faible affinité pour elle.

Une valeur élevée de Km indique une affinité importante pour la couche cornée.

Une étude nommée « Vehicle effects on percutaneous absorption… » réalisée en 2005 a permis de comparer l'absorption cutanée de l'acide benzoïque, de la caféine et de la testostérone selon la nature de leur véhicule (vaseline, ethylène glycol et eau).

Il a été démontré que la caféine pénètre mieux à travers la peau lorsqu'elle est véhiculée par de la vaseline (61,8% d'absorption) et que le meilleur véhicule pour l'absorption de la testostérone est un gel aqueux (41,4% d'absorption) (9).

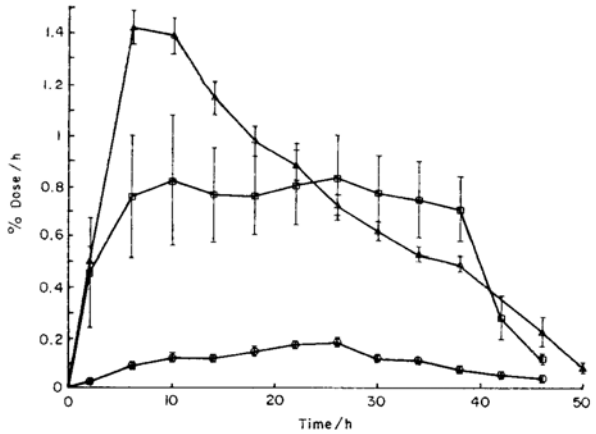


FIGURE 1. Effect of vehicles on caffeine absorption *in vitro*. Values are the mean (± SE) of 6–7 determinations. △ = petrolatum; □ = ethylene glycol gel; ○ = water gel.

Figure 34 : Influence de 3 véhicules sur l'absorption cutanée de la caféine

(BRONAUGH, 2005)

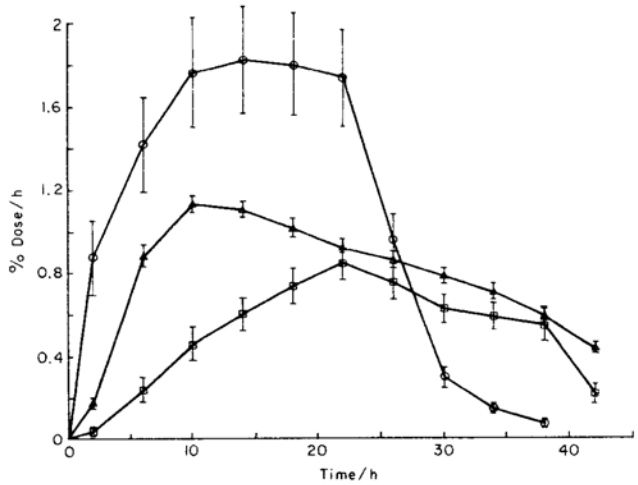


FIGURE 2. Effect of vehicles on testosterone absorption *in vitro*. Values are the mean (± SE) of 5–20 determinations. △ = petrolatum; □ = ethylene glycol gel; ○ = water gel.

Figure 35 : Influence de 3 véhicules sur l'absorption cutanée de la testostérone

(BRONAUGH, 2005)

En effet, on observe que le coefficient de partage Km de la testostérone contenue dans l'eau est de 51 alors qu'il n'est que de 3,3 quand la molécule est répartie dans l'éthylène glycol (9).

Ainsi, on remarque que pour que le véhicule libère au mieux un principe actif, celui-ci doit être de nature différente (9).

La caféine, molécule hydrophile et très soluble dans l'eau (solubilité de 22g/L) verra sa pénétration augmentée par la vaseline, lipophile, où elle est très peu soluble (1,4g/L).

La testostérone, lipophile et soluble dans la vaseline (5,5g/L) est libérée facilement par l'eau où elle est peu soluble (0,01g/L) (9).

- ✓ L'occlusion sera permise grâce aux véhicules ayant généralement une action de surface et de nature hydrocarbonée comme l'huile de vaseline (paraffine liquide), la vaseline, les paraffines, les silicones (hydrophobes), les cires, les acides et alcools gras (35).

Ils retiennent en solution les principes actifs lipophiles qui quitteront difficilement le véhicule et exerceront alors une action superficielle.

A contrario, l'augmentation de l'hydratation cutanée par occlusion favorise le passage des molécules hydrophiles (35).

Certains excipients peuvent émulsionner une partie de l'eau de l'épiderme et la retenir : ce sont les occlusifs humectants tels que le propylène glycol, le glycérol, le sorbitol (19).

Les occlusifs hygroscopiques tels que les dérivés cellulosiques retiennent l'eau à la surface de la peau mais doivent être utilisés à faible concentration car ils peuvent déshydrater la peau (19).

Les excipients peuvent aussi être de nature hydrophile comme dans le cas des gels réalisant un effet filmogène sur la peau après évaporation de l'eau. Ces gels sont souvent associés à des polymères cationiques qui fixent les charges négatives de la kératine, constituant ainsi une barrière supplémentaire à la surface de la couche cornée (35).

- ✓ Le pH a une influence directe sur le degré d'ionisation des molécules du principe actif. Si on veut favoriser son absorption, le pH doit être tel qu'il permette d'obtenir la plus grande proportion de principe actif sous forme non ionisée (45).

Des solutions dont le pH est très élevé ou très bas peuvent détruire la couche superficielle de l'épiderme, ce qui augmente considérablement l'absorption cutanée. Cet effet néfaste n'est bien évidemment pas recherché lors de la formulation des cosmétiques (19).

- ✓ Les tensioactifs sont des excipients fréquemment rencontrés car ils ont la capacité de déstructurer le ciment intercellulaire mais aussi parce qu'eux-mêmes, de part leur nature amphiphile, peuvent traverser la barrière cutanée (35).

En conclusion, aucun excipient ne peut être officiel, l'excipient idéal ne peut se définir que par rapport au principe actif auquel il est associé.

3.2.7. Influence de la forme galénique

En ce qui concerne la pénétration cutanée des substances actives, la forme galénique est presque aussi importante que la nature du ou des véhicules.

Selon le désir des industriels de faire pénétrer ou non leurs principes actifs, ceux-ci vont élaborer diverses formulations.

En effet, le choix d'une formulation n'a pas pour unique but d'augmenter la pénétration des substances actives jusqu'à leurs cibles mais d'optimiser l'efficacité de la thérapeutique en tenant compte de la pathologie ainsi que du mécanisme d'action de la substance active (46).

Les émulsions sont des dispersions d'un liquide dans un autre, les deux liquides étant non miscibles entre eux.

Elles sont constituées d'une phase dispersée ou interne ou discontinue et d'une phase dispersante ou externe ou continue. On parle d'émulsion hydrophile dans lipophile (H/L) ou lipophile dans hydrophile (L/H) (35).
Les émulsions H/L ont un effet plus occlusif que les émulsions L/H (2). Elles augmentent l'hydratation cutanée en diminuant la perte insensible en eau. La pénétration cutanée des substances actives est augmentée à son tour.
Wepierre et al. ont observé que lorsque l'eau contenue dans ces émulsions commence à s'évaporer, apparaît une coalescence des gouttelettes lipidiques qui forment finalement un film occlusif continu (3).
Les émulsions multiples (L/H/L ou H/L/H) sont des dispersions d'émulsions et peuvent conduire à une libération prolongée de la substance active.

Les microémulsions, quant à elles, sont des dispersions dont la taille des particules est comprise entre 10 et 100 nm et contiennent une forte proportion de tensioactifs (10 à 30%). Ce sont des promoteurs d'absorption (35).

Les gels hydrophiles déposent un film de polymère à la surface de la peau mais ceci n'est pas suffisant pour faciliter l'absorption. C'est pourquoi ils contiennent souvent une assez forte proportion d'éthanol ce qui permet une meilleur effraction de la barrière cutanée (35).

Les liposomes sont des vésicules sphériques fermées constituées de bicouches lipidiques entourant un cœur aqueux.
Ils transportent ainsi les principes actifs hydrophiles dans le cœur aqueux et les substances lipophiles au sein des bicouches de phospholipides. En s'insinuant entre les cornéocytes grâce à leur affinité pour le ciment intercellulaire lipophile, ils aident considérablement au franchissement de la barrière (35).

3.2.8. Evaporation

Lorsque des crèmes ou des lotions contenant une certaine proportion d'eau sont appliquées à la surface de la peau, l'eau s'évapore rapidement après application (3).
Le taux d'évaporation des composants volatiles dépend de l'humidité et de la température du milieu extérieur, de la température de la peau et de la quantité appliquée (3).
A la surface de la peau restera donc une fine pellicule contenant principalement des résidus non volatiles (3).
Higuchi et al. ont montré que lorsqu'on limite l'évaporation de ces solvants volatiles (par occlusion par exemple), l'absorption cutanée était assez faible. Au contraire, sans occlusion, le taux de pénétration était proportionnel à la quantité de solvants volatiles présents dans la formulation (46).

Ceci montre que l'évaporation permet une augmentation de la concentration des substances actives à la surface de la peau ce qui augmente leur pénétration.

3.2.9. Température et humidité

Lorsque la température cutanée est élevée, elle favorise la diffusion à travers la couche cornée. En effet, en créant une vasodilatation, le flux sanguin superficiel et la résorption par le système capillaire du derme se trouvent augmentés, ce qui pourrait conférer à la molécule un effet systémique (19,35,46). Cet effet sera plus important pour les molécules ayant déjà une forte pénétration cutanée.

3.2.10. Durée d'exposition

Dès qu'une substance est appliquée à la surface de la peau, le taux de pénétration devient rapidement très important. Puis elle s'accumule dans le *stratum corneum* qui se sature et le flux diminue. Même si l'exposition à une substance est relativement courte (de l'ordre de quelques minutes), la pénétration en elle-même peut durer une journée voire plus (46).

3.2.11. Pathologies cutanées (ichtyose, psoriasis, dermatite atopique)

Certaines maladies de peau peuvent avoir une influence sur les propriétés de la couche cornée par une altération la composition des protéines, lipides ou encore une anomalie de prolifération des kératinocytes (26).

La dermatite atopique se caractérise par une anomalie de maturation des lipides, notamment des céramides. Ceci modifie la structure des bicouches membranaires ce qui augmente la perte insensible en eau et la sécheresse cutanée.

La fonction barrière serait ainsi diminuée d'environ 10 fois (26).

Lors d'une exposition à des solvants organiques, la fonction barrière diminue par altération voire disparition des lipides. En réponse à cette agression, la synthèse d'ADN augmente, ce qui induit une hyperprolifération des kératinocytes (26).

Ce même mécanisme se retrouve dans les pathologies telles que l'ichtyose (hyperkératose due à une hyperprolifération ou à un défaut de desquamation) ou encore le psoriasis, où l'on peut observer de nombreuses plaques de cellules mortes, dues à une desquamation excessive.

Concernant le psoriasis, le temps de renouvellement de l'épiderme ne serait que de 3 à 4 jours.

Chez le psoriasique, la PIE est 20 fois plus importante que chez les personnes « saines ».

Ces patients doivent ainsi être très attentifs à la nature des produits qu'ils appliquent sur leur peau, sachant qu'ils sont exposés à un gros risque de passage des molécules dans le sang.
Cependant, un des traitements majeurs de ces pathologies est la corticothérapie locale. Sur une peau fragilisée, les corticoïdes pénètrent immédiatement et se retrouvent ainsi dans la circulation sanguine, engendrant à long terme des effets néfastes bien connus…

3.3. Méthodes de mesure

Les méthodes de mesure de l'absorption cutanée sont multiples et sont réalisées *in vivo* chez l'homme ou l'animal et *in vitro*, grâce aux cultures de cellules qui permettent de reconstituer des modèles de peaux.
Elles permettent de connaître la quantité de substances ayant pénétré dans l'organisme, la quantité stockée dans les couches cutanées et celle ayant atteint le compartiment sanguin.
Elles permettent aussi d'évaluer une réponse biologique par rapport à un principe actif donné, l'influence d'un véhicule donné, l'évaluation de la qualité de la barrière cutanée selon l'état de la peau… (1).
En raison des très petites quantités absorbées, toutes ces méthodes réclament des techniques de dosage très puissantes avec une précision extrême.

3.3.1. *In vivo*

3.3.1.1. Dosage dans les excreta

Ce fut la première méthode utilisée pour mesurer l'absorption chez l'homme *in vivo*, notamment des dermocorticoïdes, grâce à l'utilisation du marquage radio-isotopique.
Elle consiste à appliquer sur la peau une très faible quantité de la substance étudiée en solution acétonique et à recueillir ensuite la totalité des urines émises durant 120 heures, couvrant ainsi toute la durée de l'absorption.
On établit ensuite la courbe des quantités excrétées dans l'urine (en pourcentage de la dose appliquée) en fonction du temps (1).
Un facteur correctif est ensuite introduit car une certaine proportion de substance peut avoir été captée ou métabolisée par les tissus cutanés avant de parvenir au plasma.

Pour cela, on mesure la quantité de substance retrouvée dans les urines pendant les 120 heures suivant son injection IV.
Le facteur s'exprime par le rapport « excrétion urinaire par voie percutanée/excrétion urinaire par voie IV ». Ce facteur est dénommé : « biodisponibilité absolue par voie topique » (1,46).

Cette méthode apporte donc deux informations :
- le pourcentage de la quantité appliquée éliminé dans les urines.
- le pourcentage de la quantité appliquée retenu et/ou métabolisé dans la peau (1,43).

Cependant, cette méthode reste peu utilisée à cause de la nécessité d'injecter par voie IV les substances testées et du risque d'effet systémique que cela comporte (1).

3.3.1.2. Suivi du taux plasmatique

Au fur et à mesure de l'absorption cutanée, la concentration plasmatique de la substance appliquée augmente.
Le taux plasmatique représente la différence entre ce qui entre dans le compartiment plasmatique et ce qui en sort par fixation tissulaire et élimination notamment urinaire (1).
Il existe un flux de transfert du derme vers le plasma. Si on admet qu'il est proportionnel à ce qui est entré dans l'épiderme vivant (donc une absence de rétention dans la peau), il est aussi, comme le flux d'absorption, proportionnel à la surface d'application, à la quantité appliquée, aux coefficients de partage et de diffusion (1).
En raison des très faibles concentrations plasmatiques (les faibles quantités absorbées se retrouvant diluées dans le compartiment sanguin), la méthode requiert l'utilisation d'isotopes radioactifs ou de méthodes analytiques très sensibles et une bonne absorption.

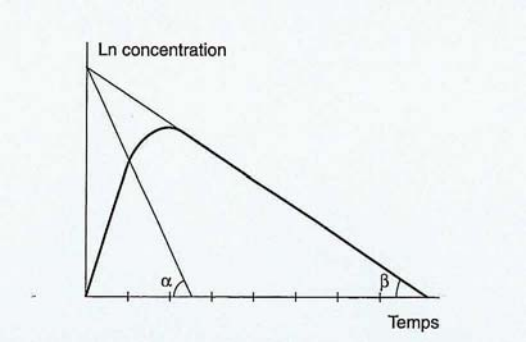


Figure 36 : Cinétique de la concentration sanguine suite à une absorption percutanée, en coordonnées semi-logarithmiques
(AGACHE, 2000)

3.3.1.3. Mesure de l'effet local

Cette méthode permet de suivre la réponse physiologique après application d'une substance sur la peau.

L'inconvénient évident de cette méthode est qu'elle est limitée aux substances qui provoquent des effets physiologiques et pouvant être mesurés facilement et exactement (19).

Les principaux effets analysés sont : pour les esters nicotiniques, l'érythème ou l'élévation de température cutanée ; pour les dermocorticoïdes, la vasoconstriction et le blanchiment de la peau ; pour les anesthésiques locaux, la diminution de sensibilité cutanée (1).

Les données obtenues sont : le délai de l'apparition de l'effet, son intensité maximale et le délai pour l'obtenir, la durée de l'effet et l'aire sous la courbe effet/temps (1,43).

3.3.1.4. Disparition d'un isotope radioactif

On marque la substance analysée par un isotope radioactif (carbone 14 ou tritium) puis après son application sur la peau, on mesure le rayonnement radioactif émis grâce à un compteur.

La diminution progressive de l'émission du rayonnement émis permet de suivre la pénétration de la substance et de mesurer la vitesse d'absorption (1,43).

Cependant, lors d'essais avec certaines substances comme la caféine, la radioactivité mesurée après 24h d'exposition fut trouvée égale à la somme des émissions radioactives des 15 à 20 strippings réalisés au même endroit (1).

Cela montrerait donc que la méthode mesure probablement le contenu stocké dans le *stratum corneum* plutôt que l'absorption proprement dite (1).

3.3.1.5. Bulle de succion

Cette méthode, mise au point en 1967 par Kiistala, consiste à appliquer sur la peau une cellule dans laquelle on crée une dépression de 200 à 300mm Hg que l'on maintient pendant 2 à 4 heures. La bulle (phlyctène) va alors apparaître à la jonction dermo-épidermique et contient du liquide interstitiel.

Une trentaine de bulles est créée au niveau de l'avant bras du sujet ; le volume de liquide recueilli est de 50 à 150 µL par bulle.

Toutefois, la bulle forme un compartiment distinct du derme superficiel avec lequel les échanges sont quelque peu freinés.

En effet, le liquide contenu dans la bulle est moins sujet à la convection sanguine que le liquide intercellulaire (1).

L'application du topique ne doit se faire qu'une fois la bulle complètement formée afin d'éviter une augmentation du passage par aspiration.

Ensuite, le liquide contenu dans la bulle est aspiré et on mesure la quantité de principe actif ayant pénétré.
Cette quantité correspond à la pénétration jusqu'au derme superficiel.
La technique des bulles de succion permet donc de mesurer la biodisponibilité sous-épidermique d'un principe actif (1).
Cette technique peut également être utilisée pour doser la concentration extracellulaire de médicaments administrés par voie orale.

Cependant, cette technique comporte certains inconvénients :
- le temps de décollement dermo-épidermique est plus court chez les personnes âgées mais le temps de remplissage de la bulle est plus long.
- cette technique laisse une dépigmentation temporaire qui interdit toute réutilisation de la zone pendant un certain temps.
- le liquide obtenu est de nature protidique et pourra nécessiter une extraction s'il doit être analysé en CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance).

3.3.1.6. Microdialyse

Une sonde est insérée sous anesthésie locale dans le derme, parallèlement à la surface de la peau, et est perfusée par un liquide séparé du milieu extracellulaire par une membrane perméable aux molécules de poids moléculaire inférieur à 20000 Daltons (1).
Le topique est appliqué environ 1 heure après insertion de la sonde et à distance de son point d'insertion.
La sonde est connectée à une micro-pompe ; il se produit alors une diffusion vers le derme de solutions physiologiques type Ringer tandis que les substances de faible poids moléculaire du tissu interstitiel diffusent vers le dialysat et sont ainsi collectées.
La microdialyse fait donc intervenir des phénomènes dynamiques de diffusion : lorsque le liquide de perfusion arrive au niveau de la membrane semi-perméable, un gradient de concentration s'instaure et la molécule étudiée passe alors du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré.
On peut ainsi suivre les concentrations dermiques de la substance appliquée sur la peau (1).
Cette technique permet ainsi d'évaluer la biodisponibilité dermique d'un principe actif.
Elle a l'avantage de permettre d'extraire des substances chimiques contenues dans le fluide extracellulaire sans extraire le liquide (1).
Cependant, la microdialyse comporte quelques limites : elle nécessite l'utilisation de techniques analytiques adaptées aux faibles volumes recueillis (quelques dizaines de µL).

3.3.1.7. Dosage dans le *stratum corneum*

Il s'agit en fait de la méthode de stripping : après application de la substance durant 30 minutes et lavage soigneux de la peau afin d'en éliminer l'excès, on réalise 15 arrachages successifs du *stratum corneum* au moyen d'un ruban adhésif.

Puis on y dose le principe actif recherché.

Cette méthode est une des plus simples et est très souvent utilisée pour les molécules sensées diffuser librement au sein de la couche cornée (1,43,46).

3.3.1.8. Mesure de la quantité disparue (méthode des différences)

Elle consiste à mesurer, à intervalles réguliers, la quantité de principe actif disparaissant de la surface cutanée.

Par différence avec la quantité appliquée, on obtient la quantité ayant pénétré dans le *stratum corneum* (1,43).

Cette méthode ne nécessite pas le recours à des radio-isotopes si l'on dispose d'une technique de dosage suffisamment sensible pour mesurer de faibles quantités (CLHP, spectrophotométrie, chromatographie en phase gazeuse) (1).

3.3.2. *In vitro*

Afin d'éviter l'utilisation abusive d'animaux de laboratoire ainsi que l'exposition de volontaires à une éventuelle toxicité des substances appliquées, les chercheurs ont mis au point de nouvelles techniques d'étude d'absorption cutanée.

Le but de ces études *in vitro* est donc de prédire l'absorption cutanée *in vivo*.

Ces techniques *in vitro* utilisent de la peau reconstruite grâce à des cultures cellulaires ou des résidus de peau humaine issus de la chirurgie esthétique.

3.3.2.1. Protocole

Une méthode *in vitro* officielle de mesure de la pénétration cutanée a été proposée par le SCCNFP (Scientific Committee of Cosmetic and Non Food Products) (35).

Cette méthode utilise des fragments de peau humaine (abdomen ou sein) ou de porc jeune.

Après avoir contrôlé l'intégrité de la peau par mesure de la PIE, la peau est rasée si nécessaire puis lavée à l'aide d'une solution de laurylsulfate de sodium à 1% et séchée. Le montage se fait sur une cellule de diffusion (cellule de Franz) et environ 400 µg de principe actif sont déposés de façon régulière à la surface de la peau.

Le compartiment récepteur est rempli d'un liquide dont la composition varie selon la nature de la molécule à étudier : solution de NaCl à 0,9% pour une molécule hydrophile, mélange d'eau et de sérum albumine ou d'eau et d'un tensioactif non ionique pour une molécule lipophile.
De plus, la solubilité du principe actif dans le compartiment récepteur ne doit pas excéder 10% (46).
La cellule est placée au bain-marie à 37°C ce qui permet d'obtenir une température de 32°C au niveau de la peau.
On prélève aux temps T_{1h}, T_{3h}, T_{6h}, T_{24h} une partie du liquide récepteur dans lequel on dose la molécule à étudier, généralement par CLHP.
Le liquide prélevé est systématiquement remplacé par une quantité équivalente (35).
Le prélèvement peut se faire de façon ponctuelle ou continue (46).
Ceci permettra d'analyser la quantité de substance ayant traversé l'échantillon de peau.

Cependant, d'autres analyses seront faites car une substance peut avoir été absorbée par la peau et ne pas se retrouver jusque dans le compartiment récepteur :
- étude de la quantité de principe actif restant à la surface de la peau : l'échantillon est placé sur une surface dure et est essuyé à sec à l'aide d'un tampon de coton qui sera analysé par scintillation liquide (43).
- étude du compartiment couche cornée : on réalise environ 20 strippings et les prélèvements seront analysés par mesure de la radioactivité (43).
Cependant, cette technique doit être appliquée assez rapidement après application de la substance. En effet, des chercheurs ont montré que la concentration d'hydrocortisone dans le derme était plus élevée lors des tests *in vitro* plus de 4 heures après application.
Ceci suppose que les vaisseaux sanguins cutanés (absents dans les coupes de peaux utilisées *in vitro*) jouent un rôle important dans la pénétration cutanée (46).
- étude du compartiment épidermique et dermique : après stripping, de petites biopsies rondes de 5 à 7mm de diamètre sont faites sur l'échantillon de peau puis congelées.
On effectue ensuite des coupes de ces biopsies à l'aide d'un microtome. 16 coupes de 10 µm d'épaisseur permettent de prélever le derme et l'épiderme supérieur.
Le derme sera enfin débité en coupes de 40 µm jusqu'à épuisement de la biopsie (43).

L'intégrité de la préparation devra être vérifiée régulièrement.
Etant donné que la pénétration d'une substance est généralement limitée par la couche cornée, diverses méthodes ont été mises au point afin de pouvoir séparer le derme de l'épiderme et n'étudier que ce dernier (43,46).
Ces méthodes peuvent se répartir en 3 groupes :
- les méthodes physiques : grattage, étirement, succion, chaleur.

- les méthodes chimiques : chlorure d'ammonium, cantharidine, acide acétique…
- les méthodes enzymatiques : trypsine, élastase, collagénase…

La meilleure méthode sera celle qui provoquera le moins possible d'altérations morphologiques et biochimiques (43).

3.3.2.2. Comparaison avec les études *in vivo*

De nombreuses recherches furent réalisées afin de savoir si, au final, ces méthodes d'analyse *in vitro* de pénétration cutanée étaient aussi fiables que les mesures *in vivo*.
Une étude récente concernant l'absorption cutanée de l'acide benzoïque, de la caféine et de la testostérone a montré que pour les substances hydrophiles telles que la caféine, les pourcentages d'absorption *in vivo* et *in vitro* étaient comparables.
Par contre, ceux-ci diffèrent pour les substances plus hydrophobes.
Ceci conduit à penser que les substances lipophiles pénètrent moins car le derme, couche cutanée très aqueuse, offre une barrière imperméable à ces composés. De plus, lors des études *in vitro,* il est moins irrigué, ce qui diminue le flux sanguin permettant la diffusion des substances (46,55).
Le derme joue alors son rôle de réservoir en diminuant le passage jusqu'au compartiment récepteur (56).

Ceci fut démontré lors de nombreuses études de comparaison *in vivo*/*in vitro* : l'étude de Ropper et al. concernant le phénoxyéthanol en 1998, l'étude de Moss et al. en 2000 sur le triclosan, l'étude de Meuling et al. en 2002 portant sur la caféine.
En effet, les chercheurs pensent que les composés lipophiles ont une pénétration plus faible que les autres car ils seraient retenus par le *stratum corneum* et subiraient un « effet réservoir » plus important.
Cependant, cette rétention existe également pour les structures protéiques qui possèdent des sites de liaisons à la surface cutanée (56).

Une étude réalisée en 2005 (« Vehicle effects on percutaneous absorption…) a comparé l'absorption cutanée de 3 molécules (caféine, acide benzoïque et testostérone) contenues dans 3 véhicules différents (vaseline, éthylène glycol et eau) selon une méthode *in vivo* et *in vitro*.

L'étude *in vitro* est réalisée sur un échantillon de peau abdominale humaine, monté sur une cellule de diffusion. L'échantillon est constitué de l'épiderme et du derme papillaire. La température de la surface cutanée est maintenue à 32°C.

L'étude *in vivo* est réalisée chez des hommes volontaires à qui l'on applique les substances testées sur 2 surfaces de l'abdomen, au-dessus de l'ombilic.
Les substances étudiées sont marquées à la radioactivité et les urines recueillies durant 32 heures.
Pour l'étude *in vitro*, on prélève régulièrement le milieu récepteur et son taux de radioactivité est analysé.
Afin d'appliquer le facteur correctif tenant compte de la dilution plasmatique ou du métabolisme, on administre les substances par voie IV et l'on recueille également les urines (9).

L'étude montre que les pourcentages d'absorption des substances pour un véhicule donné diffèrent peu entre les 2 méthodes :
- acide benzoïque : dans la vaseline, le pourcentage d'absorption cutanée est de 46,5% *in vitro* et de 60,6% *in vivo*.
- caféine : dans la vaseline : 40,6% *in vitro* et *in vivo*. Dans l'éthylène glycol : 32,2% *in vitro* et 55,6% *in vivo*. Dans l'eau : 5,1% *in vitro* et 4% *in vivo*.
- testostérone : dans la vaseline : 39,4% *in vitro* et 49,5% *in vivo.* Dans l'éthylène glycol : 23,7% *in vitro* et 36,3% *in vivo*. Dans l'eau : 41,4% *in vitro* et 49,2% *in vivo* (9).

Même si ces pourcentages diffèrent peu, on remarque que les taux de pénétration sont légèrement inférieurs *in vitro*, et ce pour toutes les molécules.
Exception faite de la caféine contenue dans l'eau.
Ceci pourrait être dû à la température de la surface cutanée.
En effet, lors des tests *in vitro*, la surface de la peau est maintenue à 32°C alors que *in vivo*, celle-ci peut légèrement augmenter à cause des vêtements et de la température corporelle ce qui favorise l'absorption cutanée (9).
Il peut également y avoir quelques imprécisions lors de l'introduction du facteur correctif *in vivo*.
Cependant, ces divergences restant minimes, on peut dire que les études *in vitro* sont d'excellents moyens de prédire l'absorption *in vivo*.

3.4. Stratégies pour altérer la fonction barrière

Lorsqu'un laboratoire ne désire pas obtenir une action de surface pour son principe actif mais une pénétration dans les couches de l'épiderme, il va devoir recourir à diverses techniques permettant d'améliorer le franchissement de la barrière cutanée.
Il pourra intervenir sur la nature physico-chimique de la molécule, sur le véhicule, la formulation…

Voyons plus en détails les processus altérant la fonction barrière de la peau.

3.4.1. Substances chimiques : véhicules promoteurs d'absorption ou « enhancers »

Le terme d' « enhancer » définit un composé qui facilite l'absorption percutanée, en augmentant la solubilité ou la diffusion d'une substance au sein du *stratum corneum*.
Ces « accélérants » pénètrent dans la couche cornée et abaissent sa résistance à la pénétration.
Une des meilleures substances permettant d'accélérer l'absorption cutanée est l'eau. En effet, l'apport externe d'eau permet d'en augmenter sa teneur au sein du *stratum corneum* qui voit alors sa perméabilité multipliée par 10 (45).

Un des promoteurs les plus connus est le DMSO (diméthylsulfoxyde), solvant aprotique dipolaire.
Il s'est révélé être le plus puissant puisqu'il est capable de multiplier la pénétration de l'eau *in vivo* par 20 (45).
De nombreuses propositions concernant son mécanisme d'action on été émises :
- Idson pensait qu'il endommagerait la couche cornée.
- il est fortement hygroscopique : sa présence dans la couche cornée augmente de façon importante son hydratation et donc sa perméabilité (19).
- l'inflammation du derme et la chaleur produite par l'interaction DMSO-eau dans la couche cornée élèvent légèrement la température (19).
- c'est un agent gonflant qui diminue la résistance à la diffusion de la couche cornée (19).
- il dénature les lipides de la couche cornée ainsi que les phospholipides intracellulaires plus profonds.

Ceci engendre une élévation de la vitesse de la perte d'eau transépidermique, preuve d'une altération de la barrière (19,46).
Actuellement, son utilisation est restreinte à cause de son action irritante, de son odeur désagréable et de sa toxicité oculaire.

Les solvants organiques comme le méthanol, l'éther, l'acétone, l'éthanol… dénaturent le *stratum corneum* en agissant sur les phospholipides.
Des mélanges éthanol-éther sont capables d'extraire 10 à 20% des lipides de la couche cornée, la transformant ainsi en une membrane poreuse non sélective (45).

Certaines substances peuvent augmenter la perméabilité cutanée en modifiant la structure de la kératine.
Il s'agit de l'acide salicylique, l'urée, l'allantoïne et l'acide lactique (45).
L'acide salicylique est kératolytique ; les autres agissent en ramollissant et en hydratant la kératine (45).

Plus récemment et de loin les plus utilisés, sont apparus les tensioactifs.
Ils se divisent en deux groupes : les tensioactifs ioniques et non ioniques.

On distingue au sein du premier groupe les tensioactifs anioniques et cationiques.
Ils peuvent réagir avec certains principes actifs ionisables pour donner des paires d'ions susceptibles d'être mieux absorbés. C'est le cas du laurylsulfate de sodium et des principes actifs basiques (19).
Les tensioactifs anioniques semblent plus aptes à favoriser la pénétration de substances hydrosolubles de part leur capacité à augmenter la perméabilité de la peau à l'eau (19).
Ils se lient fortement aux protéines cutanées dont la kératine, et dénaturent les lipides intercellulaires, d'où un pouvoir très irritant.
Le sodium dodecyl sulfate (SDS), surfactif anionique, pourrait interrompre la synthèse des bicouches lamellaires de la couche cornée (46).

Ils sont donc devancés par les tensioactifs non ioniques, non irritants (3,19,46).
Ils ont des actions inverses selon leur concentration dans la formulation.
A très faible dose, ils favorisent le contact formulation-peau en diminuant la tension superficielle à l'interface.
A plus forte dose, ils peuvent complexer les principes actifs (19).
Ce sont des composés non volatiles et leur concentration augmente au fur et à mesure de l'évaporation des constituants volatiles.

Les acides gras insaturés diminuent la fonction barrière en augmentant la PIE.

Dans tous les cas, mis à part les solvants qui dénaturent la peau, aucun excipient ne pourra faire pénétrer un principe actif au travers de la peau si celui-ci ne possède pas les propriétés physico-chimiques nécessaires à son absorption.

3.4.2. L'occlusion

Comme nous l'avons vu, l'occlusion diminue la perte en eau et va donc augmenter sa teneur au sein du *stratum corneum.*
Les cornéocytes « gonflent » et deviennent alors hyperperméables, ce qui multiplie l'absorption par 10 (45,46).

Cette occlusion est rarement réalisée par recouvrement de la surface traitée (sauf par les vêtements ou les couches chez les nouveaux-nés) mais par des excipients occlusifs tels que la vaseline, l'huile de vaseline, les paraffines, cires (35)…

3.4.3. Méthodes physiques

La méthode de stripping consistant à réaliser des arrachages successifs du *stratum corneum* au moyen d'un ruban adhésif, altère l'intégrité de la couche cornée et augmente la perméabilité de la peau (46).
Bien sûr, cette méthode n'est pas utilisable lors de l'utilisation courante de produits cosmétiques mais permet d'apprécier la quantité maximale de principe actif capable de pénétrer à travers la peau.

2° PARTIE :

LES COSMETIQUES ET LEUR ABSORPTION PERCUTANEE

I. LEGISLATION CONCERNANT LES COSMETIQUES

Selon la définition établie par la Commission Economique Européenne, un produit cosmétique est une substance ou une préparation destinée à être mise en contact avec différentes parties superficielles du corps (épiderme, cheveux, ongles, lèvres, organes génitaux externes) ou avec les dents ou les muqueuses de la cavité buccale en vue de les nettoyer, parfumer, modifier l'aspect et/ou corriger les odeurs corporelles et/ou les protéger ou les conserver en bon état (http://ec.europa.eu/health/index_en.htm).

De plus, un produit cosmétique ne doit pas nuire à la santé humaine lorsqu'il est appliqué selon des conditions normales d'utilisation.
En effet, s'il est concevable qu'un médicament puisse avoir des effets secondaires à condition d'être efficace contre la maladie pour laquelle il est preconisé, il est impossible de l'imaginer pour un cosmétique dont la vocation essentielle est de prolonger l'équilibre physiologique naturel sans modifier les fonctions de l'organisme.

Ainsi, un produit cosmétique se distingue d'un produit dermatologique à usage thérapeutique qui a obtenu une AMM (Autorisation de Mise Sur le Marché) et qui, de ce fait, relève de la législation des médicaments.
Malgré la définition précédente, il semble illusoire de penser que les cosmétiques ne franchissent pas la barrière cutanée.
En effet, la fonction « barrière » de la peau n'est pas absolue, celle-ci étant perméable à presque toutes les substances, seul le degré de perméabilité étant variable.
Ainsi, comment une crème amincissante agissant au niveau de l'hypoderme pourrait-elle avoir une efficacité si elle ne pénétrait pas plus loin que le *stratum corneum ?*

Cependant, certaines molécules traversant facilement les différentes couches cutanées peuvent se retrouver dans la circulation générale d'où l'importance de connaître la réalité et les proportions de ce passage.
En effet, cela permet d'une part d'évaluer l'importance de la fraction de la dose appliquée réellement absorbée et disponible pour exercer une activité, et d'autre part de préciser d'éventuelles

concentrations localisées dans les structures cutanées et pouvant constituer des sites de stockage de substances actives (http://www.univ-lille2.fr/medtrav2000).

C'est pourquoi je me suis intéressée au passage de molécules appartenant à trois grandes familles de cosmétiques :

- les actifs amincissants : pénètrent-ils jusqu'aux couches graisseuses de la peau afin d'y exercer leur action lipolytique?
- les actifs anti-rides : permettent-ils de combler les rides les plus profondes situées au niveau du derme ?
- les filtres solaires : créent-ils l'effet barrière attendu ou pénètrent-ils plus profondément ?

II. LES SUBSTANCES AMINCISSANTES

2.1. Rappels de physiologie

2.1.1. Les adipocytes et leur localisation

Les adipocytes, cellules graisseuses de l'organisme, sont localisés dans l'hypoderme, couche la plus profonde de la peau.
Regroupés en amas, ils forment alors des lobules adipeux arrondis (45).
Ils contiennent une grosse vacuole lipidique, remplissant presque entièrement le cytoplasme, qui contient les triglycérides synthétisés par la cellule (45).
Le rôle principal de ces cellules est de constituer une réserve d'énergie pour l'organisme grâce à l'hydrolyse des triglycérides qu'elles contiennent.

2.1.2. La cellulite

Principale cible des substances amincissantes, la cellulite est encore appelée « panniculopathie oedémato-fibroscléreuse » ou « lipodystrophie ».
Elle donne à la peau un aspect irrégulier et bosselé appelé « peau d'orange ».
En effet, chez la femme, les lobules adipeux sont délimités par des cloisons perpendiculaires à la surface de la peau qui pénètrent dans le derme. Lorsque les adipocytes augmentent de volume, elles pénètrent d'avantage ce qui crée cet aspect bosselé (35,36).
Elle est la conséquence de plusieurs phénomènes concomitants :

- ✓ une augmentation du volume et du nombre des adipocytes sous la dépendance des oestrogènes ainsi qu'une augmentation de leurs acides gras saturés par rapport aux insaturés.
- ✓ une détérioration du tissu conjonctif environnant : autour des capillaires et des adipocytes se dessine un réseau irrégulier de fibrilles de collagène, abondantes et épaissies. On parle alors de fibrose.
- ✓ une altération du réseau vasculaire profond : troubles de la perméabilité et formation d'œdèmes, accumulation d'eau et de toxines (http://www.objectif-equilibre-sante.info/).

Plusieurs localisations sont possibles : cuisses, fesses, ventre, hanches, face interne des genoux et des bras.

2.1.2.1. Stades et évolution

- Stade congestif : les cellules graisseuses plus nombreuses sont en amas, encapsulées par des fibres de collagène solubles mais de densité plus grande.
- Stase : les amas graisseux fusionnent entre eux et forment des micro-nodules.

Les fibres de collagène se densifient, ne sont plus solubles et compriment les capillaires sanguins ainsi que les terminaisons nerveuses.

Ce phénomène explique la création de zones froides et la sensation douloureuse au toucher.

La compression lymphatique sera quant à elle responsable de l'œdème.

- Sclérose : formation de nodules graisseux contenant des graisses peroxydées jaunâtres.

Le collagène se rigidifie encore et comprime les faisceaux vasculaires et nerveux.

2.1.2.2. Etiologie

Les causes de la cellulite sont mal définies mais on retrouve principalement :

- une origine hormonale : les œstrogènes augmentent le volume des adipocytes et la rétention hydrique, c'est pourquoi les femmes sont bien plus prédisposées à cette pathologie que les hommes.

Un dérèglement hormonal suffira à déclencher ce phénomène (35).

- une origine neurovégétative : les catécholamines agissent sur le métabolisme lipidique en modifiant la lipolyse.

Ainsi, l'adrénaline diminuerait la lipolyse de certains adipocytes, ce qui conduirait à un stockage des graisses plus important (35).

- une origine circulatoire : le premier stade de la cellulite, pourtant invisible à l'œil nu, débute par une stase veineuse et lymphatique avec dilatation des capillaires.

Ainsi, une mauvaise circulation veineuse pourrait être à l'origine de ce problème, favorisée par la station assise, le croisement des jambes, l'affaissement de la voûte plantaire…(35)

- une théorie de récepteurs adipocytaires : de type adrénergiques, ils sont de type α (diminuant la lipolyse) et de type β (stimulant la lipolyse).

Lors du développement de la masse adipeuse, on assiste à une augmentation de la sensibilité des récepteurs α, ce qui favorise le stockage des graisses et auto-entretient le phénomène.

De plus, le nombre de récepteurs β ainsi que leur sensibilité diminuent après la ménopause, d'où la tendance à l'embonpoint après cet âge (35).

2.2. Divers principes actifs et leur mécanisme d'action

Les différentes approches dans la recherche d'efficacité des produits amincissants sont dictées par les multiples évènements biologiques liés à l'apparition de la cellulite.
Ainsi, les différents produits amincissants auront trois cibles : le tissu adipeux, le tissu conjonctif et le réseau capillaire.
Toutefois, il demeure pertinent de considérer des combinaisons d'ingrédients actifs afin de rechercher des effets additifs ou synergiques, soit par action sur une même voie métabolique, soit par action sur des voies métaboliques complémentaires (36).

2.2.1. Substances limitant la lipogenèse

- La sphingosine inhibe la capture du glucose par l'adipocyte via les transporteurs GLUT-1 et GLUT-4.

En effet, le glucose étant l'un des substrats de base nécessaire à la synthèse des triglycérides, sa capture va alors entraîner une baisse de synthèse lipidique (35).
L'extrait de phloridzine issu de jeunes branches de pommier limite le stockage des graisses dans l'adipocyte et par conséquent la multiplication adipocytaire et le développement du tissu cellulitique.
En effet, il bloque l'entrée du glucose dans les cellules graisseuses en inhibant le fonctionnement et la multiplication des transporteurs de glucose situés sur la membrane cellulaire (http://www.elancyl.fr).

- Les sels de rutine sont des antagonistes du glucose (35).
- La protamine ou le sulfate de protamine inhibent la lipoprotéine lipase qui hydrolyse les lipoprotéines circulantes riches en triglycérides pour produire des acides gras (28).
- Les triterpènes contenus dans certains extraits végétaux bloqueraient la transformation des pré-adipocytes en adipocytes (35).

2.2.2. Substances favorisant la lipolyse

- Activation de la synthèse de l'AMP cyclique : l'AMPc va stimuler la phosphorylation d'une lipase hormonosensible par la protéine kinase A (PKA) ce qui va lui permettre d'hydrolyser les triglycérides en diglycérides et acides gras libres. Puis les diglycérides sont ensuite transformés en monoglycérides puis en glycérol (28).

De plus, ce médiateur inhibe la transcription du gène de la LPL et de GLUT-4 (36).

Cette action sera permise par la caféine et la théophylline à un moindre degré.

La caféine base, molécule volumineuse et hydrophile est la forme la plus active car directement utilisable par la cellule. La plus grande difficulté consiste à lui faire atteindre sa cible : l'adipocyte.
Les sels de caféine sont quant à eux plus solubles et atteignent plus facilement l'adipocyte mais sont moins actifs car doivent être transformés par la cellule pour agir. Toutefois, ils constituent une forme intéressante de réservoir de caféine (http://www.elancyl.fr).
Les extraits de guarana, kola, *Garcinia cambodgia* ont la même activité (35).

- Activation de l'adénylcyclase : cette enzyme transforme l'ATP en AMPc.

La forskoline stimule l'adénylcyclase et agit donc directement sur l'augmentation de l'AMP_C.
Les oligo-éléments tels le manganèse, magnésium, cuivre, zinc, sélénium catalysent la réaction enzymatique de l'adénylcyclase (35).

- Inhibition de la phosphodiestérase : cette enzyme dégrade l'AMPc en AMP, n'ayant aucune action lipolytique.

Les flavonoïdes de *Gingko biloba* ainsi que les bases xanthiques ont la capacité d'inhiber cette enzyme (35).

- Blocage des récepteurs α_2-adrénergiques : ces récepteurs inhibent la lipolyse.

Cette action est obtenue avec l'escine, la caféine, les extraits de *Gingko biloba* et de *Chrysanthellum indicum* ainsi qu'avec le LIPOFACTOR® (35).

- Blocage des récepteurs NPY : le neuropeptide Y freine la production d'AMPc : en bloquant ses récepteurs, le taux d'AMPc augmente.

Les extraits de fucus ou de frêne peuvent agir à ce niveau (35).

- Activation des récepteurs β-adrénergiques : les extraits d'algues rouges contenant du rhodystérol vont agir à ce niveau et stimuler la lipolyse (35). Il y aura ainsi relargage de glycérol et d'acides gras.

- Blocage des récepteurs à adénosine : ce sont essentiellement les bases xanthiques, qui ont ainsi plusieurs cibles différentes (36).

2.2.3. Substances agissant sur la circulation capillaire

La microcirculation sanguine occupe une place importante dans l'installation de la cellulite : ralentie, elle privilégie le stockage des graisses alors qu'accélérée, elle favorise la lipolyse (36).

Il est nécessaire d'assurer une microcirculation régulière et active pour lutter contre la formation d'œdèmes et limiter l'apparition de la peau d'orange.
L'insuffisance veinolymphatique qui coexiste avec la cellulite et qui se traduit par une stase et une exsudation plasmatique oriente vers l'utilisation d'ingrédients à effet drainant et à propriétés veinotoniques tels que les saponosides et flavonoïdes (36).
Ces substances vont combattre l'infiltration et la rétention d'eau et fortifier le système veineux fragilisé.
Les extraits de lierre contenant de l'hédéragénine, la piloselle, les algues, la prêle ainsi que les extraits de marron d'Inde (escine) seront les substances les plus utilisées (35).

2.2.4. Substances agissant sur le tissu conjonctif

Afin d'améliorer l'état du tissu conjonctif détérioré par l'installation de la cellulite, on utilise les extraits de prêle qui contiennent du silicium, généralement en défaut dans les tissus conjonctifs lésés (35).
Le gel ELANCYL® contient quant à lui l'hespéridine Méthyl Chalcone (HMC) ayant une puissante activité anti-glycation.
En effet, en protégeant les fibres de collagène de l'attaque des sucres, l'HMC évite la rigidification du tissu conjonctif qui conserve ainsi toute son élasticité.
Cette molécule contribue également à l'amélioration de la microcirculation, favorisant un désengorgement de l'environnement tissulaire.
Ainsi, on lui confère un rôle de lissage et de raffermissement visibles par l'amélioration de l'aspect « peau d'orange » (http://www.elancyl.fr).
On retrouve également l'hydroxy-proline, la vitamine E, l'hydrocotyle, l'extrait de maïs et le bio-KP.

La caféine, dont l'activité lipolytique a été démontrée depuis bien des années, est la substance la plus utilisée mais aussi la plus étudiée dans les essais de pénétration cutanée.
Elle sert même de modèle de référence afin d'étudier la pénétration d'autres principes actifs.
Grâce à quelques études, nous allons observer cette pénétration ainsi que les facteurs pouvant l'influencer, tels que la formulation galénique ou les véhicules utilisés.

2.3. Les différentes formes galéniques

2.3.1. Comparaison de la biodisponibilité de différentes formes contenant de la caféine

L'étude « Comparison of cutaneous bioavaibility… » réalisée en 2002 eut pour but d'évaluer l'influence de diverses formulations sur la biodisponibilité de la caféine en utilisant les modèles de peaux EpiDerm® et Episkin® ainsi que la peau humaine (17).
La peau humaine ne comporte que l'épiderme et le derme.
Les formulations utilisées sont : une émulsion eau/huile, une émulsion huile/eau, une solution aqueuse et un hydrogel alcoolique.
Toutes ces préparations contiennent la même concentration en caféine soit 1%.
Après 1 heure de contact avec le milieu récepteur, on dépose les diverses formulations dans les puits à une dose d'environ 10mg/cm^2.
Puis une fraction du compartiment récepteur est prélevée toutes les heures durant 24 heures et analysée en scintillation liquide.

✓ Profil de pénétration pour le modèle Epiderm® : plus de 90% de la caféine appliquée est retrouvée dans le compartiment récepteur lorsque celle-ci est contenue dans les émulsions ou la solution aqueuse.
Ce taux apparait environ 3 à 4 heures après application.
Par contre, seulement 60 % de caféine sont retrouvés pour la forme hydrogel (17).

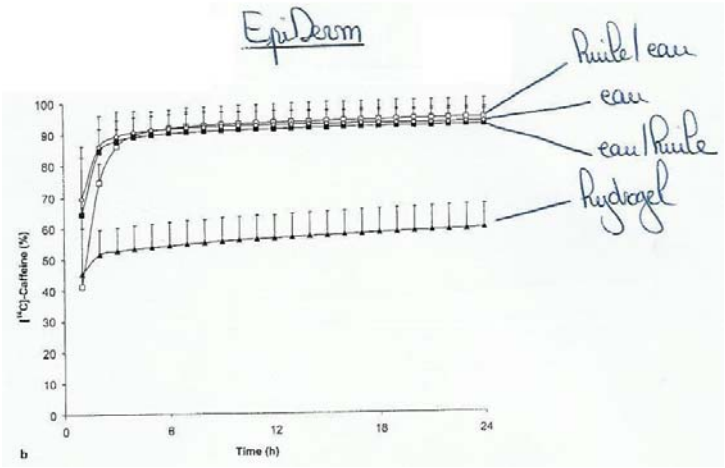


Figure 37 : Profil de pénétration de diverses formulations à travers le modèle de peau EpiDerm®
(DREHER, 2002)

✓ <u>Profil de pénétration pour le modèle Episkin® :</u> tout comme le modèle précédent, la pénétration de la caféine est moins importante avec l'hydrogel qu'avec les autres formulations.

Environ 70 à 80 % de la caféine pénètre lorsqu'elle est contenue dans les émulsions ou la solution aqueuse contre 45% pour l'hydrogel.

60% de la caféine n'est pas absorbée pour la forme hydrogel contre 20-30% pour les autres formulations (17).

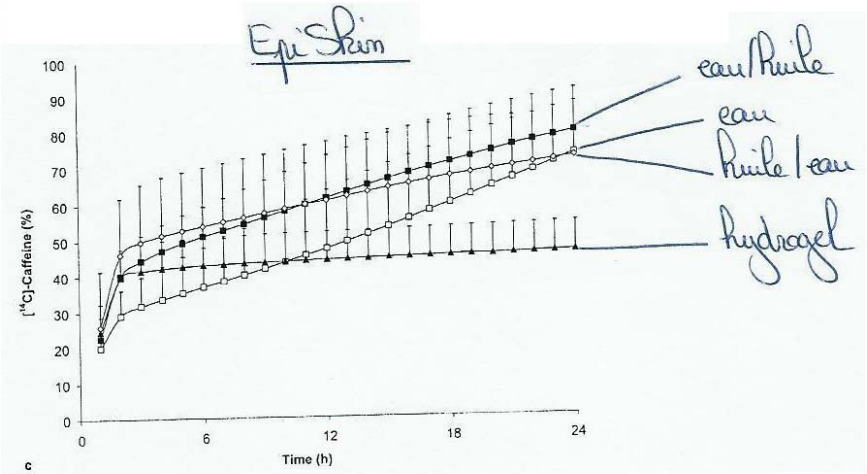


Figure 38 : Profil de pénétration de diverses formulations à travers le modèle de peau EpiSkin®

(DREHER, 2002)

✓ <u>Profil de pénétration pour la peau humaine :</u> seulement 15 à 20% de la caféine appliquée est retrouvée dans le compartiment récepteur. 80% ne sont donc pas absorbés et retrouvés à la surface de la peau 24 heures après.

Le taux de pénétration initiale le plus élevé est celui de la forme hydrogel. Mais ce taux diminue au fur et à mesure de l'expérience (17).

A contrario, le taux de pénétration pour l'émulsion eau/huile augmente au fur et à mesure du temps.

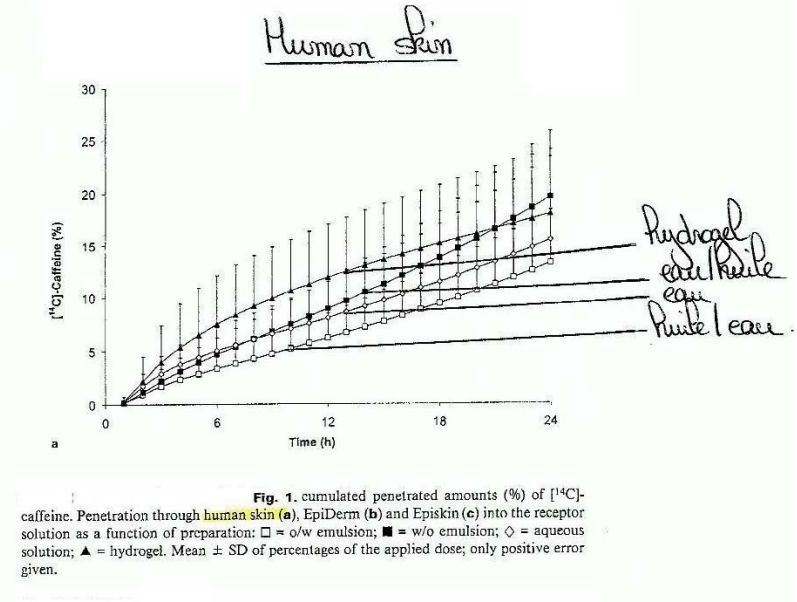


Fig. 1. cumulated penetrated amounts (%) of [^{14}C]-caffeine. Penetration through human skin (**a**), EpiDerm (**b**) and Episkin (**c**) into the receptor solution as a function of preparation: □ = o/w emulsion; ■ = w/o emulsion; ◇ = aqueous solution; ▲ = hydrogel. Mean ± SD of percentages of the applied dose; only positive error given.

Figure 39 : Profil de pénétration de diverses formulations à travers la peau humaine

(DREHER, 2002)

Ainsi, on peut remarquer que la peau humaine est moins perméable à la caféine que les modèles de peau. Ceci prouve les limites de ces modèles, qui ne sont pas tout à fait identique à la peau humaine (différence d'épaisseur du *stratum corneum*, membrane en collagène pour Episkin®, enTeflon pour Epiderm®).

Concernant les différentes formulations, peu de différences de pénétration sont observées, excepté pour la forme hydrogel.

Le type d'émulsion n'a que peu d'influence sur le profil de pénétration de la caféine. Néanmoins, il semblerait que le fait de solubiliser la caféine dans la phase interne augmente son absorption cutanée.

Ainsi, cette molécule étant de nature hydrophile, on pourrait envisager une meilleure pénétration avec une émulsion eau/huile. Quoi qu'il en soit, il semble évident que la molécule atteint sa cible, l'hypoderme, puisqu'après avoir traversé l'épiderme et le derme, on la retrouve dans le compartiment récepteur.

Ainsi, en agissant sur la forme galénique, on va pouvoir optimiser le passage de la caféine jusqu'à son lieu d'action : l'hypoderme.

Cependant, on remarque que 15 à 20% de la caféine appliquée est retrouvée dans le compartiment récepteur. Cela veut dire qu'elle a traversé le derme, riche en vaisseaux sanguins.

Il est donc important de se demander si cette molécule a un passage systémique et quelles seraient les conséquences de ce passage sur l'organisme.
En effet, la caféine a de nombreuses propriétés telles qu'un effet vasodilatateur, tonicardiaque, stimulant général, stimulant des sécrétions gastriques…
Il semble donc évident qu'un produit cosmétique ne doit pas engendrer de tels effets et ne puisse pas permettre le passage sanguin de la caféine.

L'enjeu est de permettre une libération optimale de la caféine jusqu'à l'hypoderme tout en limitant au maximum son passage systémique, responsable d'effets indésirables généraux non permis dans le domaine de la cosmétologie.

2.3.2. Comparaison de deux émulsions (L/H et H/L/H) contenant de la caféine

Une étude réalisée en 1998 et intitulée « O/W emulsion and W/O/W multiple emulsion… » compare le potentiel de ces formes à libérer la caféine qu'ils contiennent (16).
Pour ce faire, des biopsies de peau humaine issues de chirurgie abdominale, des membranes en nitrate de cellulose et des épidermes humains reconstitués (par culture de kératinocytes) sont utilisés.

Les émulsions multiples eau/huile/eau sont des systèmes polydispersés où des micro-gouttelettes d'eau sont piégées dans des gouttelettes huileuses qui ont été dispersées dans une phase externe aqueuse.
Ici, la caféine est incorporée au sein des gouttelettes d'eau à une concentration de 1%.
Il est reconnu que la présence de plusieurs interfaces devant être traversées par le principe actif avant d'atteindre la phase externe ralentit le processus de libération de ce dernier.

Les biopsies, membranes et épidermes sont montés sur des cellules de diffusion et la quantité d'émulsion déposée est de 260 mg/cm².
La caféine résiduelle ou ayant diffusé est analysée en CLHP.

✓ <u>Libération de la caféine à travers la peau humaine :</u>
6 heures après l'application de la caféine, le flux de diffusion au sein de l'émulsion eau/huile/eau est beaucoup plus faible qu'avec l'émulsion huile/eau.
Cependant, quelle que soit la formule utilisée, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est relativement long (16 à 18 heures).

Le coefficient de perméabilité de la caféine s'avère également plus faible pour l'émulsion multiple que l'émulsion huile/eau.

A la fin de l'expérience (soit 24 heures), la quantité de caféine absorbée à partir de l'émulsion multiple est 2,6 fois plus faible que celle de l'émulsion huile/eau (1,25% de la caféine appliquée contre 3,21%).

✓ <u>Libération de la caféine à travers l'épiderme reconstitué et la membrane en nitrate de cellulose :</u>

Etant donné la plus grande perméabilité de ces membranes par rapport à la peau humaine, l'expérience n'est menée que pendant 6 heures.

Quoi qu'il en soit, le processus de libération de la caféine est plus lent pour l'émulsion multiple et une plus faible quantité est retrouvée dans le compartiment récepteur (environ 1,9 fois moins).

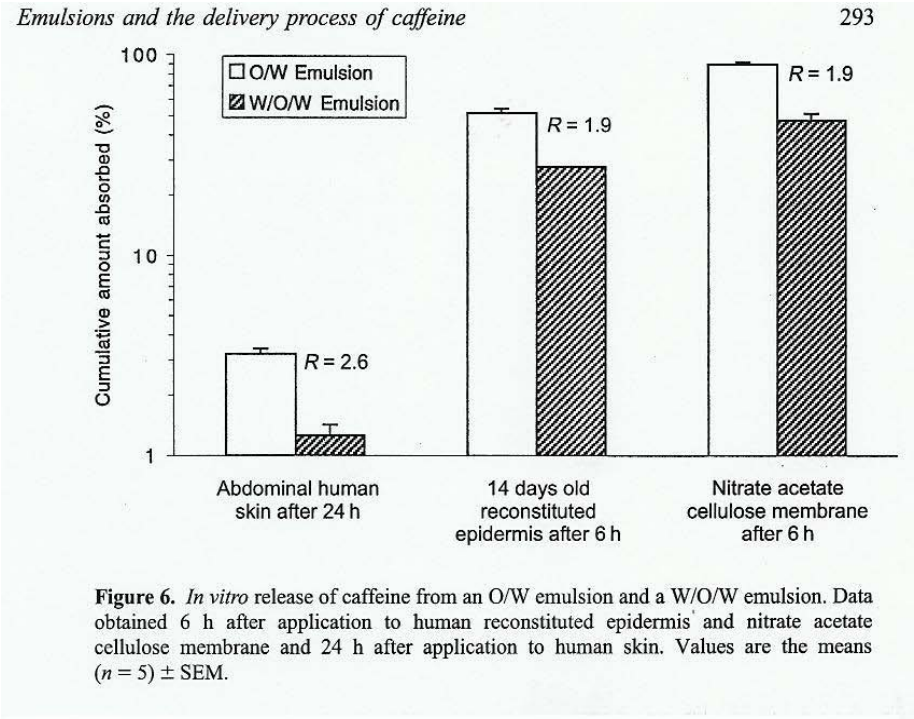


Figure 40 : Absorption de la caféine à partir d'émulsions huile/eau et d'émulsions multiples eau/huile/eau à travers la peau humaine, un épiderme reconstitué et une membrane en nitrate de cellulose

(DOUCET, 1998)

Ainsi, cette étude montre bien que les différentes interfaces à traverser ralentissent le processus de libération de la caféine.

La pénétration de la caféine sera optimisée en utilisant des émulsions simples type E/H ou H/E plutôt que des émulsions multiples.

Ceci montre bien toute l'importance de la formulation galénique des cosmétiques. La concentration en principe actif détermine sa pénétration mais celle-ci pourra être optimisée ou au contraire ralentie grâce à l'élaboration d'une formulation adaptée, avec des excipients judicieusement choisis.

2.3.3. Influence de différents paramètres au sein d'une émulsion H/L

L'étude « In vitro release of caffeine from concentrated… » conduite en 2000 analyse l'influence de 4 émulsifiants (ester de sorbitane, polymère de silicone, 2 émulsifiants couplés et des glucoesters) sur la libération de la caféine à partir d'émulsions concentrées H/L (11).
Les émulsions concentrées sont des émulsions où le pourcentage de phase interne est supérieur à 74%.
Les gouttelettes ne peuvent être sphériques et les émulsions obtenues ont la consistance d'un gel.
L'objectif de cette étude est d'étudier l'influence du pourcentage d'eau, du type d'émulsifiant et de sa concentration.
Pour cela, des membranes de polysulfone (hydrophiles) sont utilisées. En effet, il s'agit de membranes homogènes de toute part, où il n'y a pas de rétention particulière au sein d'une couche par rapport à une autre.
Elles permettent d'observer la facilité qu'a un véhicule à libérer un principe actif.
On les imbibe pendant une douzaine d'heures dans de l'Ethomeen, substance lipophile qui va imprégner la membrane et la rendre lipophile à son tour.
Ainsi, la caféine hydrophile ayant peu d'affinité pour cette membrane est libérée moins rapidement de son véhicule et la courbe de diffusion est alors interprétable.
Les membranes sont montées sur des cellules de diffusion et laissées en équilibre avec le milieu récepteur pendant 2 heures.
300 mg d'émulsion concentrée à 5% en caféine sont déposés sur la membrane.
La quantité de caféine ayant pénétré est analysée en CLHP (11).

✓ <u>Influence du pourcentage de phase interne :</u>

L'augmentation de ce pourcentage diminue le diamètre des gouttelettes et augmente la viscosité.

En effet, on observe un changement de forme des gouttelettes : sphériques, elles deviennent polyédriques.

Le flux de libération de la caféine augmente avec ce pourcentage. Ceci reste vrai quel que soit l'émulsifiant utilisé.

Le changement de forme des gouttelettes permettrait une augmentation de la surface de diffusion ce qui faciliterait la libération de la caféine.

Il semblerait qu'un fort pourcentage de phase interne diminuerait la stabilité de l'émulsion et augmenterait la libération de la caféine.

D'autres auteurs pensent que la surface de la phase interne augmentant, le volume de la phase continue (externe) serait considérablement réduit.

Ainsi, cela raccourcirait le chemin de diffusion de la caféine ce qui augmenterait sa libération.

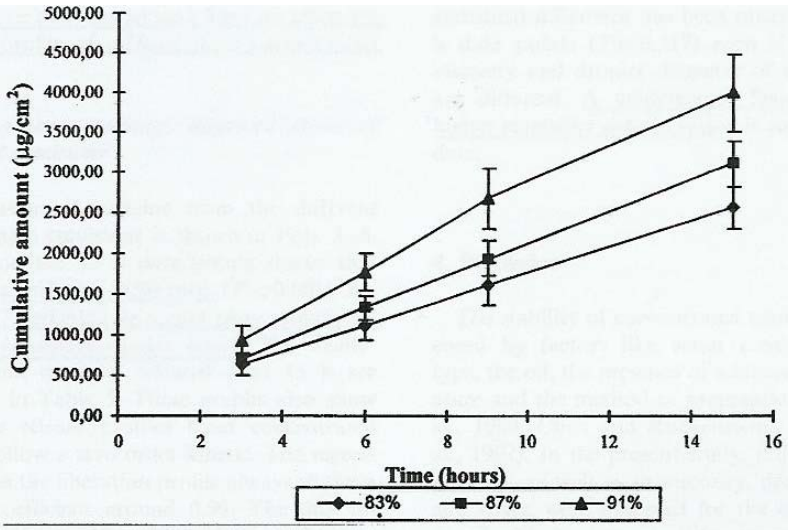


Fig. 5. Effect of the % dispersed phase (w/w) on the in vitro release profile of caffeine from concentrated emulsions obtained with 3% Coupled emulsifiers. (mean ± S.D.).

Figure 41 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec des émulsifiants couplés

(CLEMENT, 2000)

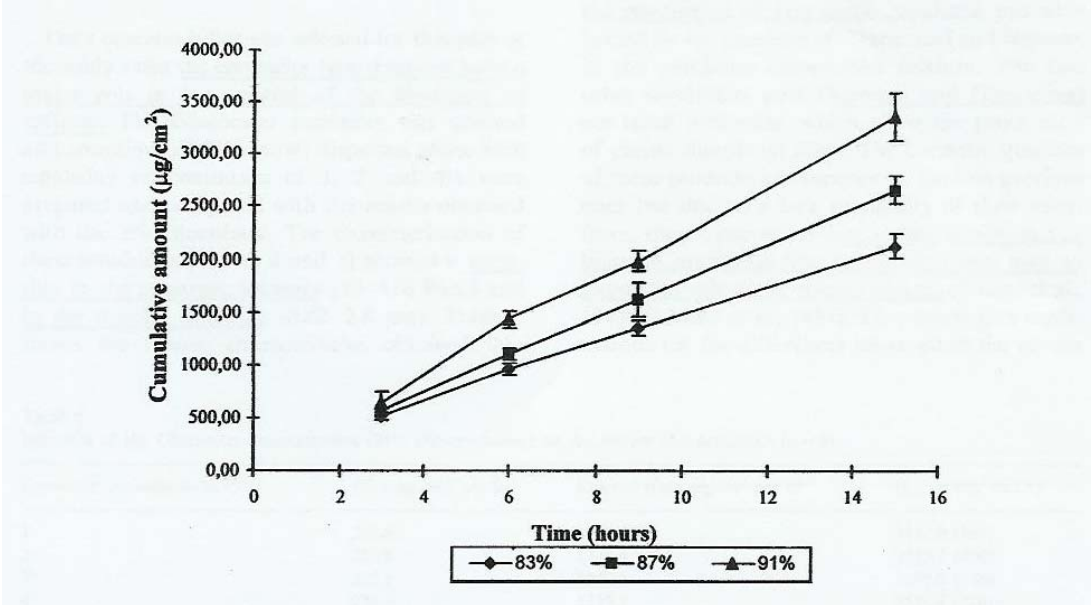


Fig. 6. Effect of the % dispersed phase (w/w) on the in vitro release profile of caffeine from concentrated emulsions obtained with 3% Glucoester emulsifier. (mean ± S.D.).

Figure 42 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec des glucoesters

(CLEMENT, 2000)

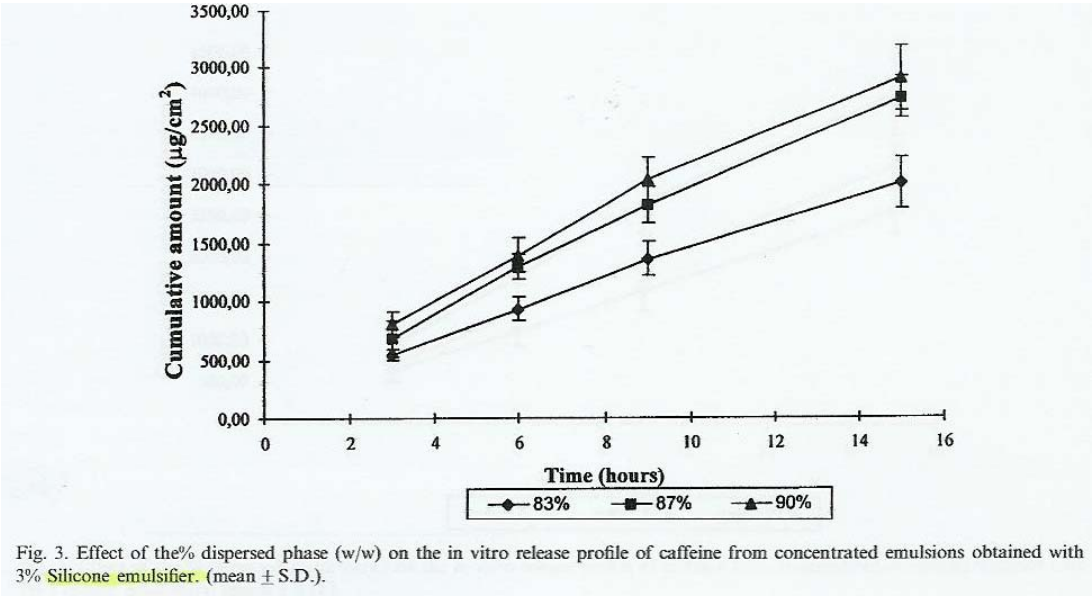


Fig. 3. Effect of the% dispersed phase (w/w) on the in vitro release profile of caffeine from concentrated emulsions obtained with 3% Silicone emulsifier. (mean ± S.D.).

Figure 43 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec de polymères de silicone

(CLEMENT, 2000)

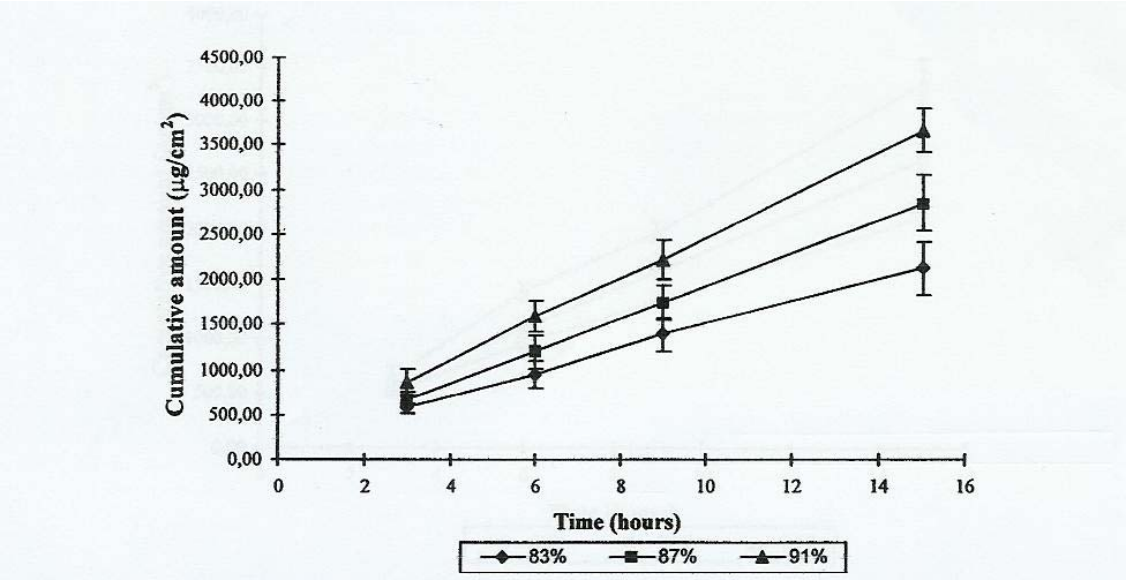


Fig. 4. Effect of the % dispersed phase (w/w) on the in vitro release profile of caffeine from concentrated emulsions obtained with 3% Sorbitan emulsifier. (mean ± S.D.).

Figure 44 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec des esters de sorbitane

(CLEMENT, 2000)

✓ <u>Influence du type d'émulsifiant :</u>

Un test de vieillissement accéléré des émulsions montre une très grande stabilité de l'émulsion à base de polymère de silicone.

En effet, la viscosité et le diamètre des gouttelettes restent identiques 6 mois plus tard.

Ce polymère crée une émulsion avec un film interfacial très résistant grâce à un fort encombrement stérique.

Les esters de sorbitane et les glucoesters sont les moins efficaces : 91% des émulsions à base de glucoester subissent une nette diminution de leur viscosité au bout de 30 jours. Un phénomène de coalescence des gouttelettes apparait au bout de 3 mois.

Il s'agit de petites molécules, créant un film interfacial élastique.

La stabilité des émulsions ainsi que les propriétés du film interfacial jouent un rôle important dans le processus de libération de la caféine.

Le flux de libération de la caféine est le plus important pour les émulsions à base d'émulsifiants couplés.

Ceci est vrai quel que soit le pourcentage de phase interne.

Cette libération rapide serait due à la présence de cires qui créent un film lipidique plus rigide.
Cette rigidité serait responsable d'une rupture précoce de ce film après application, ce qui permettrait une libération plus rapide de la caféine.

Table 5
Release characteristics from concentrated emulsions obtained with 3% emulsifier ($n = 6$)[a]

Formulations	83% dispersed phase (w/w)		87% dispersed phase (w/w)		91% dispersed phase (w/w)	
	Flux µg/cm²/h	Q_{15} µg/cm² (SD)	Flux µg/cm²/h	Q_{15} µg/cm² (SD)	Flux µg/cm²/h	Q_{15} µg/cm² (SD)
Sorbitan	130.1 $R^2 = 0.999$	2123.99 (286.6)	181.8 $R^2 = 1.000$	2848.8 (305.8)	232.3 $R^2 = 0.999$	3669.7 (253.7)
Silicone	122.1 $R^2 = 0.995$	2002.9 (174.4)	169.6 $R^2 = 0.95$	2735.1 (220.2)	174,7 $R^2 = 0.990$	2897.6 (276.7)
Mixed	161.2 $R^2 = 1.000$	2560.6 (267.5)	199.6 $R^2 = 1.000$	3103.9 (277.8)	254.3 $R^2 = 0.995$	3991.0 (480.1)
Glucoester[a]	133.6 $R^2 = 0.999$	2123 (132.3)	174.2 $R^2 = 1.000$	2655.9 (110.6)	223,1 $R^2 = 0.997$	3358.0 (225.8)

[a] $n = 4$.

Figure 45 : Caractéristiques de libération de la caféine à partir d'émulsions concentrées et influence du type d'émulsifiant

(CLEMENT, 2000)

✓ <u>Influence de la concentration en émulsifiant :</u>

Une libération plus rapide de la caféine serait possible lorsque la concentration en glucoester augmente.
Ceci serait dû à une augmentation de la viscosité et une diminution du diamètre des gouttelettes induites par l'augmentation de la concentration en émulsifiant.
Cependant, comparé à l'influence du pourcentage de la phase interne sur le flux de caféine, ce paramètre n'a que peu d'influence.

Ainsi, il ressort de cette étude que le flux de libération de caféine augmente avec le pourcentage de phase interne.
De plus, la présence de cires au sein des excipients favorise également le passage transcutané de la caféine.

2.4. Etude d'un gel amincissant : ELANCYL®

En 1999, une étude nommée « Topical delivery of caffeine… » évalue la pénétration de la caféine à travers de la peau humaine et des membranes artificielles à partir de formulations commerciales concentrées à 3% (15).
Les membranes artificielles sont en acétate de cellulose et silicone, la peau humaine issue de la cuisse et sont montées sur des cellules de diffusion ayant une surface de 1 cm².
Les échantillons sont prélevés à 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 24 heures et analysés en CLHP.

Une différence significative de pénétration de caféine apparait entre le gel ELANCYL® et les autres formulations.
En effet, après 12 heures, la quantité de caféine ayant pénétré à travers la peau humaine est d'environ 400 µg/cm² pour ELANCYL® contre 41,7 µg/cm² pour les autres formulations.

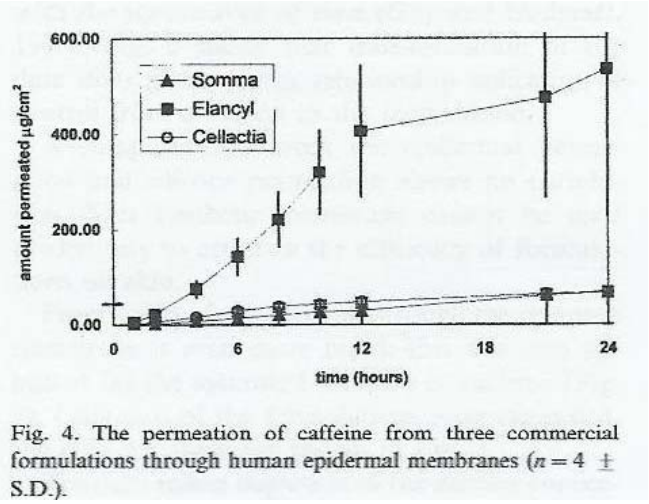


Figure 46 : Pénétration de la caféine à travers la peau humaine à partir de trois formulations
(DIAS, 1999)

Cette différence est cependant moins visible pour les membranes artificielles (636 µg/cm² pour ELANCYL® et 409 µg/cm² pour les autres).

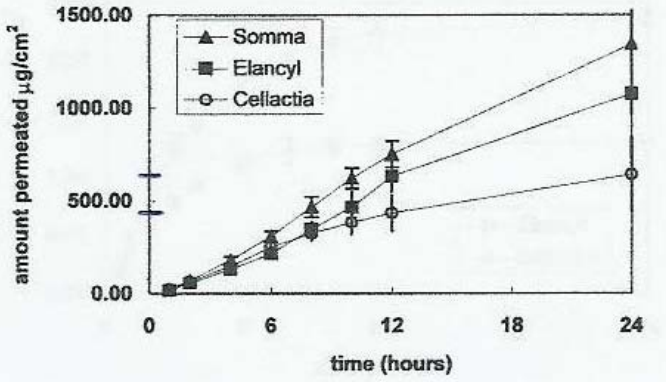


Fig. 5. The permeation of caffeine from three commercial formulations through silicone impregnated with isopropyl myristate ($n = 4 \pm$ S.D.).

Figure 47 : Pénétration de la caféine à travers une membrane siliconée à partir de trois formulations

(DIAS, 1999)

En effet, il semblerait que seul ELANCYL® possède des excipients capables d'augmenter la pénétration cutanée de la caféine.

Le mécanisme supposé ne serait pas une altération de la couche cornée mais une augmentation de la solubilité de la caféine au sein du *stratum corneum*.

Outre les propriétés lipolytiques de la caféine, on retrouve dans ce produit divers principes actifs ayant des propriétés intéressantes :

- la xanthoxyline, extraite d'un arbuste augmente la capacité de protéines contenues dans les adipocytes à destocker les graisses existantes et à bloquer le stockage de nouvelles.
- la phloridzine issue du pommier limite le stockage nocturne des graisses dans l'adipocyte et potentialise le déstockage matinal.

Elle bloque l'entrée du glucose dans les cellules graisseuses en inhibant le fonctionnement et la multiplication des transporteurs de glucose situés sur la membrane cellulaire.

- l'extrait de piloselle décongestionne les tissus et favorise l'élimination de l'eau et des toxines.
- l'hespéridine Methyl Chalcone permet d'améliorer l'élasticité et la tonicité de la peau.

En effet, grâce à sa puissante activité anti-glycation, elle protège les fibres de collagène de l'attaque des sucres et évite la rigidification du tissu conjonctif qui conserve ainsi toute son élasticité.

Cette molécule contribue également à l'amélioration de la microcirculation, favorisant un désengorgement de l'environnement tissulaire.

Ainsi, on lui confère un rôle de lissage et de raffermissement visibles par l'amélioration de l'aspect « peau d'orange »

Enfin, l'acide salicylique et l'urée kératolytiques favorisent la pénétration des principes actifs et améliorent l'aspect de la peau.

Cependant, afin d'optimiser l'action de ces différentes formulations, il s'avère important de réaliser un gommage sur les zones concernées deux fois par semaine ainsi qu'un massage lors de leur application.
Ceci va contribuer à éliminer les cellules mortes et à activer la microcirculation cutanée, indispensable à une bonne diffusion des principes actifs.

III. Les substances « anti-rides»

3.1. Physiologie du vieillissement cutané

Le vieillissement cutané est une manifestation parmi d'autres de l'avancée en âge d'un être vivant.
Elle se manifeste principalement par un dessèchement cutané associé à une perte d'élasticité, ce qui va conduire à la formation de rides.
Dans la quête constante de garder leur apparence physique de jeunesse, les hommes et femmes sont demandeurs de produits « anti-rides » qui leur permettront de lutter contre le temps qui passe.
Nous tenterons d'étudier ces divers produits afin de conclure à une éventuelle efficacité.

Pour cela, il est important de comprendre avant tout le mécanisme du vieillissement cutané.

3.1.1. Modifications structurales et conséquences fonctionnelles

3.1.1.1. Au niveau de l'épiderme

On observe une réduction de l'épaisseur de la partie « vivante » de l'épiderme due à la diminution de la capacité de prolifération des kératinocytes.
Toutefois, il n'y a pas d'altération du *stratum spinosum* et du *stratum granulosum*.
Les fonctions de kératinisation et de transformation des lipides épidermiques demeurent normales.

Une augmentation de l'épaisseur de la couche cornée apparait dans certaines zones. Le processus de desquamation du *stratum corneum* est altéré par suite du dysfonctionnement des protéinases assurant la disparition des cornéosomes.
La diminution de la cohésion entre les cornéocytes entraine une augmentation de la desquamation.
La peau est sèche et rugueuse au toucher (26,33).

Une diminution du nombre de mélanocytes entraîne une mauvaise protection vis-à-vis des rayons solaires. Leur capacité de protection diminue, de même que leurs interactions avec les kératinocytes (26,33).

Les cellules de Langerhans diminuent en nombre jusqu'à 50%, modifiant ainsi la réponse immunitaire. Ceci serait responsable de l'augmentation du risque de cancer cutané (26,33).

La diminution de la sécrétion sébacée crée un assèchement de la peau. Il apparait une modification de la composition du film hydrolipidique, le pH cutané devient plus acide et la résistance aux agressions de l'environnement et des micro-organismes diminue (35).

3.1.1.2. Au niveau de la jonction dermo-épidermique

On observe un aplatissement de cette région avec perte des ondulations dues à l'invagination des papilles dermiques dans le derme.
Les kératinocytes basaux perdent leurs extensions cytoplasmiques au sein du derme et la cohésion épiderme/derme diminue.
Ainsi, la protection mécanique de la peau vis-à-vis des structures sous-jacentes diminue (26,29,31).

3.1.1.3. Au niveau du derme

Les fibroblastes diminuent en taille et en nombre. On observe une altération de la capacité de synthèse des protéines avec nette diminution des capacités migratoires de ces protéines à l'intérieur de la cellule.
L'altération de la cicatrisation serait une des conséquences de ce phénomène.

La diminution du nombre de macrophages conduit à un manque de collagénases et de protéinases capables de digérer les collagènes réticulés.
La diminution de l'acide hyaluronique conduit à une moindre capacité de fixation de l'eau. La peau se dessèche et s'affine.

Les fibres d'élastine se raréfient ou disparaissent dans le derme papillaire, la ride se creuse par manque de soutien des couches superficielles.
Par contre, ces fibres s'hypertrophient dans le derme réticulaire, provoquant l'apparition de l'élastose sénile.

Les fibres de collagène se fragmentent et tendent à s'orienter parallèlement à la surface du derme papillaire. Le vieillissement du collagène correspond à la réticulation des molécules, ce qui le rend insoluble, moins résistant et moins élastique (29,35).

3.1.1.4. Autres

Une altération de la microcirculation conduit à la réduction des métabolismes cellulaires.
L'augmentation de la teneur cutanée en cholestérol est à l'origine d'une diminution d'élasticité des fibres élastiques et d'une accélération de leur lyse.
La fibronectine, glycoprotéine sécrétée par les fibroblastes, diminue, ce qui désorganise les fibres élastiques (31).
La réduction du nombre de glandes sudoripares et de la graisse hypodermique altère la fonction de thermorégulation.
La diminution de la synthèse de vitamine D crée une diminution de la fixation de calcium au niveau osseux (29,31).

3.1.2. Premier signe du vieillissement : la ride

3.1.2.1. Définitions et répartition

Il est essentiel de bien distinguer les rides des plis d'affaissement, qui présentent une physiologie et une thérapeutique différentes.
Les rides d'expression sont l'accentuation permanente des plis d'expression de la peau et des sillons normaux du visage.
On les retrouve au niveau de la patte d'oie (angle externe de l'œil), du font, entre les sourcils, au niveau du sillon naso-génien et du contour des lèvres (29).

Les plis d'affaissement sont secondaires au relâchement cutanéo-musculaire lié à l'action combinée des altérations dermo-épidermiques et de la pesanteur, responsable de la migration vers le bas du tissu sous-cutané et en particulier du tissu graisseux.
Ils sont responsables de l'altération de l'ovale du visage avec apparition de bajoues, d'un double menton, de poches sous les yeux et d'une ptose des paupières (29).

3.1.2.2. Mécanisme de formation

La peau est constamment soumise à des forces de traction par les mouvements des muscles sous-jacents.
Progressivement, l'aplatissement de la jonction dermo-épidermique, la perte de son adhésion avec les fibres élastiques du derme superficiel sous-tendant le réseau des fibres de collagène, les altérations du

tissu dermique vont entraîner la perte de l'élasticité cutanée et son étirement entre les points d'insertion musculaire.
Parallèlement, la répartition du tissu graisseux se modifie selon les lois de la pesanteur et l'élasticité cutanée verticale diminue.
L'ensemble de ces phénomènes concourent à l'accentuation des sillons cutanés perpendiculaires aux fibres musculaires sous-jacentes. Ils deviennent permanents et constituent les rides.

La surface de la peau est constituée de sillons, visibles à l'œil nu et atteignant le derme superficiel.
Lors du vieillissement, la ride se forme par creusement et élargissement de ces sillons, associés à l'étirement de la jonction dermo-épidermique et au remaniement atrophique des tissus sous-jacents dermo-hypodermiques (29).

Elles peuvent également être secondaires à une hypertrophie du tissu épidermique de part et d'autre du sillon, associée souvent à une élastose actinique.

Figure 48 : Différents types de rides
(IMBERT, 1995)

3.1.3. Facteurs favorisants

3.1.3.1. Intrinsèques

- Chrono-induits : avec le temps, les facultés de réparation de l'ADN diminuent, par diminution de synthèse d'enzymes anti-oxydantes.

La baisse de synthèse de lipides membranaires engendre une évaporation de l'eau intracellulaire et la peau se déshydrate.

- Endocriniens : la carence en œstrogènes chez la femme ménopausée induit un vieillissement prématuré de la peau (4).
- Génétiques.

3.1.3.2. Extrinsèques

- Actiniques : le soleil est le principal ennemi de la peau. A court terme, les UVB entraînent une inhibition transitoire de la synthèse d'ADN épidermique. 24 à 48 heures après, le phénomène s'inverse, les synthèses s'amplifient, la taille des noyaux augmente, les kératinocytes s'hypertrophient : il y a hyperkératinisation.

A long terme, il y a amincissement de l'épiderme et anomalie de la synthèse des fibres de collagène et élastiques : apparait alors l'élastose solaire. La peau est sèche, très ridée, épaisse, sans souplesse ni tonicité (31).

- Comportementaux : le tabac diminue l'oxygénation cutanée, ce qui induit la formation prématurée de rides (29).

Le stress, la fatigue, l'alcool et les carences alimentaires accentuent le phénomène.

- Cataboliques et iatrogènes : diabète, insuffisance rénale, corticoïdes, diurétiques.
- Mécaniques : les agressions climatiques comme le vent et le froid ralentissent la sécrétion sébacée et diminuent les facteurs hygroscopiques naturels. Ceci contribue à la rugosité et à la sécheresse de la peau.

La contraction répétée des muscles pauciers provoque également un affaissement de l'épiderme et le creusement de la ride (29).

- Chimiques : hygiène cutanée, produits agressifs.

Ainsi, le vieillissement cutané correspond à l'intrication de plusieurs facteurs, s'ajoutant les uns aux autres.

Afin de prévenir au mieux cette sénescence du tissu cutané, il conviendra de lutter contre les facteurs extrinsèques, seuls contre lesquels nous pouvons agir.
Une bonne protection solaire s'avère ainsi indispensable, associée à une bonne hygiène de vie et à l'utilisation de produits cosmétiques adaptés à son type de peau.

La prévention n'étant malgré tout pas forcément suffisante, les industriels se sont lancés dans le marché des substances « anti-vieillissement », « anti-rides », « lissantes », « défroissantes », « coup d'éclat »…
Mais quels principes actifs se cachent derrière toutes ses appellations ?
Peuvent-ils prétendre supprimer voire atténuer les rides ?
Pour y répondre, nous allons étudier les substances utilisées ainsi que leur mécanisme d'action.

3.2. Substances actives utilisables dans le traitement du vieillissement cutané et mécanisme d'action

Etant donné la diversité des modifications de la structure cutanée observées à tous les niveaux, les produits susceptibles d'améliorer ou de ralentir les détériorations seront de nature très variée.
On retrouvera quelques grandes classes d'actifs :

- ✓ des agents de desquamation capables d'éliminer l'excès de cornéocytes accumulés.
- ✓ des stimulants cellulaires agissant sur les fibroblastes et leur capacité se synthèse.
- ✓ des raffermissants susceptibles d'améliorer les propriétés mécaniques de la peau.
- ✓ des tenseurs permettant de faire disparaître momentanément les ridules superficielles.
- ✓ des anti-âges de types oestrogéniques se fixant sur les récepteurs épidermiques
- ✓ des antiradicalaires et des antisolaires assurant la protection de la peau vis-à-vis des radiations actiniques (35).

3.2.1. Substances de nature protéique

- Collagène « natif » : molécule synthétisée par les fibroblastes humains, le collagène utilisé en cosmétologie est extrait de la peau de sole.

Le marketting cosmétique à longtemps prétendu que le collagène intégral exogène pouvait remplacer le collagène endogène dégradé. Or, compte tenu de son poids moléculaire élevé et de son caractère hydrophile, il traverse très difficilement la peau.

En effet, Nagelschmidt et Struck, en marquant le collagène au carbone 14, n'ont remarqué aucune radioactivité dans les couches profondes de la peau : le collagène ne pénètre pas dans le derme (4).
Certains chercheurs ont alors émis l'hypothèse qu'il pourrait pénétrer grâce à l'action de collagénases superficielles.
Mais dans ce cas, il subirait une certaine dégradation qui le rendrait différent du collagène natif.
Le collagène n'a donc a priori aucune action régénérante au niveau du derme.
Il a donc surtout une action superficielle et joue un rôle de filmogène hydrophile dans l'hydratation cutanée. Son effet hydratant est attribué à sa capacité de rétention d'eau au sein de sa structure en triple hélice (4,35).
Il est de moins en moins utilisé malgré une carrière remarquable de plus de 20 ans (35).

- Hydrolysats de collagène : selon le degré d'hydrolyse, on obtient une solution d'acides aminés ou un mélange d'acides aminés et de peptides.

Ils sont actuellement très employés car les acides aminés traversent assez facilement la barrière cutanée et peuvent atteindre le derme où ils servent de nutriment cellulaire.
Ils ont, de plus, un certain pouvoir hydratant en tant que constituants du NMF par leur capacité éventuelle à traverser la membrane des kératinocytes (35).
Leur caractère filmogène est également mis à profit pour un effet tenseur de l'épiderme, ce qui va « lisser » la ride (31).
Ainsi, il semble évident que les hydrolysats de collagène sont inefficaces pour freiner le vieillissement cutané car n'ayant aucune action régénérante au niveau du derme.
Ils ont une action de surface uniquement (4).

- Elastine : synthétisée par les fibroblastes en même temps que le collagène, l'élastine utilisée en cosmétologie serait d'origine marine.

Seule forme soluble de l'élastine, la forme hydrolysée est employée dans les produits cosmétiques.
Si elle est peu dégradée, elle a des propriétés filmogènes et hydratantes.
Très dégradée, elle a des propriétés anti-rides par les acides aminés qu'elle contient, en stimulant l'activité des fibroblastes (35).

- Lipoprotéines : de structure semblable à celle des membranes cellulaires, elles sont dotées d'une bonne capacité de pénétration cutanée.

Elles auraient une action sur la biosynthèse des protéines en augmentant le métabolisme cellulaire.
Les lipoprotéines hydrosolubles ont une activité anti-élastasique.
Cependant, ces molécules sont utilisées en très faibles quantités car très onéreuses et d'odeur peu agréable (35).

• Protéines : on a longtemps utilisé comme tenseur la sérumalbumine bovine (SAB) provenant du sérum de veau et réalisant en séchant un film plus ou moins élastique effaçant momentanément les ridules superficielles et permettant d'obtenir un lissage de la surface cutanée.
Ces produits dits « coup d'éclat » avaient une efficacité très temporaire.
Par suite de l'abandon progressif des matières premières d'origine animale, ils ont été remplacés par des « sérums » tenseurs ou raffermissants à base de protéines végétales.
Les tenseurs non protéiques tels que les astringents tanniques ne sont pas recommandés pour les peaux vieillies déjà sèches par suite de leur capacité à diminuer encore la production de sébum par réduction de la lumière des follicules pilosébacés (35).

• Enzymes : elles accélèrent la desquamation en effectuant un gommage ou un peeling doux.
Elles agissent directement sur les cornéosomes en fragilisant leur structure protéique.
Elles sont issues des biotechnologies ou d'origine végétale comme la papaïne ou la broméline.
Elles concurrencent ainsi de façon importante les AHA (35).

3.2.2. Substances de nature non protéique

• Acide hyaluronique : c'est un filmogène hydrophile non occlusif. Il forme un film hydro-élastique à la surface de la peau qui en séchant se rétracte et la tire finement.
Cet effet lissant peut alors atténuer de façon transitoire les ridules d'expression (31).
Il est toujours utilisé en très petites quantités car très onéreux (35).

• Chitosane : issu de la chitine constituant la carapace des crustacés ainsi que l'enveloppe des insectes, le chitosane est utilisé comme filmogène hydratant.
Il est cicatrisant par action de surface et se substitue à la kératine.
Moins cher que l'acide hyaluronique, il pose parfois quelques problèmes de réactions allergiques (35).

• ADN : le plus souvent d'origine végétale, son métabolisme au niveau de la peau est très peu connu (35).

• AHA : ce sont les α-hydroxyacides. Ce sont des agents de desquamation, non irritants à des concentrations inférieures à 5%.
Ils stimulent également la synthèse de collagène et d'élastine ainsi que le renouvellement cellulaire.
Le plus actif est sans conteste l'acide glycolique mais les acides de fruits sont également très répandus dans les produits cosmétiques.

Ils sont capables de dissocier les cornéocytes en agissant sur la structure même des cornéosomes en modifiant la structure des couches lamellaires du ciment lipidique intercellulaire (29,35).
Ainsi, ils diminuent l'épaisseur de la couche cornée.
Cependant, tous les AHA n'ont pas la même activité. Celle-ci varie en fonction de leur structure et du pH de la formulation.
Ainsi, les AHA à chaîne courte, hydrophiles, se retrouvent en plus grande quantité dans les couches profondes du *stratum corneum* tandis que les acides à chaîne longue ont une prédisposition à rester dans les couches supérieures (31).

- Vitamine A acide et rétinol : ils stimulent la production de collagène et accélèrent le renouvellement cellulaire.

En effet, le rétinol régule le processus de kératinisation épidermique en favorisant le métabolisme des kératinocytes, c'est-à-dire qu'il stimule leur turn-over et leur capacité de synthèse protéique.
Il active également la synthèse de protéoglycanes par les fibroblastes, dont la fonction principale est de retenir l'eau dans les tissus.
Il diminue la cohésion des cellules de la couche cornée (33).
Cependant, la vitamine A acide (acide rétinoïque) est très souvent responsable de dermites irritatives, c'est pourquoi le rétinol est plus utilisé, malgré une pénétration dans les kératinocytes qui semble minime.
La vitamine A ou son précurseur, le rétinaldéhyde seront les molécules les plus utilisées dans les produits cosmétiques (4).

3.3. Exemple de la vitamine A et son dérivé : le rétinaldéhyde

3.3.1. Généralités sur la vitamine A et ses dérivés

La vitamine A acide ou acide rétinoïque apparait comme le métabolite le plus actif de la vitamine A naturelle, qui n'est autre que le rétinol.
Elle fut synthétisée et testée sur des patients en 1946.
Grâce aux travaux de Kligman, cette molécule suscita un réel intérêt au sein de la communauté dermatologique.
Son mécanisme d'action fut ensuite progressivement éclairci.

A partir de ces deux molécules sont apparues d'autres avec des propriétés semblables : ce sont les rétinoïdes de seconde et troisième génération (31).

3.3.2. Métabolisme cutané des rétinoïdes et leurs récepteurs

Après application topique, l'acide rétinoïque pénètre dans les kératinocytes en commençant par les cellules cornées.
Au fur et à mesure de sa pénétration, facilitée par sa lipophilie, sa concentration cellulaire diminue du fait de son utilisation et de sa dégradation.
Cette concentration deviendrait presque nulle au niveau du derme superficiel (29).

En effet, son absorption serait limitée à 20% au sein du derme et de l'épiderme tandis que 80% restent localisés au niveau du *stratum corneum*.
Après application locale, l'acide rétinoïque est indétectable dans la circulation générale d'où absence de toxicité systémique (31).

La pénétration cellulaire se fait par traversée de la membrane ou via un hypothétique récepteur.
Dans le cytoplasme, l'acide rétinoïque se lie à une protéine, la CRABP (Cellular Retinoïc Acid Binding Protein), qui joue soit le rôle d'un transporteur entre le cytoplasme et les récepteurs nucléaires, soit d'un réservoir cytoplasmique.
Cette protéine ubiquitaire prédomine largement dans l'épiderme (29,33).

Le complexe acide rétinoïque/protéine ainsi formé peut se déplacer jusqu'au noyau où il se dissocie. La CRABP peut être recyclée via le cytoplasme tandis que l'acide rétinoïque se lie à son récepteur nucléaire.
De nombreux récepteurs nucléaires ont été identifiés : il s'agit des récepteurs RAR (Retinoic Acid Receptors) avec 3 sous-types (α,β,γ) et des RXR (Retinoid X Receptors) α, β et γ.
Le nouveau complexe formé est capable de venir se fixer sur des séquences régulatrices de l'ADN et de moduler l'expression du génome des cellules cutanées (31).
Ainsi, il semble réguler l'activité de certains gènes qui interviennent dans la synthèse du collagène et de la kératine (33).

Il faut cependant garder à l'esprit que le rétinol, quant à lui, n'exerce pas directement son action sur la cellule cible. Après fixation sur la CRBP, il nécessite des transformations enzymatiques intracellulaires pour aboutir à l'acide rétinoïque.
En effet, le rétinol présent dans le cytosol du kératinocyte est métabolisé en rétinaldéhyde. Ce métabolite intermédiaire est ensuite oxydé en acide rétinoïque.
Cette étape ne se déroule qu'au sein des kératinocytes en état de différenciation avancée.

Certaines études ont montré que seule une faible proportion de rétinaldéhyde est convertie en acide rétinoïque, le reste étant stocké dans la cellule.
Ainsi, cette molécule a ouvert de nombreuses perspectives en cosmétologie car elle permet une libération contrôlée de la forme active de la vitamine A dans l'épiderme.
De plus, ne se liant à aucun récepteur nucléaire, il agit comme un « pro-ligand » des récepteurs nucléaires des rétinoïdes en chargeant l'épiderme d'acide rétinoïque 120 fois moins que l'acide rétinoïque topique.
Ce concept de libération prolongée empêche une surcharge en acide rétinoïque exogène et explique le faible pouvoir irritant du rétinaldéhyde (www.unige.ch/cyberdocuments/).

3.3.3. Effets cellulaires et tissulaires des rétinoïdes

Les rétinoïdes, ayant le pouvoir de moduler l'expression des protéines impliquées dans la différenciation épidermique, induisent la prolifération et la différenciation cellulaire des tissus épithéliaux.
Ainsi, l'épaisseur du *stratum corneum* est réduite et la peau est moins rugueuse.
Cependant, la jonction dermo-épidermique reste aplatie (29).

Ils modulent les filaments intermédiaires de kératine avec pour conséquence une diminution de la cohésion des kératinocytes et des cornéocytes, conduisant ainsi à l'effet kératolytique des rétinoïdes.
Cette propriété leur confère une grande efficacité dans certaines pathologies comme le psoriasis ou l'ichtyose.

Ils inhibent la prolifération et la différenciation des sébocytes. La production de sébum diminue et les lipides de la surface cutanée sont redistribués.
Ils ont également une action inhibitrice sur *Propionibacterium acnes*.
Leur rôle anti-inflammatoire est dû à la stimulation des lymphocytes T et des cellules de Langerhans, ainsi qu'à l'inhibition du chimiotactisme des polynucléaires neutro et éosinophiles.
Ces deux propriétés expliquent leur succès dans l'arsenal thérapeutique de l'acné.

Ils possèdent une action cicatrisante sur l'épiderme.
Ils activent les fibroblastes ce qui augmente la synthèse de protéoglycanes dont la fonction principale est de retenir l'eau et donc d'obtenir une meilleure hydratation du derme et un effet « lissant » de surface.

Enfin, ils inhibent les métalloprotéases, protéases dégradant la matrice extracellulaire et qui participent au vieillissement cutané.
Voilà ainsi la raison pour lesquelles on les retrouve dans de nombreuses crèmes « anti-rides ».
(www.unige.ch/cyberdocuments/)

Concernant l'acide rétinoïque, il semblerait qu'il augmente la synthèse de collagène et d'élastine au niveau du derme, ce qui confère une certaine souplesse et élasticité à la peau.
De plus, il relancerait la dynamique cellulaire en régénérant les cellules vivantes de l'épiderme (33).

3.3.4. Pénétration du rétinaldéhyde et intérêt de son association avec l'acide glycolique

Le rétinaldéhyde présente un grand intérêt en cosmétologie car il représente le métabolite intermédiaire de la transformation du rétinol en acide rétinoïque.
Son utilisation permet de s'affranchir de cette étape de biotransformation et d'apporter de façon progressive l'acide rétinoïque au cœur de la cellule.
Ainsi, l'efficacité thérapeutique reste présente mais le phénomène d'irritation cutanée dû à l'acide rétinoïque diminue fortement grâce à sa libération progressive.

Cependant, afin d'exercer sa pleine activité, cette molécule prometteuse doit pouvoir traverser la couche cornée et arriver jusqu'à l'épiderme.
Afin d'augmenter sa pénétration et son activité, des chercheurs ont mis au point une nouvelle formulation nommée RALGA. Il s'agit d'une association entre le rétinaldéhyde et un α-hydroxyacide, l'acide glycolique.

L'étude nommée « Pharmacology of RALGA… » réalisée en 2005, étudie la biodisponibilité cutanée du rétinaldéhyde ainsi que sa conversion en acide rétinoïque après application de RALGA.
Pour cela, on applique sur des souris trois émulsions L/H : l'une à base d'acide rétinoïque à 0,05%, l'autre à base de RALGA et la dernière à base de rétinaldéhyde à 0,1%.
A la fin de l'expérience, les souris sont sacrifiées et les épidermes analysés.
Les quantités de rétinoïdes restantes sont analysées en CLHP.

Dans cette étude, on constate que l'acide rétinoïque pénètre facilement à travers la peau et que de grandes quantités sont retrouvées dans l'épiderme après 2 heures.

Après application de RALGA et de rétinaldéhyde, on constate un pic de concentration épidermique d'acide rétinoïque au bout de 2 heures.
Cependant, les concentrations diminuent très rapidement lors de l'application de rétinaldéhyde.
A la fin de l'expérience, on constate que la formule RALGA a libéré 5 fois plus d'acide rétinoïque au sein de l'épiderme que le rétinaldéhyde ou l'acide rétinoïque lui-même.

Au sein du derme, les concentrations retrouvées sont 100 fois plus faibles, ce qui montre une activité minime au niveau des fibroblastes et des cellules dermiques par rapport aux cellules épidermiques.

Tout comme au niveau de l'épiderme, les concentrations en acide rétinoïque diminuent beaucoup moins vite après application de RALGA.
De plus, on constate une stabilisation des concentrations au bout de 24 heures. Ainsi, la quantité totale d'acide rétinoïque libéré est plus importante pour le RALGA que les autres formulations.

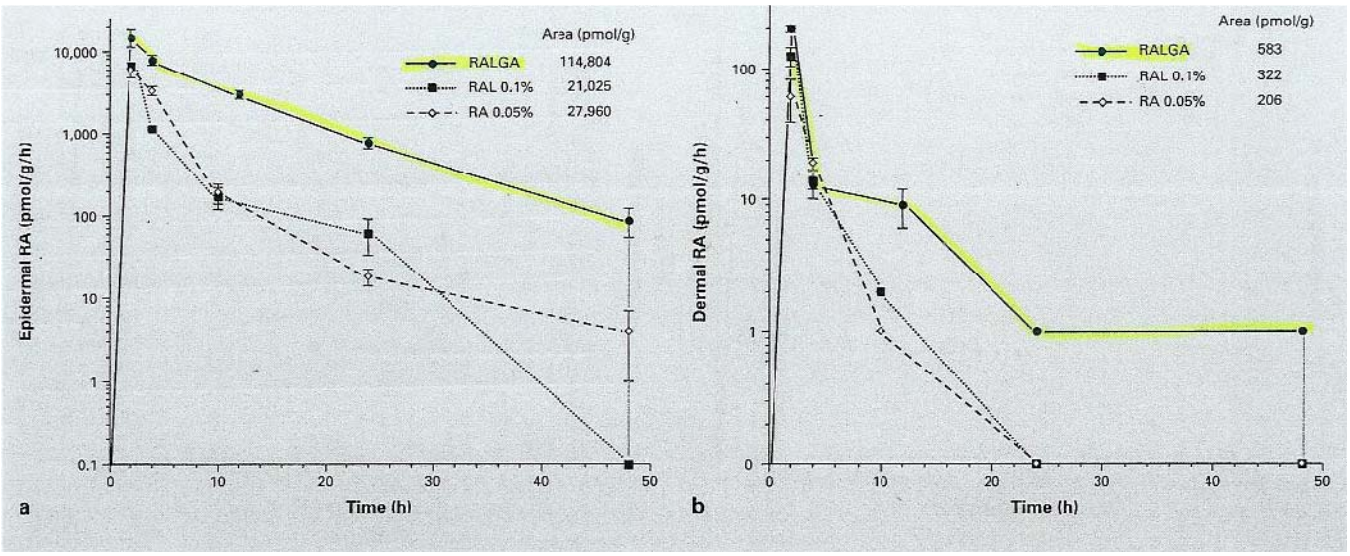


Figure 49 : Concentrations épidermiques (a) et dermiques (b) en acide rétinoïque après application de RALGA, rétinaldéhyde à 0,1% et acide rétinoïque à 0,05%

(TRAN, 2005)

Ce phénomène s'explique de deux façons : non seulement l'acide glycolique favorise la pénétration du rétinaldéhyde mais il augmente aussi son oxydation en acide rétinoïque, ce qui permet d'obtenir une concentration finale constante.

Pour démontrer cela, on incube des échantillons de peau de souris avec de l'acide glycolique et d'autres avec du citral, un inhibiteur de la rétinaldéhyde deshydrogénase.

Cette enzyme transforme le rétinaldéhyde en acide rétinoïque.

On observe alors que l'acide glycolique augmente l'activité de l'enzyme et donc la concentration en acide rétinoïque.

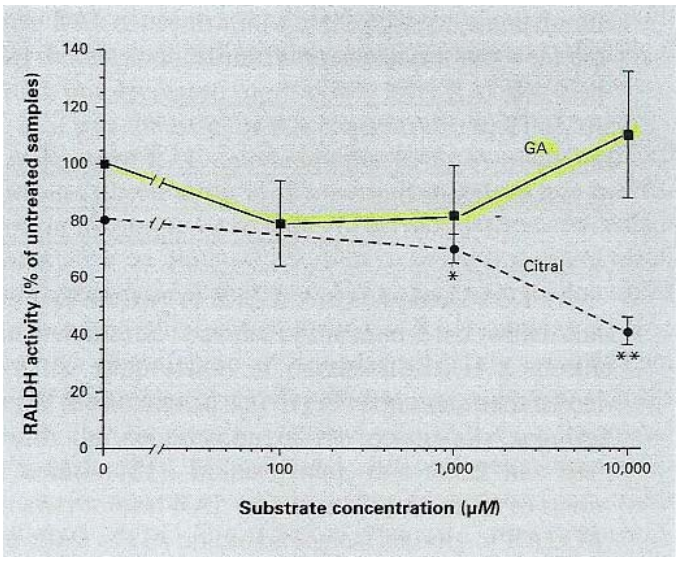


Figure 50 : Effets de l'acide glycolique et du citral sur l'activité de la rétinaldéhyde deshydrogénase

(TRAN, 2005)

Les observations faites pour l'acide rétinoïque sont retrouvées pour le rétinaldéhyde, qui se retrouve en plus grande quantité lorsque l'on applique le RALGA plutôt que le rétinaldéhyde seul.

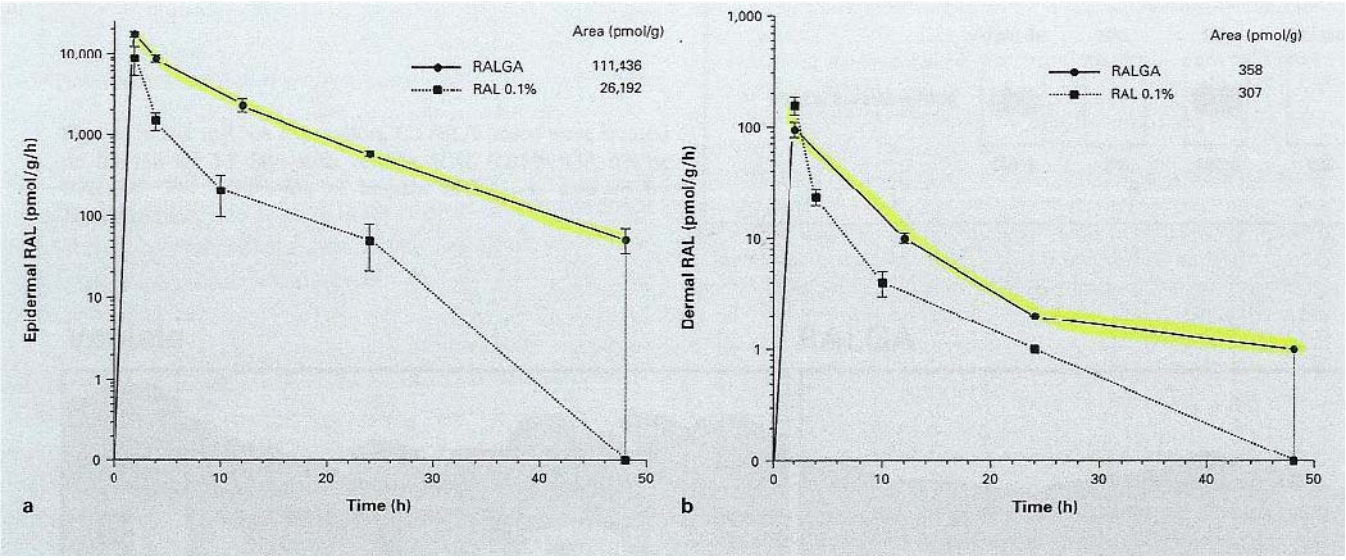


Figure 51 : Concentrations épidermiques (a) et dermiques (b) en rétinaldéhyde après application de RALGA et de rétinaldéhyde à 0,1%

(TRAN, 2005)

Grâce à cette expérience, on constate que l'association du rétinaldéhyde à l'acide glycolique a permis de libérer 5 fois plus d'acide rétinoïque au sein de l'épiderme que le rétinaldéhyde ou l'acide rétinoïque lui-même.
Ce phénomène s'explique de deux façons : non seulement l'acide glycolique favorise la pénétration du rétinaldéhyde mais il augmente aussi son oxydation en acide rétinoïque, ce qui permet d'obtenir une concentration finale constante.

L'acide glycolique appartient à la grande famille des α-hydroxyacides qui ont la propriété d'altérer la structure du *stratum corneum,* ce qui favorise la pénétration des principes actifs.
De plus, il a été constaté que l'acide glycolique n'altère pas l'activité biologique du rétinaldéhyde.
Ceci apporte un grand avantage en permettant un apport d'acide rétinoïque au niveau de son site d'activité tout en évitant ses effets irritatifs lorsqu'on l'applique en grandes quantités sur la peau.

Ainsi, le rétinaldéhyde atteint bien les cellules épidermiques, lieu principal de son action, mais on constate également qu'il atteint le derme et ses fibroblastes, où il stimule la synthèse de collagène et d'élastine.

3.4. Les AHA

3.4.1. Présentation et effets cutanés

Ce sont les α-hydroxyacides.
Ce sont des acides organiques naturels provenant de la pomme verte (acide malique), des agrumes (acide citrique), de la canne à sucre (acide glycolique), du lait (acide lactique), des raisins (acide tartrique) et de l'amande amère (acide mandélique).
Ils sont utilisés depuis l'Antiquité, lorsque Cléopâtre prenait des bains de lait afin d'adoucir la peau (31).

Ce sont des agents de desquamation, non irritants à des concentrations inférieures à 5%.
Ils stimulent également la synthèse de collagène et d'élastine ainsi que le renouvellement cellulaire.

Ils sont capables de dissocier les cornéocytes en agissant sur la structure même des cornéosomes en modifiant la structure des couches lamellaires du ciment lipidique intercellulaire (29,35).
Ainsi, ils diminuent l'épaisseur de la couche cornée.
Par contre, il a été démontré qu'ils augmentent l'épaisseur de l'épiderme.
Cependant, tous les AHA n'ont pas la même activité. Celle-ci varie en fonction de leur structure et du pH de la formulation.
Ainsi, les AHA à chaîne courte, hydrophiles, se retrouvent en plus grande quantité dans les couches profondes du *stratum corneum* tandis que les acides à chaîne longue ont une prédisposition à rester dans les couches supérieures (31).
De plus, les AHA étant des acides faibles, leur absorption sera optimale lorsque la formulation aura un pH acide.
En effet, les AHA seront sous forme non ionisée et cette dernière est la plus apte à pénétrer à travers la peau (45,46).

Pour montrer cela, nous allons nous appuyer sur deux études analysant l'influence de la formulation et de son pH sur la pénétration des AHA à travers la peau.

3.4.2. Pénétration transcutanée des AHA

L'étude « In vitro percutaneous absorption of AHA… » menée en 1997 par Margaret E.K. KRAELING et Robert L. BRONAUGH a pour objectif de mesurer la pénétration des AHA à travers la peau humaine tout en variant le pH de la formulation.
Cinq AHA sont étudiés : l'acide glycolique, l'acide lactique, l'acide hydroxycaproïque, l'acide hydroxycaprylique et l'acide hydroxycaprique.
Afin d'observer l'influence de la formulation galénique, deux compositions différentes sont établies : la formulation A contient deux agents émulsifiants non ioniques et la formulation B contient un des deux agents, le deuxième étant remplacé par un surfactant ionique.

Les deux formulations sont des émulsions L/H, où les AHA hydrophiles sont contenus dans la phase aqueuse.
La peau humaine issue de chirurgie abdominale est montée sur des cellules de diffusion où l'on applique 3mg/cm² de substance.
La quantité d'AHA ayant pénétré à travers la peau et subsistant au sein des différentes couches cutanées est analysée par scintillation liquide.

Influence du pH :

Quel que soit l'AHA étudié, on remarque une meilleure pénétration cutanée à pH acide.

En effet, 27,2% de la dose d'acide glycolique appliquée pénètre à pH 3 contre 3,5% à pH 7.

Concernant l'acide lactique, 30,4% pénètrent à pH 3 contre 9,7% à pH 7.

Enfin, 43,1% d'acide hydroxycaproïque pénètrent à pH 3 contre 9,4% à pH 7.

	5% Glycolic acid		5% Lactic acid		5% 2-OH-hexanoic acid	
Location	pH 3	pH 7	pH 3	pH 7	pH 3	pH 7
Receptor fluid	2.6 ± 0.7[a]	0.8 ± 0.3	3.6 ± 1.2[b]	0.4 ± 0.1	32.9 ± 2.6[a,b]	1.0 ± 0.2
Stratum corneum	5.8 ± 2.8	1.2 ± 0.4	6.3 ± 1.4	3.2 ± 0.8	3.4 ± 0.4	2.8 ± 0.3
Viable epidermis	6.6 ± 2.5	0.8 ± 0.3	6.6 ± 0.9	3.2 ± 0.8	2.8 ± 1.4	3.7 ± 1.3
Dermis	12.2 ± 1.4[a]	0.6 ± 0.2	13.9 ± 2.3[b]	2.9 ± 1.3	4.0 ± 1.8[a,b]	2.0 ± 0.3
Total in skin	24.6 ± 4.0[a]	2.6 ± 0.6	26.8 ± 4.5	9.4 ± 2.1	10.2 ± 3.3[a]	8.4 ± 1.0
Total absorption	27.2 ± 3.3	3.5 ± 0.9	30.4 ± 3.3	9.7 ± 2.0	43.1 ± 5.9	9.4 ± 1.1

Values are the mean ± SEM of two to five determinations in each of three subjects. Values obtained at pH 3.0 in each location with similar superscripts are significantly different from each other (ANOVA, $p < 0.05$).

Figure 52 : Pourcentages des doses d'AHA absorbés en fonction du pH au sein de la formulation A

(KRAELING, 1997)

Si l'on observe la répartition de l'acide glycolique au sein des couches cutanées, on remarque que de grandes quantités restent présentes dans la peau (24,6% de la dose initiale) avec une prédominance au niveau du derme.

En effet, seulement 2,6% sont retrouvés dans le milieu récepteur.

Par contre, on constate une très bonne pénétration jusqu'au milieu récepteur pour l'acide hydroxycaproïque (32,9% au sein du milieu récepteur).

Influence de la formulation :

Avec cette formulation, on peut s'apercevoir que l'influence du pH reste la même.

Par contre, l'acide glycolique absorbé se répartit différemment au sein des différentes couches.

En effet, une quantité plus importante se retrouve dans le compartiment récepteur (12,2% de la dose appliquée contre 2,6% précédemment).

Location	Percent applied dose absorbed	
	pH 3.0	pH 7.0
Receptor fluid	12.2 ± 5.3	1.4 ± 0.7
Stratum corneum	2.4 ± 1.3	0.1 ± 0.0
Viable epidermis	11.6 ± 2.5	0.4 ± 0.2
Dermis	8.6 ± 2.0	0.4 ± 0.1
Total in skin	22.6 ± 3.2	0.9 ± 0.0
Total absorption	34.8 ± 3.9	2.3 ± 0.8

Values are the mean ± SEM of two to six determinations from five donors (pH 3.0) and three determinations from three donors (pH 7.0).

Figure 53 : Pourcentages des doses d'acide glycolique absorbés en fonction du pH au sein de la formulation B

(KRAELING, 1997)

Ainsi, on remarque que l'absorption de l'acide glycolique dépend du pH de la formulation car à pH neutre, la molécule se trouve à l'état ionisé donc plus polaire et moins facilement absorbable.

<u>Influence de la longueur de la chaîne de l'AHA :</u>

A pH 3, on remarque que les AHA à chaîne longue ont une pénétration légèrement plus faible que ceux à chaîne courte.

En effet, les pourcentages de dose absorbée au sein de la peau sont plus faibles.

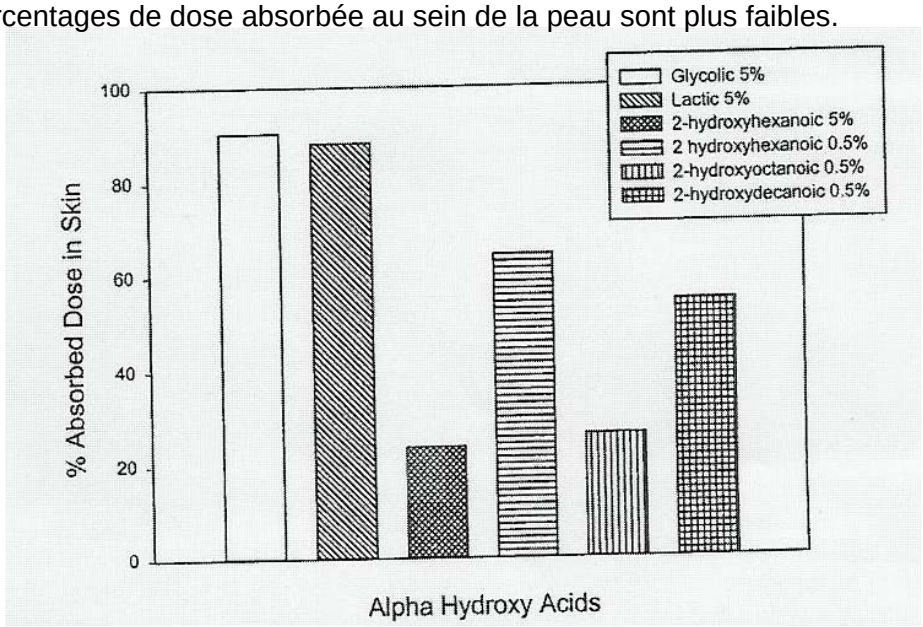


Figure 54 : Influence de la longueur de la chaîne des AHA sur le pourcentage d'absorption cutanée

(KRAELING, 1997)

Ainsi, la pénétration optimale concerne l'acide glycolique et lactique, au sein d'une formulation ayant un pH acide.

De plus, afin d'améliorer l'efficacité des crèmes à base d'AHA, il est conseillé de les appliquer plutôt le soir. En effet, il est admis qu'il y a une amplification de l'activité du renouvellement cellulaire de la peau entre 1 heure et 6 heures du matin.
Tandis qu'elle diminue ses fonctions de protection et de défense, elle se consacre d'avantage à sa régénération (4).

Il ressort de cette étude que l'absorption des AHA dépend du pH de la formulation car à pH neutre, la molécule se trouve à l'état ionisé donc plus polaire et moins facilement absorbable.
La pénétration optimale concerne les formulations à pH acide.
A pH 3, on remarque que les AHA à chaîne longue ont une pénétration légèrement plus faible que ceux à chaîne courte.
Enfin, il semble évident que la meilleure pénétration concerne l'acide glycolique et l'acide lactique.
Après dissociation des cornéocytes au niveau du *stratum corneum*, ils se concentrent au sein du derme où ils relancent la synthèse de collagène et d'élastine.

IV. LES PRODUITS SOLAIRES

Le soleil, source de vie, comporte de nombreux effets bénéfiques, tant pour la santé en elle-même (participant à la synthèse de la vitamine D qui aide à fixer le calcium sur les os…) que sur le plan psychologique (c'est un des plus anciens anti-dépresseurs avec le chocolat !).
Sur le plan social, le bronzage induit par le soleil est considéré comme un signe de bonne santé.
Enfin, depuis 1925 où Coco Chanel mit fin à l'époque « peau blanche », le bronzage est à la mode.
Cependant, le soleil est aussi connu pour ses effets néfastes à court et long terme.
Malgré la mise en place de nombreux systèmes de défense de la part de notre organisme, cette barrière s'épuise au fur et à mesure des expositions : il s'agit donc d'un capital dont nous héritons à la naissance et qu'il convient de gérer toute notre vie.

Afin de nous permettre de profiter des bienfaits du soleil tout en minimisant les dommages causés par ce dernier, les laboratoires ont concentré une grande partie de leurs recherches sur les substances capables de protéger notre peau des irradiations UV.

Mais contrairement à la majorité des produits cosmétiques dont le but est de pénétrer à travers les couches cutanées afin d'y exercer leur action, les filtres solaires doivent rester à la surface de la peau.
En effet, leur but essentiel est de former une couche protectrice au-dessus de l'épiderme afin de créer un effet « barrière » vis-à-vis des rayonnements UV.
Il semble donc tout à fait important d'évaluer et de quantifier leur éventuelle pénétration cutanée.
Auparavant, nous tenterons d'analyser les différentes familles de filtres solaires et d'expliquer leur mécanisme d'action.

4.1. Rayonnements UV et leurs effets sur la peau

Les rayonnements ultra-violets émis par le soleil sont divisés en trois bandes :
- les UVC (230 à 290 nm) n'atteignent pas la surface de la terre, donc sont sans effet sur l'organisme.
- les UVB, (290 à 320 nm), absorbés par l'épiderme, ils pénètrent peu dans le derme.

Ils sont responsables de la pigmentation tardive, qui débute au 2° jour après l'exposition.
- les UVA (320 à 400 nm) traversent tout le derme et sont responsables du phénomène de Meirowski, qui apparaît dans les minutes suivant l'exposition.

Dans ce cas, la pigmentation précède la réaction inflammatoire de la peau, il y a bronzage sans coup de soleil (1,43).

Les rayons visibles (400 à 800 nm) traversent toute la peau librement.
Les infra-rouges (800 à 1000 nm) sont absorbés par le derme et leur énergie est transformée en chaleur.

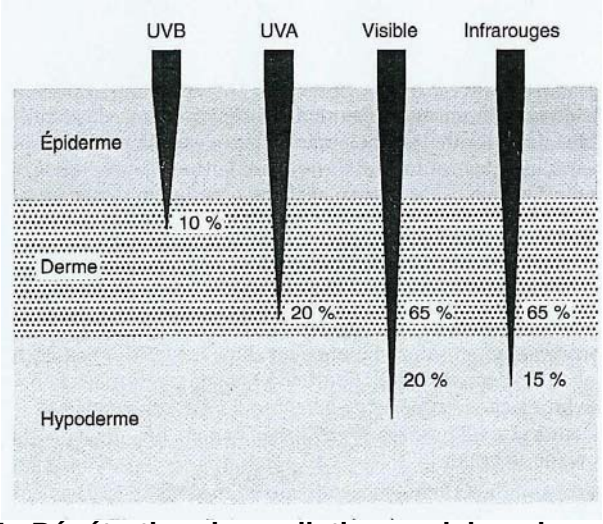


Figure 55 : Pénétration des radiations solaires dans la peau

(AGACHE, 2000)

A l'état naturel, la couche cornée permet de limiter la pénétration des rayons solaires grâce à ses propriétés optiques (1).
Moins de 8% de la lumière incidente subit une réflexion au niveau de l'interface air/peau (1).
92% de la lumière pénètre donc et va subir des phénomènes de réflexion, diffraction (par les filaments de kératine) et absorption (au niveau de la mélanine, acide urocanique et kératine grâce à ses acides aminés polaires) (1,29,31,43,45).

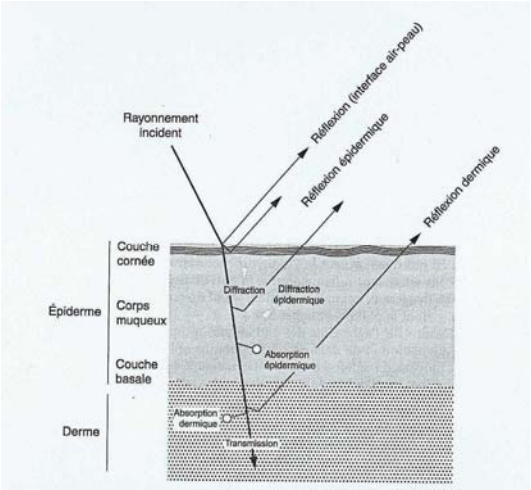


Figure 56 : Phénomènes physico-chimiques modifiant la transmission des radiations optiques dans la peau

(AGACHE, 2000)

L'ADN des cellules cutanées constitue une cible très importante pour les rayons UV car toute modification de la double hélice retentit sur la programmation de la division cellulaire et de l'ensemble des synthèses de la cellule.

On remarque l'apparition de « sunburn cells » = cellule dyskératotiques dans les couches profondes de l'épiderme (35,45).
Ce sont des kératinocytes en apoptose, de forme ronde, ayant condensé leur noyau et n'ayant plus de connexion avec les kératinocytes voisins (35).

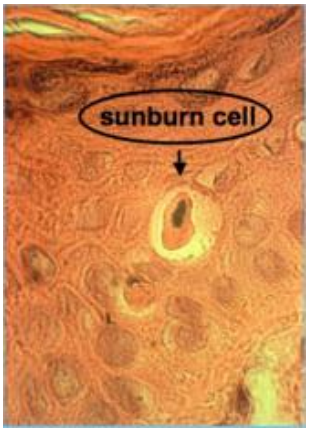


Figure 57 : Section de peau contenant une cellule dyskératotique
(http ://www.bio-pro.de/en/life/magazin/02216/index.html)

Tous ces phénomènes sont dus à une altération du programme de différenciation des kératinocytes qui se trouve retardé et à un accroissement de la prolifération associé à un processus d'apoptose (35).

L'énergie des UVB est suffisante pour entraîner la formation de dimères bloquant la réplication normale de l'ADN. Ainsi, il y absence de mitoses pendant 48 heures après l'exposition solaire.
Ils dénaturent les membranes cellulaires par peroxydation ce qui entraîne une inflammation locale.
Ils sont responsables de dégradation cellulaire et atteignent les parois des capillaires dermiques, ce qui provoque un érythème.
A long terme, par incapacité des systèmes de réparation à compenser les désordres moléculaires infligés au capital génétique à la suite d'expositions fréquentes et prolongées, ils sont responsables de cancers cutanés et d'élastose actinique (45).

Les UVA ne produisent d'érythème qu'à très forte dose.
Ils seraient en partie responsables du vieillissement du derme par réticulation des molécules de collagène.

Cependant, les rayons solaires engendrent une protection naturelle de la peau : le bronzage, correspondant à une concentration de mélanine au sein des kératinocytes, leur permet de protéger leur matériel nucléaire des rayonnements.
Cependant, si le pigment mélanique est très efficace contre les UVB, il défend mal la peau contre le vieillissement accéléré dû principalement aux UVA (31).

Un minimum d'irradiations semble nécessaire pour augmenter la protection. Il semble donc judicieux d'élaborer des filtres solaires capables de protéger la surface cutanée tout en laissant pénétrer un minimum de rayons. Ceci est tout à fait possible, à condition toutefois que leur utilisation n'encourage pas l'exposition au-delà des doses d'irradiations admissibles (45).

Il est également important d'obtenir des filtres capables de couvrir l'ensemble du spectre solaire, c'est-à-dire de 290 à 1000 nm.
On retrouve ainsi dans les produits de protection solaire un filtre ayant un large spectre (ce qui est assez difficile à obtenir) ou le plus souvent une combinaison de filtres ayant chacun une très bonne absorption dans une zone bien déterminée.

4.2. Les substances photoprotectrices

4.2.1. Ecrans solaires

Ce sont des substances qui réfléchissent la totalité des radiations : ce sont des poudres très fines, à fort pouvoir couvrant. Leur action est donc purement physique (31).
Elles sont généralement d'origine minérale et deux types de pigments sont utilisés :

- des poudres pigmentaires de granulométrie 200-300 µm telles que l'oxyde de titane, l'oxyde de zinc, les oxydes de fer, le mica-titane (paillettes de mica recouvertes d'oxyde de titane. Le plus souvent utilisé comme agent nacrant car réfléchit et disperse les radiations).

Ces poudres pigmentaires ont un inconvénient lié à leur granulométrie : elles sont opaques et par conséquent, laissent un dépôt blanc à la surface de la peau.

- des poudres ultrafines d'oxyde de zinc ou d'oxyde de titane, de granulométrie 20 à 80 nm, capables de laisser passer les radiations supérieures à 400 nm et d'absorber et réfléchir les autres (35).

Les pigments sont indispensables dans les écrans dits « totaux » car leur présence permet de ne pas augmenter à l'infini la concentration en filtre.

En effet, ces derniers peuvent parfois entrainer des problèmes de tolérance et de toxicité, contrairement aux pigments, très bien tolérés.

Ils sont donc à conseiller fortement pour les bébés, les jeunes enfants, les peaux sensibles ou allergiques (35).

4.2.2. Filtres solaires

Ils absorbent une partie des radiations courtes, dans une zone du spectre plus ou moins étendue, l'autre partie des radiations étant réfléchie.

On retrouve trois grands groupes de filtres :

- ✓ <u>les filtres anti-UVB :</u> les dérivés de l'acide para-aminobenzoïque (PABA) (se lient à la kératine mais doivent être appliqués 1 heure avant l'exposition, parfois photosensibilisants…), les dérivés de l'acide salicylique (peu photoprotecteurs), les dérivés de l'acide paraméthoxycinnamique (spectre étroit mais absorbent de façon intense la longueur d'onde la plus nocive : 308 nm), les dérivés du benzylidène camphre (300 nm), l'acide phénylbenzimidazole sulfonique (310 nm), l'acide anthranilique et l'octocrylène.
- ✓ <u>les filtres anti-UVA :</u> les dérivés du dibenzoylméthane, les dérivés du benzylidène camphre et le phénylbenzimidazole (335 nm).
- ✓ <u>les filtres à spectre large (anti-UVA+UVB) :</u> les benzophénones 3, 4 et 5 filtrent les UVA et UVB car ont deux maxima d'absorption : 300 et 350 nm.

Elles sont plus ou moins bien tolérées, la benzophénone-3 étant relativement allergisante.

On trouve également les phénylbenzotriazoles plus connus sous le nom de MEXORYL XL® et du TINOSORB M® et la triazine (TINOSORB S®) (29,35,45).

4.2.3. Les pièges à radicaux libres : anti-oxydants

Ils sont introduits dans les préparations en plus d'un filtre. Ils ont pour mission de protéger la peau de l'effet des radiations qui n'ont pas été absorbées et qui peuvent générer des radicaux libres.
On retrouve : l'α-tocophérol, les tocotriénols β,δ,γ, le β-carotène, la superoxyde dismutase (SOD), l'ubiquinone ou coenzyme Q10 et divers extraits végétaux.

Ces molécules protègent les molécules biologiques des effets des UVA en particulier. Ils complètent ainsi l'action des produits ne contenant qu'un filtre anti-UVB.
Néanmoins, il s'avère préférable de filtrer convenablement les radiations plutôt que de vouloir réparer leurs dégâts(35).

Même si l'on reconnait aujourd'hui toute l'importance du choix de l'écran ou du filtre anti-UV au sein d'un produit, la forme galénique de ce dernier sera tout aussi importante.
Les crèmes ont une texture compacte et ont l'avantage de créer une « barrière » aux rayons UV. Par contre, leur inconvénient reste la difficulté à les étaler et la formation d'un film blanchâtre à la surface de la peau.
Les laits et émulsions sont quant à eux beaucoup plus fluides et plus faciles à étaler.

4.3. Méthodes d'évaluation photobiologique des produits solaires

4.3.1. Evaluation de l'effet anti-erythématogène

Cet effet se traduira plus simplement par l'indice de protection UVB qui n'est autre que le facteur de protection solaire (FPS).
Il correspond au rapport entre la Dose Minimale Erythémale (DEM) sur peau protégée et la DEM sur peau non protégée (1).

Des volontaires exempts d'intolérance au soleil et ne présentant pas de troubles de la pigmentation sont soumis à une source artificielle d'UV dont le spectre s'étend de 290 à 400 nm.
Une zone limitée au niveau du dos est irradiée pendant un temps défini, 15 minutes après application du produit à tester.

20±4 heures plus tard, les réponses cutanées sont évaluées par cotation visuelle et la DEM sur peau traitée et non traitée est déterminée (1).

La DEM se définit comme la quantité d'énergie radiante nécessaire pour produire la première réaction de rougeur, perceptible, aux contours nettement définis, lue 16 à 24 heures après l'exposition aux UV.

4.3.2. Evaluation de la protection anti-UVA

La méthode est semblable à la précédente : on utilise simplement comme indicateur du pouvoir photoprotecteur l'inhibition de la pigmentation immédiate à la place de l'érythème.

2 techniques peuvent être utilisées :

- technique IPD (Immediate Pigment Darkening) : lecture immédiate après la fin de l'exposition où l'on mesure la Dose Pigmentante Immédiate Minimum (DPIM).

Cette pigmentation est en général intense mais diminue significativement au cours de l'heure qui suit.

- technique PPD (Persistent Pigment Darkening) : lecture 2 heures après la fin de l'exposition où l'on mesure la Dose Pigmentante Immédiate Persistante Minimum (DPIPM).

Ainsi, le phénomène de pigmentation immédiate est stabilisé mais nécessite en revanche des temps d'exposition plus longs.

Des volontaires exempts d'intolérance au soleil et ne présentant pas de troubles de la pigmentation sont soumis à une source artificielle d'UV dont le spectre s'étend de 320 à 400 nm.

Les sujets de phototypes élevés sont privilégiés car l'apparition de pigmentation chez ces sujets demande des temps d'exposition plus courts.

L'indice de protection correspond au rapport entre la DPIM sur peau protégée et la DPIM sur peau non protégée.

Il est aussi équivalent au rapport entre la DPIPM sur peau protégée et la DPIPM sur peau non protégée (1).

4.3.3. Evaluation de la protection anti-IR

Ces rayons pénètrent en partie dans l'hypoderme et aggravent l'élastose solaire induite par les UV.
La mesure réflectométrique consiste à mesurer le rapport entre la quantité d'énergie incidente et la quantité d'énergie radiante IR réfléchie lorsqu'on expose un sujet protégé par une crème solaire à une source d'IR.
On utilise le plus souvent comme zone test l'avant-bras.
La mesure de l'érythème IR se fait par chromamétrie, au niveau du dos (1).

4.3.4. Evaluation de la résistance à l'eau

La mesure de la résistance à l'eau se fait après passage des sujets en piscine, douche, jacuzzi, bain bouillonnant.
On irradie aux UV la zone d'application du produit (souvent le dos) et mesure la DEM sur zone protégée et non protégée.
On détermine ensuite le FPS après baignade. Si celui-ci est inférieur ou égal à 4, le produit est considéré comme non résistant à l'eau.

4.4. Etudes d'absorption cutanée et de distribution au sein du stratum corneum

Il est important de pouvoir déterminer la réalité de ce passage afin de savoir quelle quantité reste en surface et peut encore jouer le rôle de barrière.
De plus, à long terme, ces substances pourraient nuire à la santé si des quantités importantes traversaient la peau et pénétraient dans la circulation.

4.4.1. Substances minérales : les écrans

- L'étude « Distribution of sunscreens on skin » de J.Schulz et son équipe fut menée en 2002 afin de déterminer l'influence de divers paramètres sur l'absorption cutanée de ces substances.

En effet, le facteur de protection solaire d'un produit et son efficacité dépendent beaucoup de sa distribution au sein des différentes couches de la peau (48).

Les différents paramètres analysés sont la surface d'application, la taille et la forme des particules de pigment.
Pour ce faire, trois préparations différentes à base de dioxyde de titane sont utilisées : la première où il est recouvert d'une substance hydrophobe ; la deuxième où il est rendu amphiphile et la troisième où il est dispersé dans une phase hydrophile.
Ces émulsions sont appliquées sur l'avant-bras de personnes volontaires, pendant 6 heures.
Puis on réalise des biopsies de 2 mm de diamètre qui sont observées au microscope.

On remarque alors que les particules de dioxyde de titane forment un film quasi-continu au niveau des couches les plus superficielles du *stratum corneum*.
La microscopie électronique confirme que les particules ne sont pas absorbées par les couches profondes.

Les pigments s'associent avec les lipides de l'émulsion sur la surface du *stratum corneum*.
Ils tendent à former des agglomérats cubiques dont la taille varie de 20 à 100 nm.

Quel que soit le paramètre étudié, aucun n'engendre la pénétration du dioxyde de titane. Celui-ci reste en surface de la peau et forme un film réfléchissant les rayons UV (48), d'où une efficacité anti-UV incontestable

.

- Une autre étude menée en 2005 par A.O.Gamer et ses collaborateurs a pour but d'évaluer la pénétration éventuelle de l'oxyde de zinc et du dioxyde de titane ainsi que leur répartition au sein des différentes couches cutanées.

Pour ce faire, une émulsion L/H contenant l'oxyde de zinc et deux émulsions L/H contenant le dioxyde de titane sont utilisées.
Des échantillons de peau sont prélevés sur la région latérale d'abdomens de porcs.
Puis ils sont montés sur des cellules de diffusion et l'on y applique les différentes émulsions.
Une partie du milieu récepteur est prélevée à 3, 6, 12 et 24 heures.

Puis les quantités résiduelles au niveau de la peau sont analysées grâce aux techniques de stripping, après lavage de la surface cutanée.
Les échantillons prélevés sont analysés par spectroscopie atomique (27).

Concernant l'oxyde de zinc, on remarque que 99,5% en moyenne de la dose appliquée est retrouvée dans les 5 premières couches de stripping.
1,5% de la quantité déposée se retrouve dans le compartiment récepteur.
Le dioxyde de titane est quant à lui complètement éliminé par le lavage puisqu'aucune quantité résiduelle n'est retrouvée dans les couches de stripping.
De plus, il n'est pas retrouvé dans le compartiment récepteur, ce qui est nécessaire si l'on veut être sûr que cette substance ne passe pas dans le sang.

Table 1
Relative amounts of the metals in various compartments of the diffusion cells after treatment of Porcine skin in vitro with microfine zinc oxide and titanium dioxide applied in cosmetic formulations

Skin absorption (% of applied dose)	10% T-Lite SF-S (TiO_2) formulation			10% T-Lite SF (TiO_2) formulation			10% Z-Cote (ZnO) formulation		
	Animal # 1	Animal # 2	Animal # 3	Animal # 1	Animal # 2	Animal # 3	Animal # 1	Animal # 2	Animal # 3
Total recovery	100.4 ± 1.4	99.7 ± 2.3	98.2 ± 4.7	92.2 ± 4.4	93.0 ± 1.6	86.1 ± 5.8	104.2 ± 1.8	102.3 ± 2.8	106.8 ± 2.3
Non-absorbed dose	100.2 ± 1.3	99.7 ± 2.2	97.9 ± 4.7	92.1 ± 4.4	93.0 ± 1.6	85.7 ± 5.7	100.5 ± 1.8	99.4 ± 2.8	103.7 ± 2.3
Skin washing	100.2 ± 1.3	99.6 ± 2.2	97.7 ± 4.9	92.0 ± 4.3	92.9 ± 1.7	85.4 ± 5.7	NP	NP	NP
First pool tape strips (5)	0 ± 0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0 ± 0.1	0 ± 0.1	0.3 ± 0.4	98.6 ± 1.4	97.6 ± 3.0	102.3 ± 2.1
Second pool tape strips (5)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.1 ± 0.1	0 ± 0	1.0 ± 0.6	1.3 ± 1.0	0.6 ± 0.3
Third pool tape strips (10)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	0.7 ± 0.8	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.3
Fourth pool tape strips (10)	NP	NP	NP	NP	NP	NP	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Skin preparation	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0 ± 0	0.5 ± 0.7	1.5 ± 0.5	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.2
0–24 h receptor fluid Samples + wash out	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0.9 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
Receptor fluid	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.04
Absorbed dose (treatment)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2.3 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.1
Background#	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.6 ± 0.9	1.6 ± 0.0	1.5 ± 0.0

Values represent mean ± standard deviation ($n = 3$).
NP: not performed.
#Background: total presence of zinc in receptor fluid of vehicle treated skin.
ND: not detected.

Figure 58 : Quantités de pigments minéraux retrouvés dans divers compartiments de la cellule de diffusion après traitement de peaux de porcs

(GAMER, 2005)

Il ressort de cette étude que ni les particules d'oxyde de zinc ni celles de dioxyde de titane ne pénètrent à travers le *stratum corneum*.
Aucune particule n'est retrouvée dans les couches profondes de la peau.
Un simple lavage de la peau suffit à ôter le dioxyde de titane.

Il s'avère évident que ces deux substances n'engendrent pas d'exposition systémique.

4.4.2. Comparaison substance minérale/substance organique

L'étude « In vitro percutaneous absorption and in vivo stratum corneum… » menée en 2007 évalue la pénétration du dioxyde de titane et du méthylène bis-benzotriazoyl tetramethylbutylphénol (MBBT) à travers la peau humaine.

Les essais in-vivo sur des volontaires ne permettant pas de déterminer les quantités retrouvées dans chaque couche cutanée, il est nécessaire d'y ajouter des tests in vitro grâce aux cellules de diffusion.

In vivo, les formulations sont appliquées sur l'avant-bras et laissées pendant 5 heures en contact.

Puis le stripping permet d'étudier les quantités résiduelles.

In vitro, on utilise des résidus de chirurgie esthétique qui sont montés sur cellules.

Les substances sont détectées par CLHP et méthode colorimétrique (37).

- MBBT : in vitro, 89,4% de la quantité appliquée est retrouvée dans les 15 premières couches de stripping et 10,1% au niveau de l'épiderme.

Moins de 0,1% sont retrouvés au niveau du compartiment récepteur.

In vivo, 92,2% de la dose appliquée est retrouvée dans les 15 premières couches de stripping.

In vivo, la quantité de MBBT diminue progressivement avec la profondeur et environ 50% sont retrouvés dans les 3 premières couches de stripping.

Par contre, in vitro, plus de 70% du MBBT appliqué est retrouvé dans les 3 premières couches.

Les caractéristiques physicochimiques du MBBT expliquent sa localisation préférentielle au sein des couches les plus superficielles.

- TiO_2 : in vitro, plus de 94,2% se retrouve dans le *stratum corneum*, 5,6% dans l'épiderme et moins de 0,1% au niveau du derme.

Aucune quantité n'a été détectée dans le compartiment récepteur.

In vivo, 93% se trouve dans les 15 premières couches de stripping.

In vivo, 60% persiste dans les 3 premières couches et plus de 75% in vitro.

	MBBT		TiO_2	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
Applied dose	178 ± 4.7	167 ± 7.4	60.6 ± 3.1	58.4 ± 1.9
SC, 15 tape strippings	142 ± 6.4	154 ± 14	50.7 ± 2.4	54.4 ± 1.7
Epidermis	16.2 ± 6.1	/	3.0 ± 0.8	/
Dermis	0.5 ± 0.2	/	0.06 ± 0.09	/
Receptor fluid	LOD	/	n.d.	/
Total recovery	159 ± 6	154 ± 14	53.8 ± 2.9	54.4 ± 1.7
% of applied dose	89.3	92.2	88.8	93.2

Means ± SD, n = 3, data expressed in $\mu g/cm^2$. n.d. = Not detected.

Figure 59 : Distribution du MBBT et du dioxyde de titane au sein des couches cutanées lors d'études *in vivo* et *in vitro*

(MAVON, 2007)

Au microscope, aucune particule de dioxyde de titane n'est observable au sein des couches profondes de la peau.
Ainsi, la plupart des particules appliquées restent en surface où pénètrent par le biais des follicules pileux (37).

En conclusion, le dioxyde de titane ne pénètre absolument pas à travers les couches cutanées. Le MBBT pénètre légèrement plus mais ceci est considéré comme négligeable.
Des particules de dioxyde de titane sont retrouvées au sein des follicules pileux mais ne pénètrent pas plus profondément.

4.4.3. Substances organiques : les filtres

✓ Comparaison de la pénétration de 5 filtres solaires :

L'étude « The stripping technique : in vitro absorption… » menée en 2000 par G.Potard compare l'absorption cutanée de l'octyl méthoxycinnamate, la benzophénone-4, la benzophénone-3, l'octyl triazone, et l'octocrylène.
Pour ce faire, les filtres sont incorporés dans des émulsions L/H et appliqués sur des échantillons de peau issus de chirurgie abdominale ou mammaire montés sur des cellules de diffusion, pendant 16 heures.
Le stripping permet de déterminer la répartition des filtres dans les différentes couches cutanées et l'analyse se fait en CLHP.

Une première analyse au bout de 30 minutes et une deuxième au bout de 16 heures montrent que les substances continuent à pénétrer même 30 minutes après application.
On remarque que seules la caféine et la benzophénone-3 sont retrouvées dans le compartiment récepteur.
Cependant, la vitesse de diffusion de la caféine est plus rapide car on ne détecte pas la benzophénone-3 dans le milieu récepteur 30 minutes après application, contrairement à la caféine.
Le filtre ayant la meilleure rétention au sein du *stratum corneum* est l'octocrylène.

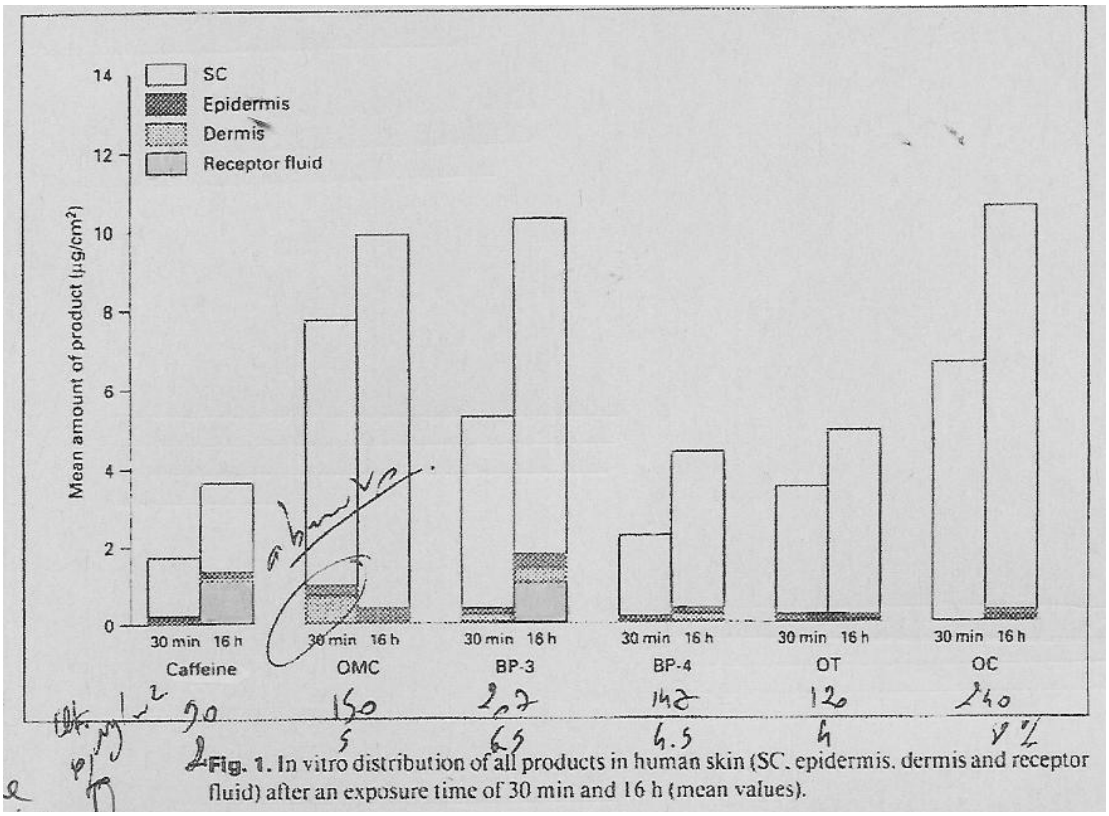


Figure 60 : Distribution de filtres UV et caféine *in vitro* sur échantillons de peau humaine

(POTARD, 2000)

Les quantités retrouvées au sein de la couche cornée sont similaires pour un même filtre, quel que soit le temps d'exposition, ce qui signifie que la plupart des produits saturent très rapidement la couche cornée et l'absorption devient impossible.

Le stripping nous montre que les quantités retrouvées augmentent jusqu'à la 6ème couche puis restent constantes.

En conclusion, une moyenne de 90% de substance retrouvée au sein de la couche cornée est présente dans les 6 premières couches et 94% sont présents dans les 8 premières.

Il ne fut donc pas nécessaire de faire plus de strips pour classifier les substances selon l'importance de leur pénétration.

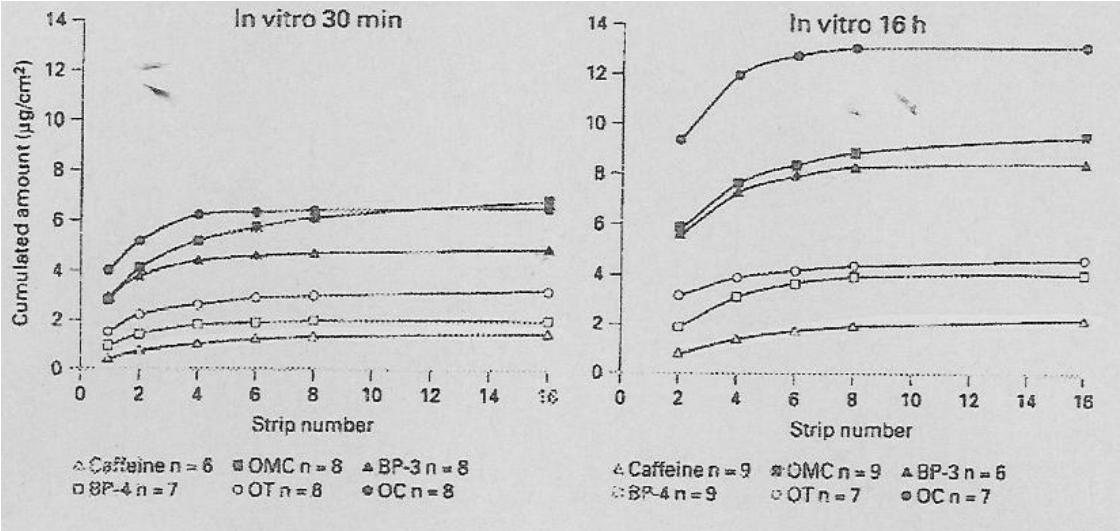


Figure 61 : Quantités cumulées de filtres UV au sein du *stratum corneum* de peau humaine, *in vitro*

(POTARD, 2000)

Les limites de cette expérience sont qu'aucune relation ne peut être faite entre les quantités retrouvées au sein de la couche cornée et celles pénétrant au sein de l'épiderme, du derme et du milieu récepteur.

On remarque par conséquent que les filtres UV remplissent bien leur fonction de barrière puisqu'ils pénètrent peu dans la peau et restent concentrés au niveau du *stratum corneum*, en surface.
Plus un filtre sera lipophile et mieux il restera en surface, lié à la couche cornée.
La benzophénone-3 a un profil de pénétration similaire à celui de la caféine, qui pénètre très bien à travers la peau, ce qui en fait un mauvais filtre solaire, contrairement à l'octocrylène qui a une excellente rétention au sein de la couche cornée.
94% des filtres restent en surface et peuvent être classés selon leurs concentrations : octocrylène, octyl méthoxycinnamate, octyl triazone, benzophénone-3, benzophénone-4.

✓ <u>Etude de la pénétration de la benzophénone-3 :</u>

« Benzophénone-3 : rapid prediction and evaluation… ».
Cette étude est menée par C.Fernandez en 2002 sur des volontaires sains à qui l'on applique une solution d'acétone contenant de la benzophénone-3 au niveau de l'avant-bras.
Puis le solvant est évaporé et la surface est recouverte d'aluminium.
Les quantités recueillies sont analysées en spectrométrie UV.
Ceci concerne la méthode par différence.

La méthode de stripping est aussi utilisée : la benzophénone-3 est contenue dans de l'éthylène glycol, l'excédent est ôté et on réalise 7 couches de stripping.
L'analyse se fait cette fois par CLHP (23).

De part ses propriétés physicochimiques, la benzophénone-3 semble être un bon candidat à la pénétration cutanée.

La méthode par différence évalue la quantité de substance absorbée par la peau en déterminant la différence entre la quantité appliquée et immédiatement recueillie et celle recueillie 4 heures après.
Le pourcentage d'absorption correspond ainsi à cette différence divisée par la quantité initialement appliquée.
Il est de 35,67% pour la benzophénone-3.
Ceci ne s'explique pas uniquement par les caractéristiques de la molécule mais aussi par le solvant, qui affecte les propriétés de barrière du *stratum corneum* en dénaturant l'organisation lipidique.

La méthode de stripping montre que la quantité retrouvée dans le *stratum corneum* après 30 minutes d'exposition est de 4%.

Tout ceci montre que la benzophénone-3 reste très peu à la surface de la peau et pénètre très rapidement, dans les 30 premières minutes après application. Malgré sa bonne absorption des rayons UVA et UVB, c'est un filtre moyennement efficace, qu'il serait nécessaire de réappliquer très souvent s'il était contenu seul dans la formulation.

Afin d'obtenir une efficacité maximale, il est indispensable de renouveler l'application des filtres solaires au minimum toutes les 2 heures et après chaque baignade.
La première application étant souvent insuffisante et correspondant à la saturation du *stratum corneum*, il faudrait remettre du produit environ 20 minutes après la première application (14).

✓ <u>Etude de la pénétration du PABA, comparée à celle de la benzophénone-4 :</u>

C.Couteau réalise en 2001 une étude nommée « Stripping method to quantify… » afin de comparer la rémanence de deux filtres solaires hydrosolubles : le PEG-25 PABA et la benzophénone-4.
Ces deux substances sont solubilisées dans de l'eau et dans une émulsion L/H et appliquées sur l'avant-bras de 21 femmes volontaires.
Divers strippings sont réalisés à 1, 2 5 et 7 heures et les quantités recueillies analysées en CLHP (12).

Après 1 heure (1° strip), on remarque que 70% de la benzophénone appliquée est encore présente contre 40% de PEG-25 PABA.

Après 7 heures, on remarque la même chose (45% contre 20%).

Ainsi, le PEG-25 PABA pénètre plus vite que la benzophénone-4, il est donc moins rémanent au sein de la couche cornée.

a *b*

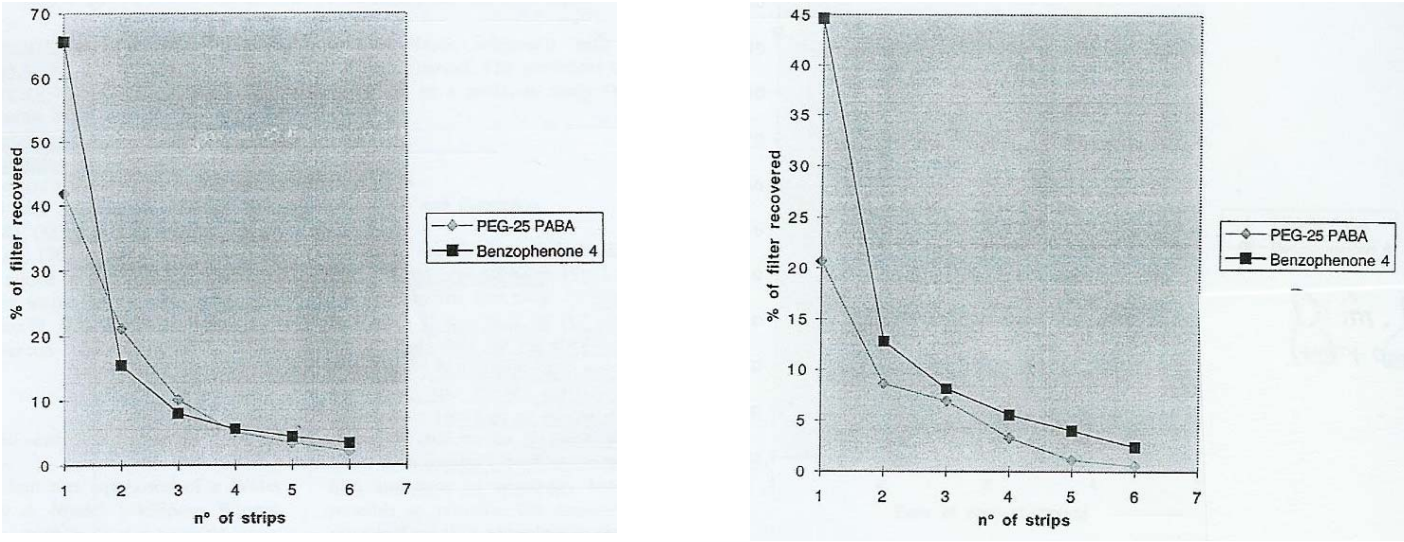


Figure 62 : Quantités de filtres au sein des différentes couches de stripping 1 heure (a) et 7 heures (b) après application

(COUTEAU, 2001)

Si on analyse l'influence de la formulation, on remarque une plus faible rémanence des filtres contenus dans l'émulsion.

En effet, au bout de 2 heures, 45% des filtres appliqués sont retrouvés dans le *stratum corneum* s'ils sont contenus dans l'émulsion contre 68 à 82% s'ils sont présents dans l'eau.

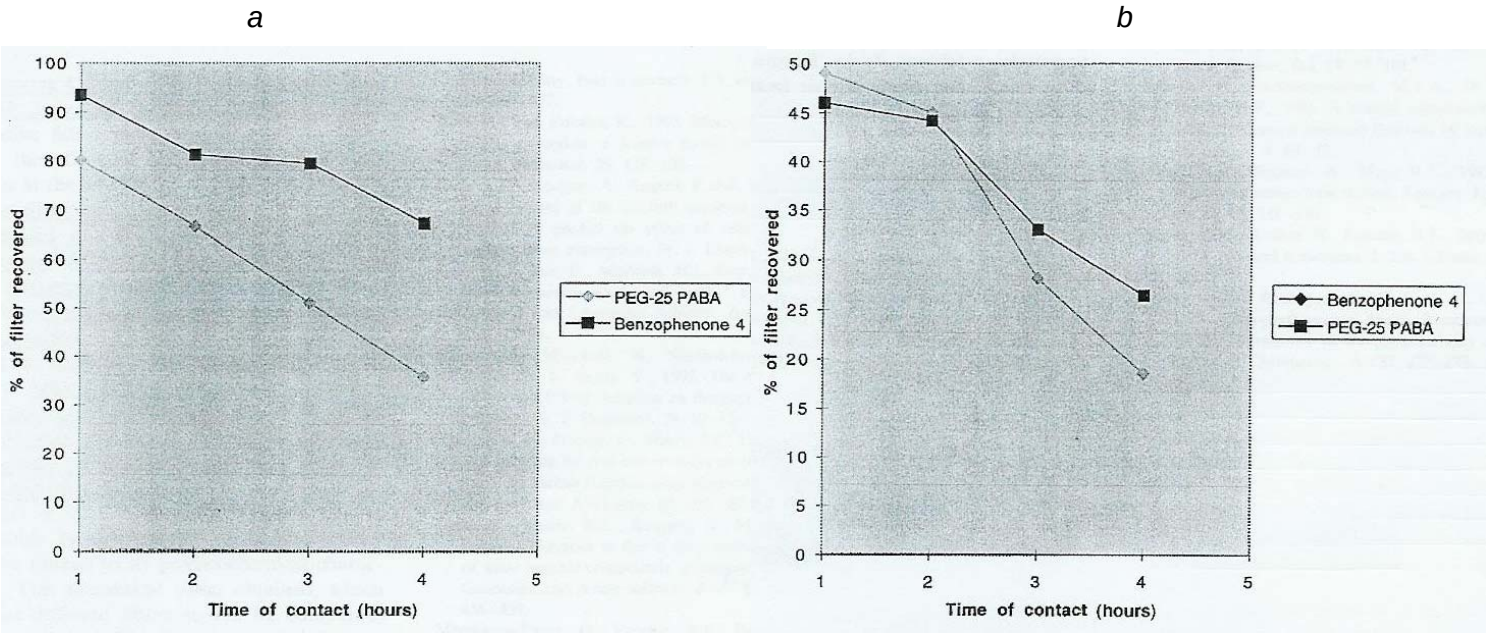


Figure 63 : Quantités de filtres au niveau du *stratum corneum* au sein d'un milieu aqueux (a) et d'une émulsion L/H (b), en fonction du temps

(COUTEAU, 2001)

L'incorporation des filtres dans des émulsions L/H augmente leur pénétration et particulièrement celle de la benzophénone-4. Le PEG-25 PABA a une très mauvaise rémanence, et s'avère donc être un filtre ayant un effet barrière médiocre.

✓ <u>Comparaison de leur pénétration avec une substance de référence : la caféine</u>

Etude « Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine… ».

En 1999, G.Potard et son équipe ont analysé la répartition de 5 filtres UV (octyl méthoxycinnamate, benzophénone-3, benzophénone-4, octyl triazone et octocrylène) et de la caféine au sein des différentes couches cutanées (41).

Les filtres UV sont incorporés dans des émulsions L/H et appliqués sur des échantillons de peau issus de chirurgie abdominale ou mammaire montés sur cellules de diffusion.

Le temps de contact est de 16 heures.

Les quantités de substances recueillies sont analysées en CLHP à des longueurs d'ondes bien précises et les solvants utilisés sont l'isopropanol pour les filtres lipophiles (OMC, BP3, OT et OC) et un mélange eau/méthanol pour la BP4 et la caféine.

Dans le compartiment récepteur, les quantités retrouvées sont très faibles voire proches de zéro, sauf pour la BP3 dosée à 1,0±0,4µg/cm².

Ce taux de pénétration est comparable à celui de la caféine (1,1±0,8µg/cm²).
Les quantités moyennes au niveau des couches cutanées sont faibles.
Le *stratum corneum* contient la plus grande quantité de filtres avec un maximum de 2,3±2,0µg/cm².
La plus faible quantité concerne la caféine (2,3±2,0µg/cm²) (41).

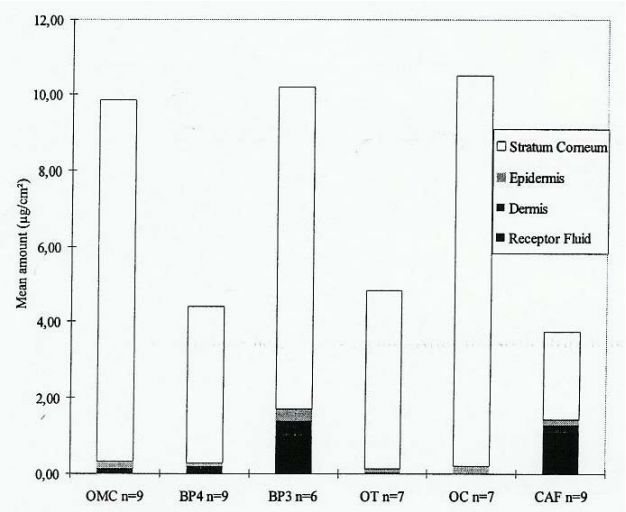


Figure 64 : Distribution de filtres UV et de caféine au sein de peau humaine
(POTARD, 1999)

Grâce à la technique de stripping, ils ont pu observer que les 6 premières couches de stripping contiennent plus de 70% des substances appliquées.
Deux groupes se distinguent par rapport à leur concentration et donc leur rétention au sein du *stratum corneum*.
Le premier est composé des substances les plus lipophiles (OC, BP3, OMC et OT) qui ont une grande rétention au niveau de la couche cornée et le deuxième comprend la BP4 et la caféine, substances hydrophiles.
En effet, le *stratum corneum* a une forte affinité pour les composants lipophiles de part sa structure constituée d'un ciment lipophile liant des protéines hydrophiles (41).

On remarque donc que les filtres UV pénètrent peu dans la peau et restent concentrés au niveau du *stratum corneum*, en surface.
Plus un filtre sera lipophile et mieux il restera en surface, lié à la couche cornée.
Cependant, on peut se demander quelles peuvent être les conséquences du passage de la benzophénone-3 dans le compartiment récepteur.
Le problème est double : du fait de son passage, elle se retrouve moins concentrée en surface et donc perd son efficacité. De plus, ce passage ne peut-il pas engendrer un effet systémique plus ou moins néfaste pour l'organisme ?

4.5. Passage systémique et toxicité potentielle

Nous avons vu précédemment que la benzophénone-3 se retrouvait dans le compartiment récepteur.
Il est donc important de savoir si cette molécule est capable de se retrouver dans la circulation sanguine et d'y exercer un quelconque effet sur l'organisme.
Pour ce faire, on dosera le plus souvent cette molécule dans les urines.

D'autres molécules pourrait avoir un tel effet car Rosen C. a retrouvé 1 à 2% d'oxybenzone dans les urines après 12 heures d'application pour une dose 6 fois supérieure à la quantité maximale autorisée.
Cependant, la réalité de ce passage reste tout de même relativement faible.
Il semblerait par contre que la benzophénone-3 pénètre à des taux suffisamment élevés pour pouvoir générer des effets secondaires (14).

✓ Etudes in vivo, in vitro et sur animaux :

L'étude de Kenneth A. Walters porte sur quatre principaux filtres : la benzophénone-3, l'octyl méthoxycinnamate, l'octocrylène et l'octyl salicylate.
Ces filtres sont incorporés dans 2 formulations différentes : une émulsion et une pommade lipophile (54).

In vivo, les sujets sont exposés aux produits maximum 6 heures et des échantillons de *stratum corneum* sont prélevés 30 min, 2 et 6 heures après l'application.
On remarque alors que la pénétration est bien plus importante à partir de l'émulsion.
On retrouve de grandes quantités de benzophénone-3 au sein du derme et du milieu récepteur et ce, quelle que soit la formulation utilisée.
En effet, cette molécule aurait une faible affinité pour le *stratum corneum* et pénétrerait donc rapidement en profondeur.
Il semble donc que cette molécule soit même retrouvée dans les urines ou le lait maternel.

In vitro, seule la benzophénone-3 est détectable dans le compartiment récepteur (environ 10% de la dose appliquée fut retrouvée).
Ce passage transcutané de benzophénone-3 est problématique car on la retrouve dans des crèmes solaires pour enfants.
Or il est bien connu que le ratio surface corporelle/poids et beaucoup plus important chez les enfants et ceci expose à une forte concentration de filtres et un effet systémique non négligeable.

L’octyl salicylate pénètre très peu puisqu’il reste 69,57% au niveau de la peau de la dose appliquée à partir de lotion hydroalcoolique et 54,50% à partir de l’émulsion huile/eau.

Même si la pénétration transcutanée est reconnue supérieure chez les modèles animaux, ceux-ci sont utilisés afin d’évaluer l’excrétion urinaire et fécale de benzophénone-3.
Ainsi, 13,2 à 39,2% de la dose appliquée est retrouvée dans les urines et 3,71 à 6,67% dans les matières fécales (54).

Il est évident que la benzophénone-3 pénètre très facilement.
Mais quelles peuvent-être les conséquences d’un passage systémique ?
Cette molécule peut-elle agir sur l’organisme ? De quelle façon ?
C’est un filtre à spectre large, donc efficace et beaucoup utilisé.
L’enjeu est donc de diminuer au maximum sa pénétration en intervenant sur les excipients et la forme galénique du produit solaire.

Des chercheurs ont évalué les effets de filtres (benzophénone-3, homosalate, 4-méthyl-benzylidène-camphor, octyl méthoxycinnamate, butyl-méthoxy-dibenzoylméthane et octyl-diméthyl-PABA) sur des cellules cancéreuses in vitro et sur utérus de rat in vivo.

Presque tous se sont révélés présenter une activité oestrogénique in vitro sur les cellules cancéreuses en induisant une prolifération cellulaire.

In vivo, la majeure partie dont la benzophénone-3 a engendré une augmentation du poids utérin chez le rat.
Elle retarderait la puberté masculine, et affecterait le poids des organes reproducteurs chez le mâle et la femelle (14).

Cependant, même si une activité « œstrogène-like » a été démontrée, il s’avère nécessaire de poursuivre ces investigations chez l’homme.
La benzophénone, l’octyl méthoxycinnamate et le 4-méthyl-benzylidène-camphor sont excrétés dans les urines après application cutanée.

Cependant, les filtres sont ici utilisés à dose maximale autorisée et le passage percutané n'engendre aucun effet sur le taux de FSH et LH.

Ainsi, les résultats des ces études semblent relativement rassurants mais il s'avère indispensable de mener des études épidémiologiques sur ce sujet et ce, pour toutes les molécules afin d'être sûr de leur innocuité.

Un autre effet toxique éventuel concernerait l'acide para-aminobenzoïque (PABA).
En effet, à cause de son importante instabilité à la lumière, celui-ci est photosensibilisant.
Il est responsable d'urticaire, de dermatites allergiques et se décompose en nitrosamine, produit de dégradation ayant de potentiels effets carcinogènes (39).
Pour lutter contre cela, les chercheurs ont encapsulé ces molécules dans des liposomes, formant un film protecteur.
Ceci fonctionne aussi en le complexant avec des cyclodextrines ou en l'intercalant au sein d'hydrotalcite.

4.6. Techniques utilisées pour limiter la pénétration des filtres

Etant donné la nécessité pour un filtre de rester en surface afin d'y exercer toute son activité, les chercheurs ont tenté d'élaborer des techniques et des formes galéniques permettant d'éviter au maximum la pénétration des actifs au sein des couches cutanées.

En 2005, Ramon et son équipe ont évalué l'influence de plusieurs types de liposomes sur la pénétration cutanée de l'éthyl hexyl méthoxycinnamate.
On réalise 4 formulations différentes : des liposomes à base de phospholipides insaturés (PC), des liposomes à base de phospholipides saturés (HPC), des liposomes à base de lipides (IWL) et une émulsion L/H.
In vivo, la technique de stripping est utilisée, sur 6 volontaires à qui l'on applique les diverses formulations au niveau de l'avant-bras.
In vitro, on utilise de la peau de porc montée sur cellules de diffusion et on laisse en contact pendant 16 heures.
Les quantités retrouvées sont analysées en CLHP (44).
In vitro :

On peut remarquer que le filtre pénètre le plus à partir des liposomes PC, ce qui correspond à la plus faible concentration en surface (72,19µg/cm²).

La meilleure rétention concerne l'émulsion L/H (91,63µg/cm²).

L'absorption totale est à peu près la même pour les 4 formulations, avec l'absorption la plus faible pour les liposomes HPC.

Cette absorption correspond aussi bien aux quantités retrouvées dans le compartiment récepteur qu'à celles au niveau des différentes couches cutanées.

Ceci s'expliquerait par le fait que l'HPC a une composition et une organisation similaire à celle des lipides du *stratum corneum*.

Ainsi, elle s'intégrerait à ces derniers ce qui renforcerait l'effet barrière.

Percent	PC liposomes	HPC liposomes	IWL liposomes	O/W emulsion
Surface	72.19 ± 2.10	82.81 ± 2.89	86.25 ± 1.41	91.63 ± 5.39
Stratum corneum	11.82 ± 1.12	4.35 ± 1.73	5.56 ± 0.57	3.43 ± 1.04
Epidermis	2.99 ± 0.39	0.79 ± 0.56	1.28 ± 0.27	0.84 ± 0.15
Dermis	0.58 ± 0.12	b.l.q.	0.58 ± 0.25	0.31 ± 0.06
Receptor Fluid	b.l.d.	b.l.d.	b.l.q.	b.l.q.
Recovery	87.57 ± 2.39	87.97 ± 2.89	93.76 ± 1.06	96.25 ± 5.24
µg/cm²				
Total applied	144.41 ± 0.00	150.00 ± 0.00	112.9 ± 0.00	156.77 ± 22.23
Surface	104.24 ± 3.03	124.22 ± 4.33	97.38 ± 1.59	144.26 ± 28.05
Stratum corneum	17.07 ± 1.62	6.53 ± 2.59	6.28 ± 0.64	5.26 ± 1.28
Epidermis	4.31 ± 0.56	1.19 ± 0.84	1.44 ± 0.30	1.31 ± 0.29
Dermis	0.83 ± 0.17	b.l.q.	0.65 ± 0.28	0.48 ± 0.06
Receptor fluid	b.l.d.	b.l.d.	b.l.q.	b.l.q.
Recovery	126.46 ± 3.48	131.96 ± 2.55	105.85 ± 1.21	151.38 ± 28.04
Percutaneous absorption (epidermis + dermis + receptor fluid)	5.15 ± 0.53	1.21 ± 0.88	2.09 ± 0.17	1.85 ± 0.24

Figure 65 : Distribution de l'éthyl hexyl méthoxycinnamate incorporé dans divers véhicules, lors d'études *in vitro*

(RAMON, 2005)

<u>In vivo :</u>

La plus faible concentration en surface est encore une fois retrouvée pour les liposomes PC (68,56µg/cm²).

Percent	PC liposomes	HPC liposomes	IWL liposomes	O/W emulsion
Surface	68.56 ± 3.08	84.82 ± 2.65	90.37 ± 3.74	91.66 ± 7.19
Stratum corneum	12.86 ± 2.62	4.07 ± 1.22	6.26 ± 1.70	4.43 ± 0.67
Recovery	81.42 ± 1.34	88.88 ± 3.11	96.63 ± 2.49	96.09 ± 7.62
µg/cm²				
Total applied	144.1 ± 0.00	125.81 ± 0.00	112.90 ± 0.00	168.10 ± 7.51
Surface	99.00 ± 4.45	106.70 ± 3.33	102.03 ± 4.23	154.11 ± 15.48
Stratum corneum	18.57 ± 3.78	5.11 ± 1.54	7.07 ± 1.93	7.46 ± 1.27
Recovery	117.51 ± 2.50	111.82 ± 3.91	109.10 ± 2.82	161.57 ± 16.41

Figure 66 : Distribution de l'éthyl hexyl méthoxycinnamate incorporé dans divers véhicules, lors d'études *in vivo*

(RAMON, 2005)

Ainsi, les liposomes insaturés sont capables de saturer le *stratum corneum* rapidement et peuvent augmenter la diffusion du filtre au sein des couches cutanées.
De plus, ils affecteraient l'ultrastructure de la couche cornée en intéragissant avec ses lipides, ce qui la fragiliserait.

Les liposomes ayant une structure proche des lipides de la couche cornée renforceraient quant à eux l'intégrité de la barrière cutanée.

Nous avons pu remarquer que les meilleurs véhicules et les meilleures formulations concernant les filtres solaires sont ceux ayant la structure la plus proche du *stratum corneum*.
En effet, cette structure similaire leur permet de s'incorporer au sein des lipides et ainsi de renforcer l'effet barrière.
Les liposomes à base de phophatidylcholine saturée semblent donc être intéressants car ils libèrent le filtre au sein de la couche cornée tout en s'intégrant à cette dernière.

En conclusion, afin d'être sûr de l'innocuité d'une crème solaire, il serait préférable de la choisir à base d'écrans solaires, tels que le dioxyde de titane ou l'oxyde de zinc, ayant une excellente rétention au sein de la couche cornée.
Cependant, il semble difficile à l'heure actuelle de trouver des produits ne contenant pas à la fois des écrans ainsi que des filtres chimiques.
De plus, la tendance actuelle est aux textures fluides, faciles à étaler et ne laissant pas de traces. Or les écrans minéraux sont surtout retrouvés dans les crèmes plus compactes, car il s'agit de particules micronisées ayant une certaine granulométrie.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, l'architecture et les propriétés physiologiques cutanées nous sont apparues très complexes.
La peau, tantôt véritable barrière active de protection, tantôt utilisée comme voie de pénétration de nombreux médicaments à action systémique, tantôt organe cible de la dermatologie et cosmétologie, apparait bien comme un organe à part entière et une membrane d'échanges.
La dermocosmétologie prend en compte ces données avec pour objectif : créer de nouveaux produits toujours plus actifs avec un perpétuel souci d'innocuité.

Afin d'observer le passage de molécules actives, les laboratoires réalisent au quotidien de nombreux essais de pénétration, en créant des modèles de peaux ou en utilisant de la peau humaine issue de chirurgie esthétique.
Les substances testées sont déposées à la surface des modèles et on laisse pénétrer le principe actif le temps voulu.
A la fin de l'étude, on récupère le milieu récepteur et analyse la concentration en principe actif ainsi que les quantités retrouvées au sein des couches cutanées.
Cependant, malgré des profils de pénétration similaires à ceux de la peau humaine, nous avons pu constater que la reproductibilité des modèles de peaux n'était pas constante.
De plus, ils offriraient une perméabilité plus importante que la peau humaine, ce qui sur-estime le passage des molécules.

Régie par la loi de Fick, l'absorption cutanée dépend surtout de la nature physico-chimique des molécules et de la formulation galénique.
Les molécules ayant le meilleur pouvoir de pénétration sont de nature amphiphile. Cependant, même si sa nature ne s'y prête pas, un choix judicieux de véhicules appropriés permettra d'optimiser son passage à travers la peau.
Pour ce faire, le véhicule pourra solubiliser le principe actif, favoriser le partage avec la peau, créer un effet occlusif ou encore rendre le principe actif à l'état non ionisé.
Les formulations galéniques les plus aptes à la pénétration sont les émulsions H/L, les microémulsions et les liposomes.

✓ En ce qui concerne les produits amincissants, la majorité des études concerne la caféine, molécule la plus fréquemment utilisée et dont l'efficacité *in vitro* n'est plus à démontrer.
Il s'agit d'une molécule hydrophile, ayant une très grande capacité de pénétration.
En effet, elle traverse sans souci l'épiderme puis le derme pour se retrouver dans le milieu récepteur.
On peut donc supposer qu'elle atteint l'hypoderme et y exerce son action lipolytique.

Afin d'optimiser sa pénétration, il est possible d'utiliser des émulsions de type H/L et le fait d'augmenter le pourcentage de phase interne augmente la libération de la caféine.
Une étude réalisée sur le produit ELANCYL® et rendue publique a montré que sa formulation galénique optimise le passage de la caféine en augmentant sa solubilité au sein de la couche cornée.

Cependant, étant donné sa facilité à pénétrer, nous sommes en droit de nous demander si un éventuel passage systémique est possible.
Ceci serait sans doute néfaste pour l'organisme, comme le suggèrent ses nombreuses propriétés pharmacologiques.

✓ Le chef de file des principes actifs anti-vieillissement est le rétinaldéhyde, membre de la famille des rétinoïdes, dérivés de la vitamine A.
Il permet d'apporter à la cellule la molécule active : l'acide rétinoïque tout en évitant les phénomènes d'irritations cutanées engendrées par ce dernier.
Les études analysées ont permis d'observer que le rétinaldéhyde atteint bien les cellules épidermiques et se concentre également au niveau du derme, où il va pouvoir stimuler la synthèse de collagène et d'élastine afin de renforcer et de redonner une certaine élasticité aux tissus de soutien.
Afin d'optimiser sa libération et son activité, son association avec l'acide glycolique semble incontournable puisque l'on retrouve cinq fois plus d'acide rétinoïque au sein de l'épiderme.
Ainsi, il semble évident que le rétinaldéhyde possède une certaine efficacité « anti-âge » puisqu'il relance la synthèse du collagène et permet un effet lissant grâce à ses propriétés kératolytiques.

Une autre famille également très utilisée est celle des alpha-hydroxy-acides ou AHA. Ils ont la capacité de dissocier les cornéocytes et de stimuler la synthèse de collagène.
Après avoir franchi la barrière cutanée, ils se concentrent au niveau du derme. Pour ce faire, il est important d'utiliser une formulation ayant un pH acide.
Deux molécules se distinguent des autres quant à leur pouvoir de pénétration : il s'agit de l'acide lactique et de l'acide glycolique.

✓ Deux grands types d'actifs se distinguent au sein des produits solaires : les écrans minéraux et les filtres chimiques.
Les écrans minéraux, constitués de microparticules, forment un film continu au niveau du s*tratum corneum* et ne pénètrent pas dans les couches profondes.

Ceci leur confère donc une efficacité optimale puisqu'ils créent une véritable barrière aux rayons UV. De plus, ceci nous permet de conclure à l'absence de passage systémique puisqu'aucun vaisseau sanguin n'est localisé à la surface de la peau.

Des résultats assez inquiétants sont cependant à observer pour les filtres chimiques : la benzophénone-3 est retrouvée dans le compartiment récepteur.
Elle a donc la capacité à traverser l'épiderme et le derme.
Non seulement cette molécule s'avère peu efficace car ne reste pas en surface mais en plus, elle est candidate à un éventuel passage systémique.
Les chercheurs ont donc poursuivi leurs recherches sur cette molécule et en ont retrouvé dans les urines et matières fécales d'animaux de laboratoires.
Ces résultats semblent donc inquiétants, d'autant plus que la benzophénone-3 présenterait une activité oestrogénique sur des cellules cancéreuses *in vitro*.
Il s'avère donc indispensable de poursuivre les investigations chez l'homme, d'autant plus qu'il s'agit d'un filtre solaire très répandu et notamment utilisé chez les enfants.
Quels peuvent être les effets de cette molécule sur le corps humain ?
Que seront les conséquences de ce passage à long terme ?

Ce travail rend compte de la complexité de l'élaboration d'un produit cosmétique, afin de le rendre le plus actif possible tout en s'affranchissant de tout effet nuisible.
Cependant, les études concernant les produits ne s'arrêtent pas le jour de sa commercialisation mais sont poursuivies en permanence.
La difficulté en tant que professionnels de santé est d'obtenir des laboratoires les résultats de leurs études, la majorité n'appartenant pas au domaine public.
Ces derniers démontrent l'efficacité de leurs produits grâce aux tests cliniques, qui ne sont pas toujours représentatifs des véritables conditions d'utilisation des produits.
Tout ce travail permet aux laboratoires de garantir la fiabilité de leurs produits et par la même occasion, d'en élaborer de nouveaux, encore plus performants.

ANNEXES

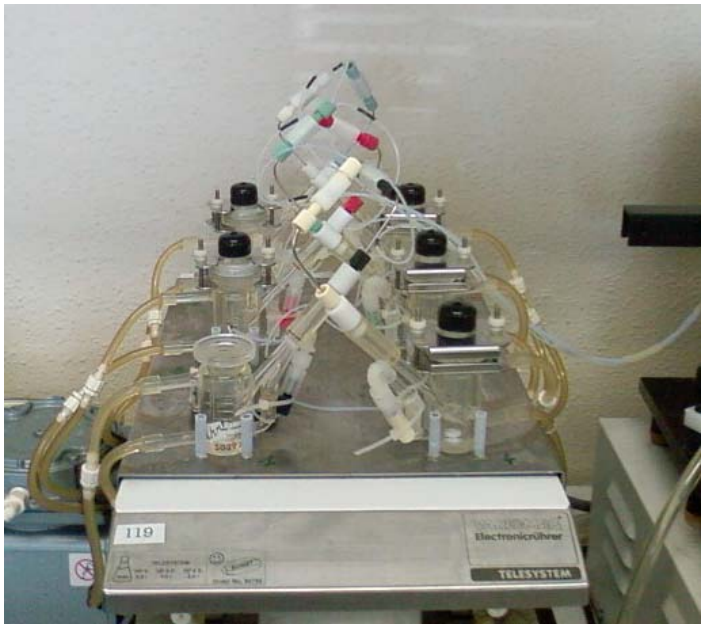
VISITE DU LABORATOIRE DE DERMOCOSMETOLOGIE
A LA FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY MALABRY

Afin d'approfondir mes recherches et d'obtenir une vision plus concrète de mon travail, je me suis rendue en septembre 2007 au laboratoire de dermocosmétologie de la faculté de Pharmacie de Châtenay Malabry (Hauts de Seine).
Une étudiante en Master de Cosmétologie m'a fait visiter le laboratoire et m'a expliqué ses recherches sur la perméation cutanée de la caféine à partir de différents produits minceurs.

✓ Afin d'étudier la pénétration cutanée de la caféine, on utilise des cellules de diffusion en système statique ou dynamique.
Les cellules de diffusion (cellules de Franz) sont de petits récipients en verre munis d'un compartiment donneur au niveau supérieur et d'un compartiment récepteur au niveau inférieur.
Entre les deux, on place un échantillon de peau issu de chirurgie abdominale, servant de membrane de diffusion.
La peau issue de chirurgie est conservée au congélateur. Lorsqu'on veut l'utiliser, on la laisse décongeler : la couche graisseuse s'ôte d'elle-même.
Puis, à l'aide d'un dermatome, on coupe au milieu du derme : il ne reste donc que le *stratum corneum*, l'épiderme et la couche supérieure du derme.
Ces couches ont une épaisseur d'environ 400µm et une surface de 2 cm² ; elles sont placées dans un tampon phosphate à 37°C pendant une nuit.
Puis on place l'échantillon entre les deux compartiments de la cellule.
Lorsque la cellule est montée, on dépose 4 mg de produit sur la peau ce qui correspond à 2mg/cm².

Système statique : les cellules de diffusion sont placées dans un bain marie à 37°C.
Le milieu récepteur constitué d'un tampon phosphate est agité pour mimer le flux sanguin. En effet, si le milieu est statique, le liquide situé au niveau supérieur (au contact de la peau) risque de se saturer en principe actif et il peut se produire un phénomène de résorption (c'est-à-dire que le principe actif retourne vers le derme).
Une quantité définie de produit est déposée sur la peau et on laisse diffuser en prélevant à intervalles réguliers un certain volume de compartiment récepteur.
Le liquide obtenu sera ensuite filtré grâce à une membrane en acétate de cellulose puis analysé en CLHP afin de déterminer la quantité de caféine ayant pénétré pendant une période déterminée.

Système dynamique : les cellules de diffusion sont toujours placées en milieu thermostaté et le compartiment récepteur est prélevé automatiquement à t=1h, 3h, 6h, 8h, 10h.
Avant de prélever le milieu récepteur, l'automate prélève un volume correspondant au volume mort situé dans les capillaires et autres annexes…
Les 6 prélèvements obtenus arrivent directement dans des tubes à essai afin d'être analysés en CLHP.
Pour palier le manque de volume au sein du compartiment récepteur, du tampon phosphate est ajouté dès que le prélèvement est effectué.



Analyse en CLHP : le milieu récepteur est aspiré par un capillaire puis passe à travers une colonne contenant des billes de silice qui se saturent en caféine.
Le détecteur est réglé sur une longueur d'onde de 272nm qui correspond au pic d'absorption de la caféine. Le pic est obtenu en 2min30s environ.
L'aire sous la courbe étant proportionnelle à la concentration en caféine, on peut facilement en déduire le pourcentage de caféine ayant pénétré.

Divers produits minceurs ont ainsi été analysés, tous n'ayant pas la même concentration en caféine (allant de 1 à 4%).
Grâce à ces expériences, on peut observer 3 paramètres :

- la quantité absorbée en fonction du temps (µg/h).
- le pourcentage de la quantité déposée retrouvée dans le compartiment récepteur.
- le flux de caféine (µg/cm²/h).

En observant la courbe correspondant au pourcentage de caféine retrouvé dans le compartiment récepteur, on s'aperçoit que ce n'est pas forcément la crème concentrée à 4% qui libère le plus de caféine.

Il semble évident que l'importance de la libération de la caféine à partir d'une crème minceur ne dépend pas de sa concentration en principe actif mais de sa formulation galénique.
En effet, l'enjeu est de réussir à obtenir des formes galéniques qui favorisent la libération du principe actif tout en essayant d'en incorporer le moins possible afin de minimiser le coût du produit.

✓ On peut également observer la facilité qu'a le véhicule à libérer le principe actif. Pour cela, on utilise une membrane homogène de toute part en polysulfone.
Les membranes sont mises toute une nuit dans un liquide : l'ethomeen. Il s'agit d'une substance lipophile qui va imprégner la membrane et la rendre lipophile à son tour.
Cette étape est indispensable sinon la diffusion de la caféine est beaucoup trop rapide et les courbes de diffusion obtenues ininterprétables.
La lipophilie de la membrane ainsi obtenue permet de ralentir la diffusion de la caféine hydrophile qui aura peu d'affinité pour cette dernière.

Les cellules de diffusion sont alors montées avec les membranes, le tampon phosphate et placées dans un bain thermostaté.
Avant de placer les formulations à tester sur les membranes, l'automate prélève la moitié du tampon de chaque cellule de diffusion afin d'éliminer les impuretés de la membrane pouvant être contenues dedans.
On dépose 4mg de crème à l'aide d'une öse de façon uniforme sur la membrane.
L'expérience est plus courte dans ce cas et ne dure que deux heures avec des prélèvements réguliers à t=15min, 30min, 1h, 1h30 et 2h.
Avant de prélever le milieu récepteur, l'automate prélève un volume correspondant au volume mort situé dans les capillaires…
Avant analyse, le milieu récepteur est filtré à l'aide d'une membrane en acétate de cellulose.
L'analyse en CLHP se fera de la même façon que précédemment.

En observant les quantités de caféine retrouvées dans le milieu récepteur, on s'aperçoit que celle-ci est libérée en plus grande quantité lorsqu'elle est incorporée dans de la vaseline.
En effet, la caféine hydrophile a très peu d'affinité pour cet excipient huileux et le quitte rapidement dès son contact avec la membrane (ou la peau selon le cas).

En conclusion, cette visite du laboratoire de dermocosmétologie a été très enrichissante pour moi et m'a permis de mieux interpréter les études cliniques qui étaient à ma disposition.
De plus, j'ai pu obtenir de nombreux documents très précieux pour mon travail.
Toutes ces expériences sont passionnantes et les résultats parfois surprenants, à l'opposé de ceux que l'on s'imaginait.
De nombreux principes actifs et de formulations galéniques sont testés, permettant de jour en jour de mieux connaitre les produits cosmétiques que des millions de personnes utilisent quotidiennement.

PRODUITS AMINCISSANTS ET LEURS PRINCIPAUX PRINCIPES ACTIFS

PRODUITS	LABORATOIRE	PRINCIPES ACTIFS ET LEURS PROPRIETES
LIPO METRIC®	VICHY	- Caféine : actif liporéducteur. - Acide salicylique : kératolytique, améliore l'aspect cutané. - Escine : veinotonique, lutte contre l'œdème et l'aspect peau d'orange. - Acide capryloyl salicylique : kératolytique. - *Dioscorea opposita :* anti-oedémateux, densifie la structure de l'hypoderme, du derme et de l'épiderme. Active la lipolyse et la microcirculation cutanée. - Extrait de racine d'igname : anti-oedémateux, active la microcirculation. - Acetyl trifluoromethylphenyl valylglycine : inhibe la dégradation de l'élastine. - *Crithmum maritimum :* drainant et raffermissant. - Adrénalyse S : déloge les graisses stockées et désamorce la transformation des pré-adipocytes en adipocytes. - Aminokine-G : stimule la production de collagène et active la synthèse de glycanes.
RETINOL ANTI-CELLULITE ®	ROC	- Caféine : actif liporéducteur. - Carnitine : mobilise les réserves énergétiques et augmente la combustion des graisses par le muscle. - Rétinol : stimule la production naturelle de collagène et contribue à améliorer l'élasticité de la peau. - Néoruscogénine : vasoconstricteur, anti-inflammatoire et anti-oedémateux.
LIPOFEINE GEL®	ARKOPHARMA	- Caféine : actif liporéducteur.
ELANCYL®	GALENIC	- Caféine : actif liporéducteur. - Urée : kératolytique, favorise la diffusion des actifs. - Hespéridine Methyl Chalcone : agent anti-glycation, évite la rigidification du tissu conjonctif. Améliore la micro-circulation. - Extrait de Piloselle : lutte contre la rétention d'eau et fortifie le système veineux. - Extrait de pomme : l'extrait de phloridzine limite le stockage des graisses dans l'adipocyte. Il bloque l'entrée du glucose dans les cellules graisseuses. - Acide salicylique : kératolytique, favorise la diffusion des actifs. - Extrait de poivre de Shisuan : la xanthoxylline qu'il contient favorise la lipolyse. Elle inhibe la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes.
SOMATOLINE COSMETIC ANTI-CELLULITE®	ROGER CAVAILLES	- Caféine : actif liporéducteur. - Escine : agent lipolytique, propriétés veinotoniques. - Extrait d'algues brunes marines : facilite la mobilisation des graisses et augmente la fermeté de la peau. - Menthol : stimule la micro-circulation sous-cutanée, aide à l'augmentation de la pénétration des actifs dans la peau.

PRODUITS ANTI-RIDES ET LEURS PRINCIPAUX PRINCIPES ACTIFS

PRODUITS	LABORATOIRE	PRINCIPES ACTIFS ET LEURS PROPRIETES
YSTHEAL +®	AVENE	- Squalane : émollient nourrissant, réduit l'apparition des ridules. - Rétinaldéhyde : kératolytique. Active les fibroblastes et augmente la synthèse des protéoglycanes. Régénère les cellules vivantes de l'épiderme. - Glucoside de prétocophéryl : anti-radicalaire, protège les cellules cutanées du vieillissement prématuré dû aux facteurs extrinsèques.
ELUAGE gel concentré®	AVENE	- Hyaluronate de sodium :agent hydratant et filmogène, effet lissant. - Rétinaldéhyde : kératolytique. Active les fibroblastes et augmente la synthèse des protéoglycanes. Régénère les cellules vivantes de l'épiderme.
REDERMIC®	LA ROCHE POSAY	- Vitamine C : anti-radicalaire et anti-inflammatoire. Stimule la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène ce qui diminue les ridules. - Madecassoside : stimule la synthèse des collagènes I & III. Inhibe l'activité des enzymes de dégradation des fibres dermiques. - Hyaluronate de sodium : agent hydratant et filmogène, effet lissant. - Vitamine E : anti-radicalaire, protège les membranes cellulaires de la peroxydation lipidique.
SUBSTIANE®	LA ROCHE POSAY	- Huile de noyau d'abricot : propriétés tonifiantes et regénératrices. - Arginine et sérine : agents tenseurs. , - Vitamine E : anti-radicalaire, protège les membranes cellulaires de la peroxydation lipidique. - Acide citrique : AHA, agent de desquamation, stimule la synthèse de collagène et d'élastine.
NEOVADIOL soin densifieur intensif®	VICHY	- Huile de noyau d'abricot : propriétés tonifiantes et regénératrices. - Ferment de *Vitreoscilla filiformis* : action anti-âge.
RETINOX MULTICORRECTION®	ROC	- Rétinol : favorise le renouvellement cellulaire et stimule la synthèse de collagène. - Panthénol : hydratant, participe à la régénération du tissu cutané. Stimule la capacité de rétention de l'eau de la peau, en améliore le tonus et atténue les rides. - Squalane : émollient, redonne souplesse à la peau. - Vitamine C : anti-radicalaire et anti-inflammatoire. Stimule la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène ce qui diminue les ridules. - Cuivre, zinc, magnésium : stimulent les fibroblastes et fortifient l'épiderme. - Vitamine E : anti-radicalaire, protège les membranes cellulaires de la peroxydation lipidique.

PRODUITS SOLAIRES ET LEURS PRINCIPAUX PRINCIPES ACTIFS

PRODUITS	LABORATOIRE	PRINCIPES ACTIFS ET LEURS PROPRIETES
Spray haute protection®	AVENE	- Ethylhexylmethoxycinnamate : filtre anti-UVB. - Octocrylène : filtre anti-UVB. - Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine : anti-UVB et UVA. - Dioxyde de titane : écran minéral. - Oxyde de zinc : écran minéral.
Spray ANTHELIOS XL 50+®	LA ROCHE POSAY	- Ethylhexyl salicylate : filtre anti-UVB, peu efficace. - Mexoryl XL® : filtre anti-UVA+UVB. - Mexoryl SX® : filtre anti-UVA+UVB. - Octocrylène : filtre anti-UVB. - Dioxyde de titane : écran minéral.
Crème minérale sans parfum 50+®	URIAGE	- Dioxyde de titane : écran minéral. - Oxyde de zinc : écran minéral. - Oxydes de fer : écran minéral.
Lait extra fluide SPF 50+®	URIAGE	- Octocrylene : filtre anti-UVB. - Ethylhexyl triazone : filtre anti-UVA+UVB. - Acide benzoïque : filtre anti-UVB.
CAPITAL SOLEIL crème protectrice SPF 30®	VICHY	- Octocrylene : filtre anti-UVB. - Dioxyde de titane : écran minéral. - Butyl methoxydibenzoylmethane : filtre anti-UVA. - Ethylhexyl triazone : filtre anti-UVA+UVB.

TABLEAUX ET FIGURES

TABLEAUX

Tableau 1 : Composition du NMF 18
Tableau 2 : Composition du sébum 34
Tableau 3 : Composition de la phase lipophile du film hydrolipidique 40
Tableau 4 : Classification des phototypes selon Fitzpatrick 47
Tableau 5 : Classification des phototypes tenant compte des caractères phénotypiques 48

FIGURES

Figure 1 : Schéma de la structure de la peau 5
Figure 2 : Les différentes cellules de l'épiderme 6
Figure 3 : Couches cellulaires de l'épiderme 6
Figure 4 : Cycle de vie et différenciation d'un kératinocyte 7
Figure 5 : Couches cellulaires de l'épiderme 8
Figure 6 : Structure schématique de l'épiderme et détail de la couche cornée 10
Figure 7 : Schéma d'un mélanocyte 11
Figure 8 : Couches épidermiques et cellule de Langerhans 12
Figure 9 : Cellule de Merkel 13
Figure 10 : Fibroblaste (A) et fibrocyte (B) 22
Figure 11 : Fibres du derme 24
Figure 12 : Fibres du derme 25
Figure 13 : Schéma d'un adipocyte 27
Figure 14 : Facteurs influant sur la lipolyse 28
Figure 15 : Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain 29
Figure 16 : Schéma d'une glande sudoripare eccrine 30
Figure 17 : Relation entre les concentrations en électrolytes dans la 31
Figure 18 : Structure schématique d'une glande apocrine 32
Figure 19 : Annexes cutanées 33
Figure 20 : Schéma d'un follicule pilosébacé 33
Figure 21 : Schéma d'un poil englué dans le sébum 35
Figure 22 : Vascularisation cutanée 37
Figure 23 : Innervation de la peau 38
Figure 24 : Radiations UV 45
Figure 25 : Coupe histologique d'un épiderme reconstruit à partir d'une sous-population de kératinocytes enrichis en cellules souches somatiques 49

Figure 26 : Modèle de peau pigmenté reproduisant les mécanismes du bronzage 50
Figure 27 : Modèle aux 3 cellules : 51
Figure 28 : Modèle Episkin® avec ses plaques de 12 puits 53
Figure 29 : Vitesse de pénétration du mannitol à travers les 3 modèles de peau testés 54
Figure 30 : Vitesse de pénétration de la caféine à travers les 3 modèles de peau testés..... 55
Figure 31 : Vitesse de pénétration de l'acide laurique à travers les 3 modèles de peau testés 55
Figure 32 : Pénétration du mannitol à travers les 2 modèles testés et la peau humaine 56
Figure 33 : Comparaison de la distribution cutanée du mannitol entre les 2 modèles et la peau humaine après 24h d'application..... 57
Figure 34 : Influence de 3 véhicules sur l'absorption cutanée de la caféine 69
Figure 35 : Influence de 3 véhicules sur l'absorption cutanée de la testostérone 70
Figure 36 : Cinétique de la concentration sanguine suite à une absorption percutanée, en coordonnées semi-logarithmiques 75
Figure 37 : Profil de pénétration de diverses formulations à travers le modèle de peau EpiDerm® 93
Figure 38 : Profil de pénétration de diverses formulations à travers le modèle de peau EpiSkin® 94
Figure 39 : Profil de pénétration de diverses formulations à travers la peau humaine..... 95
Figure 40 : Absorption de la caféine à partir d'émulsions huile/eau et d'émulsions multiples eau/huile/eau à travers la peau humaine, un épiderme reconstitué et une membrane en nitrate de cellulose..... 97
Figure 41 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec des émulsifiants couplés 99
Figure 42 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec des glucoesters 100
Figure 43 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec de polymères de silicone 100
Figure 44 : Influence du pourcentage de phase interne sur la libération de caféine à partir d'émulsions concentrées obtenues avec des esters de sorbitane 101
Figure 45 : Caractéristiques de libération de la caféine à partir d'émulsions concentrées et influence du type d'émulsifiant..... 102
Figure 46 : Pénétration de la caféine à travers la peau humaine à partir de trois formulations..... 103
Figure 47 : Pénétration de la caféine à travers une membrane siliconée à partir de trois formulations104
Figure 48 : Différents types de rides..... 109
Figure 49 : Concentrations épidermiques (a) et dermiques (b) en acide rétinoïque après application de RALGA, rétinaldéhyde à 0,1% et acide rétinoïque à 0,05%..... 118
Figure 50 : Effets de l'acide glycolique et du citral sur l'activité de la rétinaldéhyde deshydrogénase . 119
Figure 51 : Concentrations épidermiques (a) et dermiques (b) en rétinaldéhyde après application de RALGA et de rétinaldéhyde à 0,1%..... 119

Figure 52 : Pourcentages des doses d'AHA absorbés en fonction du pH au sein de la formulation A 122
Figure 53 : Pourcentages des doses d'acide glycolique absorbés en fonction du pH au sein de la formulation B 123
Figure 54 : Influence de la longueur de la chaîne des AHA sur le pourcentage d'absorption cutanée 123
Figure 55 : Pénétration des radiations solaires dans la peau 126
Figure 56 : Phénomènes physico-chimiques modifiant la transmission des radiations optiques dans la peau 126
Figure 57 : Section de peau contenant une cellule dyskératotique 127
Figure 58 : Quantités de pigments minéraux retrouvés dans divers compartiments de la cellule de diffusion après traitement de peaux de porcs 134
Figure 59 : Distribution du MBBT et du dioxyde de titane au sein des couches cutanées lors d'études *in vivo* et *in vitro* 135
Figure 60 : Distribution de filtres UV et caféine *in vitro* sur échantillons de peau humaine 137
Figure 61 : Quantités cumulées de filtres UV au sein du *stratum corneum* de peau humaine, *in vitro* 138
Figure 62 : Quantités de filtres au sein des différentes couches de stripping 1 heure (a) et 7 heures (b) après application 140
Figure 63 : Quantités de filtres au niveau du *stratum corneum* au sein d'un milieu aqueux (a) et d'une émulsion L/H (b), en fonction du temps 141
Figure 64 : Distribution de filtres UV et de caféine au sein de peau humaine 142
Figure 65 : Distribution de l'éthyl hexyl méthoxycinnamate incorporé dans divers véhicules, lors d'études *in vitro* 146
Figure 66 : Distribution de l'éthyl hexyl méthoxycinnamate incorporé dans divers véhicules, lors d'études *in vivo* 146

BIBLIOGRAPHIE

1) AGACHE Pierre, et al.
Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées
Cachan : Editions médicales internationales, 2000.-706p.

2) AKOMEAH Franklin, NAZIR Tahir, MARTIN Gary P., et al.
Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants
European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, 21, 337-345

3) BARAN Robert, MAIBACH Howard I.
Cosmetic dermatology
Londres : Martin Dunitz, 1994.-584p.

4) BARBARAS, Myriam
Soins du visage et produits cosmétiques en officine.-123p.
Th. : Pharmacie : Nancy 1 : 1996 ; 33

5) BARRY B.W.
Drug delivery routes in skin : a novel approach
Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54 (Suppl.1), S31-S40

6) BENECH-KIEFFER F., WEGRICH P., SCHWARZENBACH R., et al.
Percutaneous Absorption of Sunscreens in vitro : Interspecies Comparison, Skin Models and Reproducibility Aspects
Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2000, 13, 324-335

7) BENOHANIAN, Antranik
Antiperspirants and deodorants
Clinics in Dermatology, 2001, 19, 398-405

8) BORDAT P., CHESNOY S.
Mixing Glycolic Acid with retinaldehyde : RALGA, a Technical Achievement
Dermatology, 2005, 210 (suppli 1), 2-5

9) BRONAUGH R.L., FRANZ T.J.
Vehicle effects on percutaneous absorption : in vivo and in vitro comparisons with human skin
British Journal of Dermatology, 2005, 115, 1-11

10) BRONAUGH Robert L., MAIBACH Howard I
Topical absorption of dermatological products
New-York : Basic and clinical dermatology, 1996.-522p.

11) CLEMENT Pascale, LAUGEL Cécile, MARTY Jean-Paul
In vitro release of caffeine from concentrated W/O emulsions : effect of formulation parameters
International Journal of Pharmaceutics, 2000, 207, 7-20

12) COUTEAU C., PEREZ CULLEL N., CONNAN A.E., et al.
Stripping method to quantify absorption of two sunscreens in human
International Journal of Pharmaceutics, 2001, 222, 153-157

13) DARBRE P.D.
Aluminium, antiperspirants and breast cancer
Journal of Inorganic Biochemistry, 2005, 99, 1912-1919

14) DELLIS, Florence
Evaluation du rapport bénéfice/risque des produits solaires.-111p.
Th. : Pharmacie : Paris XI : 2005 ; 87/2000

15) DIAS M., FARINHA A., FAUSTINO E., et al.
Topical delivery of caffeine from some commercial formulations
International Journal of Pharmaceutics, 1999, 182, 41-47

16) DOUCET O., FERRERO L., GARCIA N., et al.
O/W emulsion and W/O/W multiple emulsion : physical characterization and skin pharmacokinetic comparison in the delivery process of caffeine
International Journal of Cosmetic Science, 1998, 20, 283-295

17) DREHER Frank, FOUCHARD Frédéric, PATOUILLET Claire, et al.
Comparison of Cutaneous Bioavaibility of Cosmetic Preparations Containing Caffeine or α-Tocophérol Applied on Human Skin Models or Human Skin ex vivo at Finite Doses
Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2002, 15 (suppl 1), 40-58

18) DREHER F., PATOUILLET C., FOUCHARD F., et al.
Improvement of the Experimental Setup to Assess Cutaneous Bioavaibility on Human Skin Models : Dynamic Protocol
Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2002, 15 (suppl 1), 31-39

19) DUPRE, Carole
Utilisation de la voie percutanée pour une action systémique.-122p.
Th. : Pharmacie : Rennes : 1986 ; 34

20) EPSTEIN Emily, LEROY YOUNG V., SCHORR Maria, et al.
Prospective and Randomized Determination of the Efficacity of Topical Lipolytic Agents
Aesthetic Surgery Journal, 1997, 17, 304-307

21) EXLEY, Christopher
Aluminium in antiperspirants : more than just skin deep
The American Journal of Medicine, 2004, 117, 969-970

22) EXLEY Christopher, CHARLES Lisa M., BARR Lester, et al.
Aluminium in human breast tissue
Journal of Inorganic Biochemistry, 2007, 101, 1344-1346

23) FERNANDEZ C., NIELLOUD F., FORTUNE R., et al.
Benzophenone-3 : rapid prediction and evaluation using non-invasive methods of in vivo human penetration
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2002, 28, 57-63

24) FLAREND R., BIN T., ELMORE D., et al.
A preliminary study of the dermal absorption of aluminium from antiperspirants using aluminium-26
Food and Chemical Toxicology, 2001, 39, 163-168

25) FORT-LACOSTE L., CHARVERON M., DAHLEM G.
Intérêt de l'extrait pur d'algues bleues d'eau douce et de son association à une fibrilline marine dans le vieillissement cutané
Centre de Recherche Dermo-Cosmétique Pierre Fabre. Castanet-Tolosan
Février 2000

26) FREINKEL Ruth K, WOODLEY David T.
The biology of the skin
New York : The Partenon Publishing Group, 2001.-432p.

27) GAMER, A.O., LEIBOLD E., VAN RAVENZWAAY B.
The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through skin
Toxicology in Vitro, 2006, 20, 301-307

28) GIROTTI-CHANU, Catherine
Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de Microtea debilis [en ligne].
Th. : Biochimie : Lyon : 2006.
Disponible sur http://docinsa.insa-lyon.fr/ (consulté le 20 novembre 2006)

29) IMBERT, Françoise
Conseil dermatologique à l'officine. Pathologie solaire et vieillissement cutané.-187p.
Th. : Pharmacie : Nancy 1 : 1995 ; 25

30) KRAELING Margaret E.K., BRONAUGH Robert L.
In vitro percutaneous absorption of alpha hydroxy acids in human skin
J. Soc. Cosmet. Chem., 1997, 48, 187-197

31) LAVIGNE, Béatrice
Les cosmétiques face au vieillissement cutané.-95p.
Th. : Pharmacie : Angers : 1996 ; 103

32) LODEN Marie, MAIBACH Howard I.
Dry skin and moisturizers : chemistry and function
New York : CRC Press, 2000.-447p.

33) LODI, Bénédicte
Rôle de la vitamine A et de ses dérivés dans le traitement du vieillissement cutané.-67p.
Th. : Pharmacie : Angers : 1998 ; 127

34) LOTTE C., PATOUILLET C., ZANINI M., et al.
Permeation and Skin Absorption : Reproductibility of Various Industrial Reconstructed Human Skin Models
Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2002, 15 (suppl 1), 18-30

35) MARTINI, Marie-Claude.
Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie
Paris : Editions médicales internationales, 2003.- 401p.

36) MARTINI Marie-Claude, SEILLER Monique
Actifs et additifs en cosmétologie
Paris : Editions médicales internationales, 2006.-1051p.

37) MAVON A., MIQUEL C., LEJEUNE O., et al.
In vitro Percutaneous Absorption and in vivo Stratum Corneum Distribution of an Organic and a mineral Sunscreen
Skin pharmacology and physiology, 2007, 20, 10-20

38) MAVON Alain, RAUFAST Véronique, REDOULES Daniel.
Skin absorption and metabolism of a new vitamin E prodrug, delta-tocopherol-glucoside : in vitro evaluation in human skin models
Journal of controlled release, 2004, 100, 221-231

39) PERIOLI Luana, AMBROGI Valeria, BERTINI Barbara, et al.
Anionic clays for sunscreen agent safe use : Photoprotection, photostability and prevention of their skin penetration
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2006, 62, 185-193

40) POTARD, Gwenaëlle Marie-Pierre
Etude de l'absorption et de la répartition cutanée des filtres solaires in vitro/in vivo, après application topique sur peau humaine : approche par la méthode des strippings
Th. : Pharmacie : Paris XI : 2000 ; 664

41) POTARD G., LAUGEL C., BAILLET A., et al.
Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies
International Journal of Pharmaceutics, 1999, 189, 249-260

42) POTARD G., LAUGEL C., SCHAEFER H., et al.
The Stripping Technique : In Vitro Absorption and Penetration of Five UV Filters on Excised Fresh Human Skin
Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, 2000, 13, 336-344

43) PRUNIERAS, M.
Précis de Cosmétologie Dermatologique
Paris : Masson, 1981.-210p.

44) RAMON E., ALONSO C., CODERCH L., et al.
Liposomes as Alternative Vehicles for Sun Filter Formulations
Drug Delivery, 2005, 12, 83-88

45) ROBERT Pierre, et al.
Dermopharmacologie clinique
Sainte-Hyacinthe : Edisem, 1985.-313p.

46) SCHAEFER Thomas, REDELMEIER Thomas E.
Skin barrier : principles of percutaneous absorption
Bâles : Karger, 1996.-310p.

47) SCHREIBER S., MAHMOUD A., VUIA A., et al.
Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies
Toxicology in Vitro, 2005, 9, 813-822

48) SCHULZ J., HOHENBERG H., PFLUCKER F., et al.
Distribution of sunscreens on skin
Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54 (Suppl.1), S157-S163

49) SCOTT RC, GUY RH, HADGRAFT J
Prediction of percutaneous penetration
Londres : IBC Technical Services, 1990.-436p.

50) SOUTHWELL Diane, BARRY Brian W., WOODFORD Roger
Variations in permeability of human skin within and between specimens
International Journal of Pharmaceutics, 1984, 18, 299-309

51) TEICHMANN Alexia, HEUSCHKEL Sandra, JACOBI Ute, et al.
Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream
European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2007, xxx, xxx-xxx

52) TRAN Christian, KASRAEE Behrooz, GRAND Denise, et al.
Pharmacology of RALGA, a Mixture of Retinaldehyde and glycolic acid
Dermatology, 2005, 210 (suppl 1), 6-13

53) VAN DE SANDT J.J.M., VAN BURGSTEDEN J.A., CAGE S., et al.
In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid : a multi-centre comparison study
Regulatory toxicology and pharmacology, 2004, 39, 271-281

54) WALTERS Kenneth A., GETTINGS Stephen D., ROBERTS Michael S.
Percutaneous Absorption of Sunscreens
861-877

55) WILKINSON Simon C., MAAS Wilfred J.M., NIELSEN Jesper Bo, et al.
Interactions of skin thickness and physicochemical properties of test compounds in percutaneous penetration studies
Int. Arch. Occup. Environ. Health, 2006, 79, 405-413

56) WILLIAMS Faith M.
In vitro studies - how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption ?
Environmental Toxicology and Pharmacology, 2006, 21, 199-203

57) YOURICK Jeffrey J., KOENIG Michael L., YOURICK Debra L., et al.
Fate of chemicals in skin after dermal application : does the in vitro skin reservoir affect the estimate of systemic absorption ?
Toxicology and Applied Pharmacology, 2004, 195, 309-320

SITES INTERNET

- C.Sylvie, (consulté le 23 février 2007). *Cellulite.* www.sante-naturelle.info

- Université Laval. Thèse de Melle GAGNON Vicky, (consulté le 27 avril 2007). *Etude des intéractions entre les nerfs sensoriels et les follicules pileux dans un modèle in vitro de peau reconstruite par génie tissulaire.* http://www.theses.ulaval.ca/2005/22895/ch01.html

- Département d'anatomie et de biologie cellulaire, faculté de médecine d'Indianapolis, (consulté le 27 avril 2007). *Department of anatomy and cell biology.* http://anatomy.iupui.edu/

- Dr CABANA Thérèse, (consulté le 27 mars 2007). *Laboratoire du Dr Thérèse Cabana, département de sciences biologiques, Université de Montréal.* http://mapageweb.umontreal.ca/cabanat/

- Howard Hughes Medical Institute, (consulté le 27 avril 2007). http://www.hhmi.org/

- Dr GRAY John, (consulté les 27 et 30 avril 2007). *The world of skin care.* http://www.pg.com/science/skincare/Skin_tws_toc.htm

- BALAS Daniel, (consulté le 27 avril 2007). *Formation professionnelle, enseignement, recherches associées.*http://homepage.mac.com/danielbalas/teaching.html

- Prof ALBERT, (consulté le 27 avril 2007). *Le webzine des jeunes scientifiques.* http://www.scientic.ca/

- CHEVRIER Gérard, (consulté le 27 avril 2007). http://bio.m2osw.com/

- Centre National de la Recherche Scientifique, (consulté le 27 mars 2007).http://www.cnrs.fr

- Anonyme, (consulté le 30 avril 2007). *Skin Care Forum.* http://www.scf-online.com

- INSA de Lyon, (consulté le 20 novembre 2006). *Bibliothèque de l'INSA de Lyon.* http://docinsa.insa-lyon.fr/

- http://www.sweatup.com/ (consulté le 12 juillet 2007)

- Portail de l'Union Européenne, (consulté le 20 novembre 2006). http://ec.europa.eu/health/index_en.htm

- FURON Danie et al., (consulté le 11 novembre 2006). *26ème Congrès National de Médecine du Travail.* http://www.univ-lille2.fr/medtrav2000

- http://www.objectif-equilibre-sante.info/ (consulté le 23 février 2007)

- US Food and Drug Administration, (consulté le 16 février 2007). http://www.fda.gov

- Université de Genève, (consulté le 16 février 2007). *Cyberdocuments à l'Université de Genève.* www.unige.ch/cyberdocuments/

- Laboratoire Pierre Fabre, (consulté les 15 décembre 2006, 16 février 2007). *L'espace dermo-cosmétique des Laboratoires Pierre Fabre.*http://www.dermaweb.com

- Laboratoire L'Oréal, (consulté le 15 décembre 2006). *Invitroskin, reconstructed skin, for research and innovation.* http://www.invitroskin.com

- Laboratoire L'Oréal, (consulté le 15 décembre 2006). http://www.loreal.fr

- Laboratoire SkinEthic, (consulté le 19 juillet 2007). *World leader in tissue engineering for in vitro human skin and epithelial models.* http://www.skinethic.com

- Laboratoire Mattek, (consulté le 19 juillet 2007). http://www.mattek.com

- Anonyme, (consulté le 19 juillet 2007). *The Biotech/Life Sciences Portal Baden-Württemberg.* http://www.bio-pro.de/en/

- Laboratoire L'Oréal, (consulté le 30 avril 2007).http://www.skin-science.fr

- Laboratoire Galénic, (consulté le 15 décembre 2006). http://www.elancyl.fr

N° d'identification :

TITRE

**PENETRATION TRANSCUTANEE DES SUBSTANCES ACTIVES.
APPLICATION EN DERMOCOSMETOLOGIE.**

Thèse soutenue le 25 novembre 2008

Par Amandine GEORGEL

RESUME :

La peau, tantôt véritable barrière active de protection, tantôt utilisée comme voie de pénétration de nombreux médicaments à action systémique, tantôt organe cible de la dermatologie et cosmétologie, apparait bien comme un organe à part entière et une membrane d'échanges.
Afin d'observer le passage de molécules actives, les laboratoires réalisent au quotidien de nombreux essais de pénétration, en créant des modèles de peaux ou en utilisant de la peau humaine issue de chirurgie esthétique.
Le but de ces études et de ces nombreux essais cliniques est d'une part de prouver l'efficacité de leurs produits et d'autre part d'en assurer l'innocuité vis-à-vis des consommateurs.
L'étude histologique et physiologique de la peau permet de mieux appréhender le phénomène de pénétration transcutanée.
L'analyse des nombreuses études réalisée permet de connaître le comportement des principes actifs ou même de toute une formulation galénique par rapport à la peau.
Il s'avère donc important d'observer les proportions du passage d'un principe actif à travers la peau jusque parfois les couches cutanées les plus profonde ou la circulation sanguine.
Trois grandes familles sont ainsi étudiées : les crèmes amincissantes, les crèmes « anti-rides » et les produits de protection solaire.
Ceci permettra au pharmacien d'officine de mieux connaître ces produits et d'améliorer son conseil au quotidien.

MOTS CLES : Effet systémique, transcutanée, couche cornée, barrière, dermocosmétologie, produits amincissants, crèmes anti-rides, filtres solaires.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Mme BENOIT MORRUZZI		**Expérimentale** ☐ **Bibliographique** ☐ **Thème** ☐

Thèmes **1 – Sciences fondamentales** **2 – Hygiène/Environnement**
3 – Médicament **4 – Alimentation – Nutrition**
5 - Biologie **6 – Pratique professionnelle**