



HAL
open science

Formulation et caractérisation de particules lipidiques submicroniques encapsulant des filtres ultraviolets organiques et inorganiques

Elodie Gilbert

► **To cite this version:**

Elodie Gilbert. Formulation et caractérisation de particules lipidiques submicroniques encapsulant des filtres ultraviolets organiques et inorganiques. Pharmacie galénique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10324 . tel-01673835v1

HAL Id: tel-01673835

<https://theses.hal.science/tel-01673835v1>

Submitted on 1 Jan 2018 (v1), last revised 24 Sep 2019 (v2)

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

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

N° d'ordre : 324 - 2015

Année 2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCE ET SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Pharmacie galénique, sciences physico-chimiques appliquées au médicament

Soutenue le 16 décembre 2015

par

GILBERT Elodie

**FORMULATION ET CARACTERISATION DE PARTICULES LIPIDIQUES SUBMICRONIQUES
ENCAPSULANT DES FILTRES ULTRAVIOLETS ORGANIQUES ET INORGANIQUES**

Thèse dirigée par M. PIROT Fabrice, Professeur des universités - Praticien hospitalier

JURY

Patrick Saulnier	Professeur des universités	Rapporteur
Gilberte Marti-Mestres	Professeure des universités	Rapporteur
Vincent Faivre	Maître de conférence des universités, HDR	Examineur
Marek Haftek	Directeur de recherche CNRS, MD, HDR	Examineur
Fabrice Pirot	Professeur des universités, Praticien hospitalier	Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

J'aimerais adresser mes sincères remerciements à l'ensemble des membres du jury :

Aux **Professeurs Saulnier** et **Marti-Mestres** qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Au **Docteur Faivre** pour avoir suivi mes travaux en présidant mes comités de suivi de thèse chaque année et pour sa présence à ma soutenance. Vous m'avez été d'excellent conseil.

Au **Docteur Haftek** pour ses conseils bienveillants et son précieux soutien tout au long de ma thèse. Je vous remercie pour la confiance dont vous m'avez toujours témoigné.

Au **Professeur Pirot** pour m'avoir confié ce projet de recherche et pour avoir dirigé ce travail.

Je remercie les membres de l'entreprise Polaar avec qui ce travail a été réalisé.

M. Kurbiel et **Mme Roche** pour m'avoir accordé leur confiance en me permettant de participer à cette belle aventure. Ce travail a été très enrichissant pour moi.

Mme Le Grand qui a été d'un grand soutien la dernière année de ce projet. Je te remercie pour ta patience et tes conseils toujours avisés.

Mme De Larminat avec qui l'aventure a commencé. Je te remercie pour ta patience et ton soutien. Tu as toujours été de très bon conseil. Ce travail est aussi le tien.

Je remercie les membres de l'équipe du laboratoire de pharmacie galénique industrielle :

Le **Professeur Falson**, le **Docteur Kirilov** et **Mme Serre** qui ont de près ou de loin participé à ce travail.

Je remercie tous **les membres de l'EA4169**.

Je remercie mes co-doctorants **Laurène Roussel**, **Damien Salmon** et **Rawad Abdayem** dont le soutien a été très précieux tout au long de ce travail. Nous avons partagé nos joies, nos peines mais surtout nos fous rires ! Des liens puissants se sont tissés.

Je tiens à remercier **Valérie Berthole** et **Karine Padois** avec qui j'ai appris l'art de la formulation. Merci pour votre patience et votre écoute. J'ai beaucoup appris grâce à vous ! Karine, ce travail est aussi le tien, je te remercie pour tout.

Je remercie tous les membres de ma famille que je n'ai pas beaucoup vus ces dernières années. Cette distance n'a pas été facile à vivre. Je vous remercie pour le soutien et la confiance que vous m'avez toujours témoignée.

A ma mère, pour son soutien et sa fierté. Merci de m'avoir permis d'aller au bout de mes études. Je sais que ça n'a pas toujours été facile.

A ma sœur, qui est ma meilleure alliée. Merci pour tous ces fous rires partagés et tes conseils.

A Mathys, petit trésor, j'espère pouvoir te consacrer plus de temps à l'avenir.

A Ludovic, merci pour toutes ces discussions intéressantes qu'on a pu avoir.

A ma tante et mon cousin qui, malgré la distance, m'ont toujours soutenu.

A ma grand-mère, la meilleure des grands-mères, merci pour ton écoute et ton soutien.

A mon grand-père qui je sais est très fier de moi.

A mon père, merci pour ton soutien sans faille. Tu m'as permis d'aller au bout de ces huit années d'études. Ces dernières années n'ont pas été simples et je sais que tu savoures autant que moi ce travail. Je te le dédie...

Résumé :

Les écrans solaires sont des formulations à usage topique qui permettent de protéger la peau des effets néfastes du rayonnement ultraviolet (UV) et notamment de l'apparition des cancers cutanés. Ces formulations contiennent des filtres UV qui peuvent être organiques ou inorganiques. Certains filtres UV organiques sont connus pour pénétrer la peau et engendrer des réactions allergiques et photo-allergiques. De plus, certains d'entre eux peuvent engendrer des effets toxiques sur les cellules vivantes de la peau et atteindre la circulation systémique. Certains filtres UV organiques exerceraient une activité œstrogénique au niveau des tissus mammaires et utérins. Les filtres UV inorganiques sont plus respectueux pour la peau mais esthétiquement moins agréables à utiliser pour les consommateurs. Ces filtres UV inorganiques sont la plupart du temps incorporés dans les écrans solaires sous forme de nanoparticules afin d'améliorer les qualités esthétiques des écrans solaires minéraux. De plus, les filtres UV inorganiques sont plus efficaces pour filtrer le rayonnement UV lorsqu'ils sont sous forme de nanoparticules. Bien qu'actuellement la plupart des études réalisées montrent que les nanoparticules ne pénètrent pas au-delà du *stratum corneum*, d'autres études complémentaires sont nécessaires. En effet, les nanoparticules utilisées comme filtres UV inorganiques exerceraient des effets toxiques sur les cellules nucléées de la peau. Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques sont des particules lipidiques submicroniques (i.e. $< 1 \mu\text{m}$) intéressantes pour formuler les actifs pharmaceutiques et cosmétiques et notamment les filtres UV. En effet, ces transporteurs lipidiques permettent de limiter la pénétration cutanée des filtres UV et donc de prévenir les effets toxiques dont ils peuvent être à l'origine. Ces nanostructures lipidiques permettent également de diminuer les concentrations en filtres UV utilisées tout en améliorant le pouvoir photo-protecteur de la formulation. L'objectif de ce travail réalisé en partenariat avec l'entreprise Polaar SAS était de développer des suspensions de nanoparticules lipidiques pour formuler des filtres UV inorganiques et organiques en les maintenant à la surface de la peau tout en augmentant leur efficacité photo-protectrice. Ces travaux ont permis de développer des suspensions de nanoparticules lipidiques encapsulant des filtres UV inorganiques dont les propriétés physico-chimiques restent stables dans le temps. Cette étude a également mis en évidence l'intérêt de ces suspensions de nanoparticules lipidiques pour encapsuler un filtre UV organique et limiter sa perméation percutanée tout en augmentant son efficacité filtrante dans le domaine UV. Des émulsions solaires ont été développées à partir des suspensions de nanoparticules lipidiques encapsulant des filtres UV inorganiques. Les émulsions solaires développées montrent de hauts indices de photo-protection solaire avec une plus faible concentration en filtres UV que celle qui est habituellement utilisée. Les modes opératoires de formulation des suspensions de nanoparticules lipidiques et des émulsions solaires les intégrant ont pu être reproduits à l'échelle industrielle afin de pouvoir commercialiser les émulsions solaires développées.

Summary:

Sunscreens are topical formulations that protect the skin against damages induced by ultraviolet (UV) radiations and notably skin cancers formation. Those formulations contain UV filters that can be organic or inorganic. Some organic UV filters are known to penetrate the skin and trigger allergic and photo-allergic cutaneous reactions. Moreover, some of them are responsible for toxic effects on skin nucleated cells and could reach systemic circulation. Some organic UV filters could exercise estrogenic activities on breast and uterus tissues. Inorganic UV filters are more respectful for the skin but aesthetically less pleasant to use for consumers. Nanoparticles of inorganic UV filters are often incorporated into sunscreens to improve their aesthetic qualities. Moreover, inorganic UV filters are more efficient to filter UV radiations when they are under their nanoparticulate form. Although for the time most of studies show that nanoparticles could only penetrate skin *stratum corneum*, others complementary studies are needed. Indeed, nanoparticles used as inorganic UV filters could exercise toxic effects on skin nucleated cells. Lipid nanoparticles and nanocapsules are submicronic lipid particles (i.e. $< 1 \mu\text{m}$) interesting to formulate pharmaceutical and cosmetic active compounds and notably UV filters. Actually, those structures permit to avoid UV filter skin penetration and thus to prevent toxic effects that they could give rise. These lipid structures also permit to decrease UV filter concentrations that are incorporated into sunscreens while increasing their photo-protection efficiency. The aim of this work carried out in partnership with Polaar SAS was to develop lipid nanoparticles to entrap organic and inorganic UV filters maintaining them at skin surface while increasing their photo-protection efficiency. This study permitted to develop lipid nanoparticle suspensions entrapping inorganic UV filters with steady physico-chemical properties over the time. This work also highlighted the interest of these lipid nanoparticle suspensions to entrap an organic UV filter avoiding its percutaneous permeation while enhancing its photo-protection efficiency. Sunscreen emulsions containing inorganic UV filter loaded lipid nanoparticles were developed. These sunscreen emulsions showed high sun protection factors with lower UV filter concentrations than those usually used. Pilot batches of lipid nanoparticle suspensions and of a sunscreen emulsion were made with the purpose of commercializing sunscreen formulations that were developed.

Sommaire

Introduction générale:.....	30
Photo-protection cutanée	30
Chapitre I:.....	38
Les écrans solaires : définition, formulation et évaluation de leur efficacité photo-protectrice	38
A- Composition et mode d'action des écrans solaires:	40
1- Mécanismes d'action des filtres UV après application cutanée:	40
2- Composés adjuvants des écrans solaires:.....	42
B- Formulation des écrans solaires:	43
1- Formulation classique des filtres UV:	43
2- Application topique des écrans solaires:	45
C- Evaluation de l'efficacité des écrans solaires:	46
1- Généralités:.....	46
2- Méthodes d'évaluation <i>in vivo</i> de l'efficacité des écrans solaires:	47
3- Méthodes d'évaluation <i>in vitro</i> de l'efficacité des écrans solaires:	48
4- Classification des écrans solaires selon leur FPS:	52
5- Choix de l'indice de protection solaire approprié:	53
D- Conclusion:	56
Chapitre II:.....	58
Règlementation, usage et toxicité des filtres UV	58
A- Toxicité des filtres UV pour l'Homme:.....	60
1- Toxicité cutanée:	60
a) <i>Les filtres UV organiques</i> :.....	60
b) <i>Les filtres UV inorganiques</i> :.....	63
2- Toxicité sur les organes périphériques:	64
B- Impact des filtres UV sur l'environnement:.....	66
1- Filtres UV organiques:.....	66
2- Filtres UV inorganiques:.....	67
C- Législation des écrans solaires à travers le monde:	67
1- Classification des écrans solaires:	67
2- Législation des filtres UV:.....	67
D- Conclusion:	68
Chapitre III:.....	88

Encapsulation de filtres UV inorganiques dans des particules et des capsules lipidiques submicroniques	88
A- Introduction:	90
1- Définition et intérêt des particules et capsules lipidiques submicroniques en cosmétologie et en pharmacie pour application topique:	90
2- Intérêt de l'encapsulation des filtres UV inorganiques:	93
3- Formulation de suspensions de NLC et de NPLC pour encapsuler des filtres UV inorganiques:	93
B- Etude de l'encapsulation de filtres UV inorganiques dans des particules et des capsules lipidiques submicroniques pour formuler un écran solaire:	94
1- Matériels et méthodes:	94
a) <i>Matériels:</i>	94
b) <i>Formulation des suspensions de NLC et de NPLC ainsi que des émulsions solaires:</i>	95
c) <i>Analyse de la granulométrie et du potentiel Zeta des NLC et des NPLC:</i>	96
d) <i>Evaluation du FPS, du FPUVA et de la λ_c des formulations étudiées:</i>	105
e) <i>Etude de la stabilité des suspensions de nanoparticules lipidiques:</i>	106
f) <i>Evaluation du facteur de protection solaire in vivo des formulations:</i>	106
g) <i>Comparaison de l'effet blanc à l'étalement d'une émulsion solaire formulée avec des suspensions de NPLC par rapport à trois écrans solaires minéraux commercialisés:</i>	106
h) <i>Analyse statistique des résultats:</i>	107
2- Résultats et discussion:	107
C- Conclusion :	124
Chapitre IV:	168
Formulation d'un filtre UV chimique, la benzophénone-3, dans des particules lipidiques submicroniques	168
A- Introduction :	170
A- Etude comparative de la perméation cutanée de la BP-3 formulée dans des nanoparticules et des nanocapsules lipidiques:	171
1- Matériels et méthodes:	171
a) <i>Formulation des suspensions de nanoparticules et nanocapsules lipidiques contenant de la BP-3:</i>	171
b) <i>Analyse de la granulométrie et du potentiel Zeta des NLC et des NPLC:</i>	172
c) <i>Etude des fractions de benzophénone-3 libres et encapsulées dans les différentes suspensions de nanoparticules et nanocapsules lipidiques:</i>	176
d) <i>Etude de l'absorption percutanée de la BP-3 à travers la peau porcine:</i>	177
e) <i>Dosage de la BP-3 par chromatographie liquide haute performance (CLHP):</i>	179

f) Evaluation du FPS, du FPUVA et de la λ_c des différentes formulations étudiées:	180
g) Analyse statistique des résultats:	181
2- Résultats et discussion:.....	181
B- Conclusion :.....	193
Discussion générale	194
Conclusion générale	200
Références bibliographiques	204
Annexe 1:	224
Measurement, analysis and prediction of topical UV filter bioavailability	224
Annexe 2:	234
New easy handling and sampling device for bioavailability screening of topical formulations	234
Annexe 3:	244
Antimicrobial nanocapsules: from new solvent-free process to in vitro efficiency	244
Annexe 4:	254
Development of a simple HPLC method using core-shell particles column for quantification of IR3535 in insect repellent liquid formulations	254

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Les différents effets bénéfiques et délétères des rayonnements UVB et UVA sur la peau.....	37
Tableau 2 : Classification des phototypes cutanés selon Fitzpatrick.....	56
Tableau 3 : Correspondance entre la valeur de l'angle ITA° mesurée et le phototype cutané.....	57
Tableau 4 : Liste des filtres UV listés dans le monde avec leur numéro CAS, leur formule chimique, leur poids moléculaire, leur log ($K_{Oct/Eau}$) et leur domaine d'absorption UV.....	72
Tableau 5 : Concentrations maximales autorisées des filtres UV listés en Europe, en Chine, aux Etats-Unis, en Australie, au Canada et au Japon.....	76
Tableau 6 : Valeur du log ($K_{Oct/Eau}$) des principaux constituants des espaces inter-cellulaires du SC.....	64
Tableau 7 : Nom INCI et rôle des différents composés utilisés pour formuler les suspensions et les émulsions utilisées dans cette étude.....	100
Tableau 8 : Composition (% m / m) des suspensions de NLC et de NPLC utilisées dans cette étude.....	102
Tableau 9 : Composition (% m / m) des émulsions classiques utilisées pour l'étude comparative du pouvoir photoprotecteur en fonction de la concentration en TiO_2 des suspensions de NLC, de NPLC et des émulsions formulées avec des concentrations croissantes en TiO_2	103
Tableau 10 : Composition (% m / m) des émulsions solaires formulées avec des suspensions de NPLC.....	103
Tableau 11 : <i>Z-Ave</i> , <i>Pdl</i> et potentiel ζ des NLC et des NPLC formulés avec différentes concentrations en TiO_2	110
Tableau 12 : Comparaison des propriétés photo-protectrices dans le domaine UV des émulsions, des suspensions de NLC et des suspensions de NPLC formulées avec des concentrations croissantes en TiO_2	111
Tableau 13 : Composition et propriétés physiques des suspensions de nanocapsules utilisées pour formuler les émulsions solaires.....	119
Tableau 14 : Propriétés photo-protectrices dans le domaine UV des suspensions de NPLC utilisées pour formuler les émulsions solaires. Les suspensions sont classées dans deux catégories : suspensions de NPLC formulées avec du TiO_2 et suspensions de NPLC formulées avec du TiO_2 et du CeO_2	120
Tableau 15 : Composition et propriétés photo-protectrices des émulsions solaires formulées à partir des suspensions de NPLC.....	124

Tableau 16 : Propriétés physico-chimiques et données toxicologiques publiées de la BP-3.....	173
Tableau 17 : Composition des suspensions de SLN, NLC, NPLC et NC contenant de la BP-3 (% m/m).....	175
Tableau 18 : Conditions chromatographiques pour la détermination des concentrations en BP-3 dans le milieu receveur, dans le <i>stratum corneum</i> (SC), dans l'épiderme (E) et le derme (D).....	182
Tableau 19 : <i>Z-Ave</i> , <i>Pdl</i> et potentiel ζ des suspensions de SLN, NLC, NPLC et NC.....	184
Tableau 20 : Efficacité d'encapsulation des SLN, NLC, NPLC et NC.....	186
Tableau 21: Paramètres d'absorption de la BP-3 à travers la peau porcine 24 h suivant l'application cutanée de quatre formulations en contenant.....	192
Tableau 22 : Modélisation de l'encapsulation des nanoparticules de TiO ₂ dans les NPLC de la suspension #11.....	200

Liste des figures :

Figure 1 : Représentation schématique des différents types de rayonnement ultraviolet provenant du soleil et atteignant la Terre.....	34
Figure 2 : Représentation schématique de la pénétration des rayonnements UVB et UVA dans la peau.....	35
Figure 3 : Représentation schématique des différents chromophores cellulaires cutanés ainsi que de leur domaine d'absorption dans l'ultraviolet.....	36
Figure 4 : Mécanisme d'action des filtres UV inorganiques et organiques sur la peau.....	42
Figure 5 : Comparaison de l'effet blanc à l'étalement de dispersions lipidiques contenant des particules de TiO ₂ de différentes tailles lorsqu'elles sont appliquées sur la peau d'un individu de phototype I et d'un autre de phototype V.....	43
Figure 6 : Spectres de transmittance lumineuse de différentes dispersions lipidiques de TiO ₂ contenant différentes tailles de particules.....	44
Figure 7 : Représentation schématique de la répartition optimale d'un écran solaire sur la peau.....	45
Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation d'une émulsion huile dans eau et d'une émulsion eau dans huile.....	46
Figure 9 : Spectres d'absorption dans le domaine UV de quatre formulations d'écrans solaires de FPS 40 présentant différentes longueurs d'ondes critiques.....	49
Figure 10 : Méthode d'évaluation in vivo du FPS. Exemple de détermination in vivo de l'efficacité d'un écran solaire dont le FPS est de 31.....	52
Figure 11 : Méthode d'évaluation in vivo du FPUVA. Exemple de détermination in vivo de l'efficacité d'un écran solaire dont le FPUVA est de 13.....	53
Figure 12 : Classement des écrans solaires en fonction du pourcentage de rayonnement UVB filtré et du degré de photo-protection cutanée qu'ils procurent : Faible, Moyenne, Haute et Très haute.....	54
Figure 13 : Classement des écrans solaires en fonction du pourcentage de rayonnement UVB atteignant la peau et du degré de photo-protection cutanée qu'ils procurent : Faible, Moyenne, Haute et Très haute.....	55
Figure 14 : Indice de rayonnement UV universel dans le monde.....	57
Figure 15 : Correspondance des indices de rayonnement UV universels définis par l'OMS.....	58
Figure 16 : Représentation schématique d'une nanosphère lipidique solide en suspension dans une phase dispersante aqueuse chargée en molécules (a). Illustration du phénomène d'expulsion des molécules de la matrice lipidique de la SLN au cours du remaniement du réseau lipidique cristallin de sa matrice (b).....	93
Figure 17 : Représentation schématique d'un NLC dont la matrice constituée d'un mélange de lipides solides et liquides permet au principe actif de venir s'enchâsser dans les nombreuses imperfections.....	94

Figure 18 : Représentation schématique d'une SLN, d'un NLC, d'un NPLC et d'une NC.....	94
Figure 19 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de NPLC.....	104
Figure 20 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de NLC).....	105
Figure 21 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des émulsions solaires intégrant des nanoparticules lipidiques dans leur composition.....	106
Figure 22 : Evolution du FPS en fonction de la concentration en TiO ₂ formulée dans une émulsion, une suspension de NLC et une suspension de NPLC.....	114
Figure 23 : Evolution du FPS en conditions de vieillissement accéléré d'une émulsion formulée avec différentes concentrations en nanoparticules de TiO ₂	114
Figure 24 : Evolution du FPS en conditions de vieillissement accéléré d'une suspension de NLC formulée avec différentes concentrations en nanoparticules de TiO ₂	115
Figure 25 : Evolution du FPS en conditions de vieillissement accéléré d'une suspension de NPLC formulée avec différentes concentrations en nanoparticules de TiO ₂	115
Figure 26 : Comparaison des FPS évalués <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des suspensions de NLC et de NPLC formulées avec 12,3 % de TiO ₂ (Suspensions #8).....	116
Figure 27 : Suivi du Z _{Ave} des suspensions de NPLC #9 et #10 pendant 18 mois à température ambiante.....	121
Figure 28 : Suivi du potentiel ζ des suspensions de NPLC #9 et #10 pendant 18 mois à température ambiante.....	122
Figure 29 : Suivi du FPS des suspensions de NPLC #9 et #10 pendant dix-huits mois à température ambiante.....	122
Figure 30 : Spectre d'absorption dans le domaine UV de l'huile de Karanja.....	124
Figure 31 : Comparaison des FPS évalués <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'émulsion solaire #9.....	125
Figure 32 : Comparaison de l'effet blanc sur la peau après étalement de trois écrans solaires ne contenant que des filtres UV inorganiques et affichant un FPS de 50 avec une suspension de nanoparticules lipidiques formulée avec du TiO ₂ et montrant un FPS 50.....	126
Figure 33 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de SLN, NLC et NPLC.....	176
Figure 34 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de NC.....	177
Figure 35 : Représentation schématique d'un SLN d'un NLC, d'un NPLC et d'une NC.....	178
Figure 36 : Représentation schématique du processus de gélification du Poloxamer 188.....	185
Figure 37 : Evolution du flux de benzophénone-3 à travers la peau porcine en fonction de son véhicule.....	187

Figure 38 : Distribution de la BP-3 dans le <i>stratum corneum</i> (SC), l'épiderme (E), le derme (D) et le compartiment receveur (fluide receveur).....	190
Figure 39 : Coefficient de partage de la BP-3 entre le <i>stratum corneum</i> (SC) et les formulations (a) et entre l'épiderme (E) et le SC (b).....	191
Figure 40 : Spectres d'absorption dans le domaine UV, facteur de protection UVA (FPUVA), longueur d'onde critique (λ_c), (a) et facteur de protection solaire (FPS) (b) des suspensions de SLN, NLC, NPLC et NC.....	193
Figure 41 : Classement des formulations étudiées en fonction de leur coefficient de perméabilité et de leur FPS.....	194
Figure 42 : Représentation schématique des agrégats de nanoparticules de TiO ₂ dispersés dans une matrice lipidique exempte de PCL (a) et des nanoparticules de TiO ₂ dispersées dans une matrice lipidique entourée de PCL (b).....	199

Liste des abréviations :

UV = Ultraviolet

UVAII = UVA à ondes courtes

UVAI = UVA à ondes longues

SC = *Stratum corneum*

SL = *Stratum lucidum*

SG = *Stratum granulosum*

DRO = Dérivé réactif de l'oxygène

INPES = Institut national de prévention et d'éducation

TiO₂ = Dioxyde de titane

ZnO = Oxyde de zinc

CeO₂ = dioxyde de cérium

FPS = Facteur de protection solaire

H/E = Huile dans eau

E/H = Eau dans huile

HLB = Balance hydrophile lipophile (de l'anglais Hydrophilic lipophilic balance)

HLB_r = Balance hydrophile lipophile requise (de l'anglais required hydrophilic lipophilic balance)

FPUVA = Facteur de protection UVA

λ_c = longueur d'onde critique

IPS = Indice de protection solaire

UE = Union européenne

DEM = Dose érythémateuse minimale

PPD = Pigmentation cutanée persistante (de l'anglais persistent pigment darkening)

PMAM = Polyméthacrylate de méthyle

ITA° = Angle typologique individuel (de l'anglais individual typology angle)

OMS = Organisation mondiale de la santé

PABA = Acide para-aminobenzoïque (de l'anglais para-aminobenzoic acid)

BP-3 = Benzophénone 3

BP-4 = Benzophénone 4

OMC = Octyl méthoxycinnamate

K_{Oct/Eau} = Coefficient de partage Octanol/Eau

3-MBC = 3-Méthyl benzilidène camphre

4-MBC = 4-Méthyl benzilidène camphre

BP-1 = Benzophénone 1
BP-2 = Benzophénone 2
CIRC = Centre international de recherche sur le cancer
INRS = Institut national de recherche et de sécurité
BP-8 = Benzophénone 8
CSPC = Comité pour la sécurité du consommateur
OCDE = Organisation de coopération et de développement économique
ANSM = Agence nationale de sécurité du médicament
FDA = Food and drug administration
SLN = Nanoparticule lipidique solide (de l'anglais solid lipid nanoparticle)
NLC = Transporteur lipidique nanostructuré (de l'anglais nanostructured lipid carrier)
PA = Principe actif
NC = Nanocapsule
NPLC = Transporteur lipidique polymérique nanostructuré (de l'anglais nanostructured polymeric lipid carrier)
PCL = Poly-ε-caprolactone
Al₂O₃ = Oxyde d'aluminium
Tr/min = Tour par minute
rpm = rotation par minute
Z-Ave = Diamètre hydrodynamique moyen
Pdl = Indice de polydispersité
Potentiel ζ = Potentiel zeta
DDL = Diffusion dynamique de la lumière
EDL = Electrophorèse laser Doppler
PBS = Tampon phosphate salin (de l'anglais phosphate buffered saline solution)
PVDF = Poly(fluorure de vinylidène) (de l'anglais PolyVinylidene Fluoride)
PIE = Perte insensible en eau
CLHP = Chromatographie liquide haute performance
LDD = Limite de détection
LDQ = Limite de quantification
OPP = Oxyde de polypropylène
OPE = Oxyde de polyéthylène
MET = Microscopie électronique à transmission
MEB = Microscopie électronique à balayage

Introduction générale:

Photo-protection cutanée

Le spectre de la lumière provenant du soleil comprend le rayonnement infrarouge ($\approx 32\%$), la lumière visible ($\approx 63\%$) et le rayonnement ultraviolet ($\approx 5\%$). Le rayonnement ultraviolet (UV) du spectre de la lumière est divisé en trois domaines : le rayonnement UVC qui s'étend de 100 nm à 290 nm, le rayonnement UVB qui s'étend de 290 nm à 320 nm et le rayonnement UVA qui est subdivisé en rayonnement UVA à ondes courtes (UVA II) s'étendant de 320 nm à 340 nm et en rayonnement UVA à ondes longues (UVA I) s'étendant de 340 nm à 400 nm. Le rayonnement UVC est entièrement filtré par la couche d'ozone et les différentes couches atmosphériques tandis qu'une petite partie du rayonnement UVB traverse les couches atmosphériques et atteint la surface de la Terre. Le rayonnement UVA n'est quasiment pas filtré par les différentes couches atmosphériques ; une très forte proportion d'UVA atteint donc la surface terrestre (Figure 1)

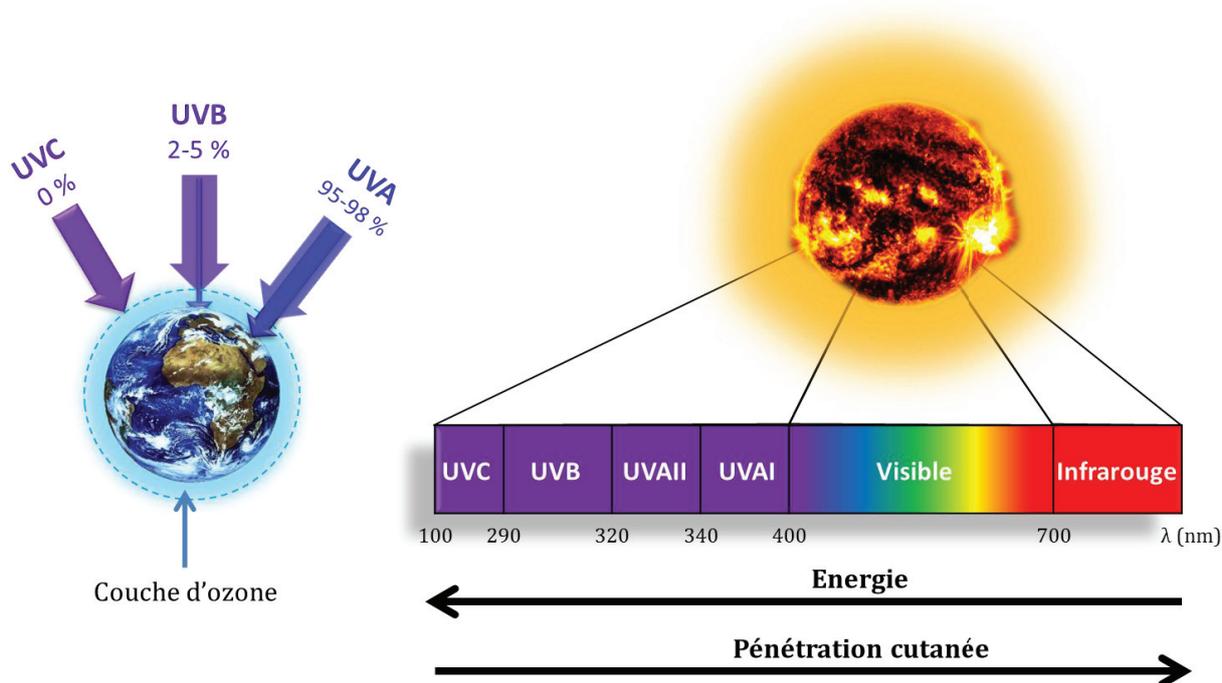


Figure 1 : Représentation schématique des différents types de rayonnement ultraviolet provenant du soleil et atteignant la Terre.

Le rayonnement atteignant la surface de la Terre comprend entre 2 et 5 % de rayonnement UVB et entre 95 et 98 % de rayonnement UVA selon les saisons et la localisation géographique. Les longueurs d'ondes les plus courtes du spectre UV sont les plus énergétiques et donc les plus agressives pour les êtres vivants. Les longueurs d'ondes les plus longues sont moins énergétiques mais elles ont tendance à pénétrer profondément les structures cutanées. Ainsi, le rayonnement UVB traverse les couches superficielles de l'épiderme (*Stratum corneum* (SC), *Stratum lucidum* (SL) et *Stratum granulosum* (SG)) pour atteindre les cellules épidermiques basales alors que le rayonnement UVA est susceptible de pénétrer dans les structures sous épidermiques et dermiques (Figure 2). Le rayonnement UVC est le plus énergétique des rayonnements UV ($1,05 \cdot 10^{-18}$ Joules) et donc le plus nocif

pour les organismes vivants suivi par le rayonnement UVB ($6,67 \cdot 10^{-19}$ Joules) et le rayonnement UVA ($5,56 \cdot 10^{-19}$ Joules).

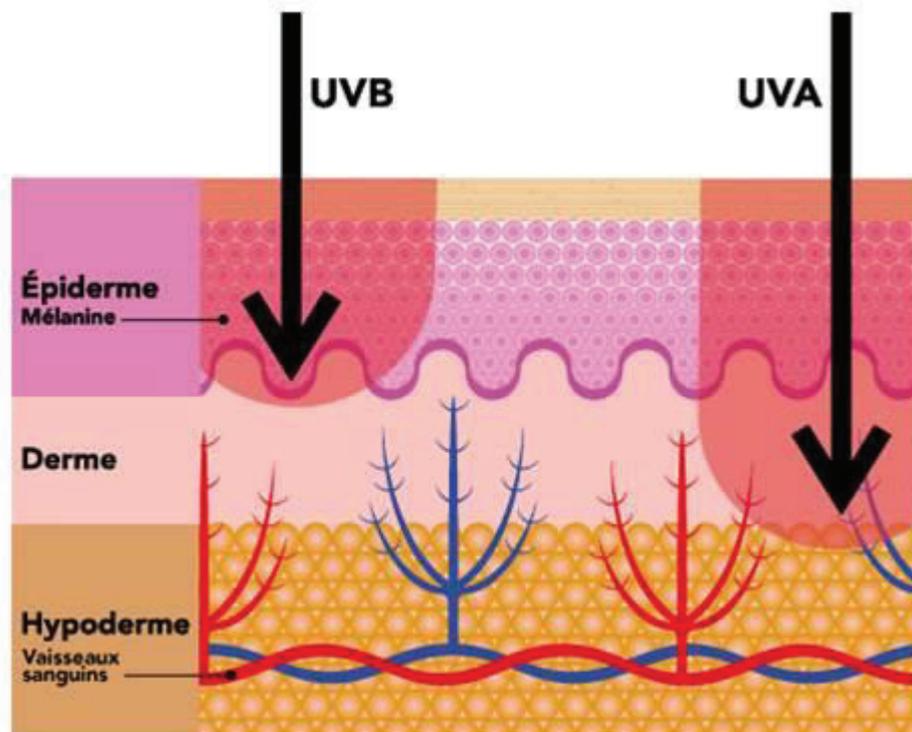


Figure 2 : Représentation schématique de la pénétration des rayonnements UVB et UVA dans la peau.

<http://sante.gouv.qc.ca/conseils-et-prevention/bronzage/>

Les UVC sont très érythématogènes si bien que s'ils venaient à ne plus être filtrés par les différentes couches atmosphériques, ils pourraient provoquer d'importantes brûlures (cutanées et oculaires) et également favoriser l'apparition de cancers au niveau des zones photo-exposées. Le rayonnement UVB est lui aussi très érythématogène et carcinogène. Les rayonnements UVC et UVB sont directement absorbés par l'ADN cellulaire qu'ils endommagent de manière importante ce qui induit les mécanismes de carcinogenèse. Le rayonnement UVA est mille fois moins érythématogène que le rayonnement UVB. Ce rayonnement n'est pas absorbé par l'ADN mais par d'autres chromophores cellulaires qu'il excite comme les mélanines, les porphyrines, la riboflavine et le tryptophane ce qui conduit à la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) cytotoxiques. Le rayonnement UVA participe donc au mécanisme de photo-carcinogenèse en endommageant le matériel génétique des cellules mais de manière indirecte. La Figure 3 présente les différents chromophores cellulaires cutanés et leurs domaines d'absorption dans l'ultraviolet. Les rayonnements UVB et UVA désorganisent la fonction barrière de la peau en diminuant le nombre de corps d'Odland et de desmosomes dans le SC et le SG qui constituent les deux premières couches cellulaires de l'épiderme [1].

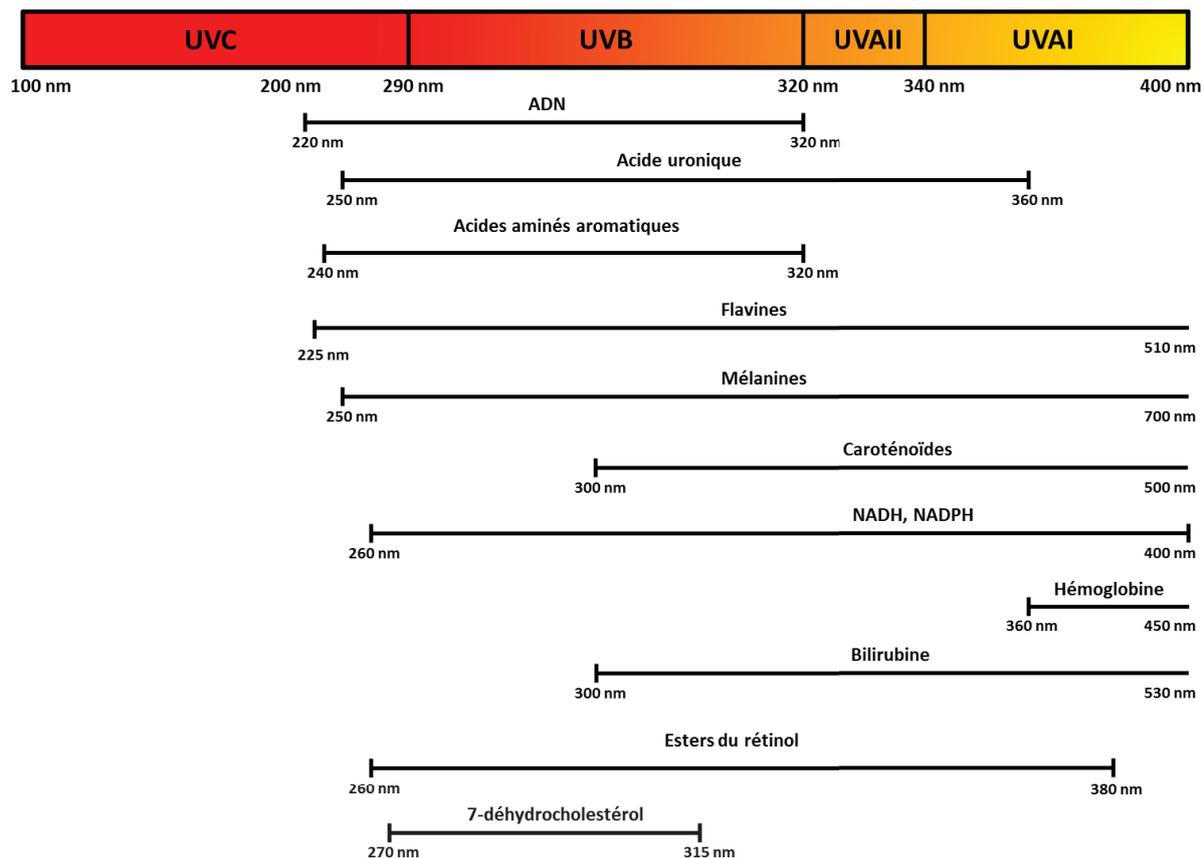


Figure 3 : Représentation schématique des différents chromophores cellulaires cutanés ainsi que de leur domaine d'absorption dans l'ultraviolet.

Le rayonnement UV exerce également des effets bénéfiques sur l'organisme. En effet, à doses bien définies, il permet de traiter certaines pathologies cutanées comme l'eczéma ou le psoriasis [2] et il initie la synthèse de la vitamine D [3]. Le rayonnement UVB induit la synthèse du cholécalférol (précurseur inactif de la vitamine D) dans les kératinocytes des couches cellulaires profondes de l'épiderme à partir du 7-déhydrocholestérol qui est un constituant des membranes plasmiques. Le cholécalférol métabolisé au niveau du foie et des reins permet la synthèse de la vitamine D. La synthèse du cholécalférol induite par le rayonnement UVB constitue la principale source de vitamine D de l'organisme. La vitamine D est indispensable à l'homéostasie minérale osseuse et elle jouerait également un rôle dans certains mécanismes du système immunitaire. Les différents effets induits par les rayonnements UVB et UVA sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Les différents effets bénéfiques et délétères des rayonnements UVB et UVA sur la peau.

Effets sur l'organisme	Rayonnement UVB	Rayonnement UVA
Bénéfiques	Traitement de certaines pathologies cutanées Synthèse du cholécalciférol	Non reportés
Protecteurs	Bronzage Épaississement de l'épiderme	Non reportés
Néfastes	Erythème actinique Immunosuppression cutanée	Oxydation des mélanines Immunosuppression cutanée Vieillessement cutané prématuré
	Carcinogénèse	
	Diminution du nombre de corps d'Odland et de desmosomes dans le SC et le SG	

Le rayonnement UVB induit deux mécanismes innés de photo-protection cutanée que sont le bronzage et l'épaississement de l'épiderme [4, 5]. En effet, le rayonnement UVB stimule la production de mélanine par les mélanocytes ainsi que son transfert vers les kératinocytes des couches épidermiques via les dendrites des mélanocytes. La mélanine est un pigment qui absorbe les rayonnements UVB et UVA et qui protège donc le matériel génétique des cellules contre les dommages photo-induits. Le rayonnement UVB stimule également la prolifération des cellules de la couche basale de l'épiderme ce qui contribue à épaissir le SC, véritable barrière protectrice, et donc à réduire la pénétration du rayonnement ultraviolet dans la peau. Le rayonnement UVA est à l'origine d'une pigmentation cutanée immédiate due à l'oxydation de la mélanine et de ses précurseurs (phénomène de Meirowski) [6, 7]. Cette pigmentation n'apporte pas de photo-protection à la peau. Elle apparaît dans les quinze minutes suivant l'exposition au rayonnement UV et disparaît dans les deux heures suivant l'arrêt de l'exposition. Ce phénomène ne concerne que les peaux naturellement riches en mélanine et donc les peaux naturellement hâlés.

Les différentes couleurs de peau font que tous les individus ne présentent pas la même sensibilité aux dommages cutanés photo-induits. Les différentes nuances cutanées sont dues à un pigment : la mélanine. Il existe deux types de mélanines : l'eumélanine et la phéomélanine. Ce sont les proportions en eumélanine et en phéomélanine qui déterminent la coloration cutanée. L'eumélanine est un pigment allant du brun au noir, prédominant chez les peaux foncées, qui absorbe le rayonnement UV incident ce qui permet de protéger le matériel génétique cellulaire des dommages photo-induits. La phéomélanine est un pigment s'étendant du jaune au rouge, qui prédomine chez les peaux claires, et qui n'absorbe pas le rayonnement UV ne conférant donc aucune photo-protection [8, 9].

Face aux effets délétères induits par le rayonnement UV sur la peau, l'institut national de prévention et d'éducation pour la santé (INPES) recommande aux individus de se protéger de ce rayonnement [10]. La première recommandation est l'éviction solaire plus particulièrement aux heures durant lesquelles l'incidence du rayonnement UV sur la Terre est la plus forte (En France, entre 12h et 16h). Le port de vêtements à tissage serré comme le coton permet de limiter la pénétration du rayonnement UV dans la peau. L'utilisation de produits de protection solaire (écrans solaires) est également un bon moyen de protéger la peau des effets délétères du rayonnement UV. Les produits de protection solaire sont des formulations qui contiennent des filtres UV qui vont agir en limitant la pénétration du rayonnement ultraviolet dans la peau. Ces formulations sont particulièrement complexes à développer notamment à cause de la nature des filtres UV.

Ce travail est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre porte sur la formulation des écrans solaires ainsi que sur l'évaluation de leur efficacité. L'efficacité des écrans solaires repose sur les filtres UV qu'ils contiennent. Certains d'entre eux présenteraient des effets toxiques pour l'organisme ainsi que pour l'environnement. Le chapitre 2 aborde la toxicité des filtres UV incorporés dans les écrans solaires ainsi que la législation des produits de protection solaire à travers le monde. Face aux nombreuses données publiées concernant le potentiel toxique de certains filtres UV, la recherche de nouveaux véhicules pour formuler les filtres UV permettant de prévenir leur perméation percutanée s'est avérée nécessaire. Le troisième chapitre de ce travail concerne le développement de particules lipidiques submicroniques encapsulant un filtre UV inorganique en augmentant son pouvoir photo-protecteur dans le domaine UV. Le quatrième et dernier chapitre de ce travail vise à comparer l'efficacité de quatre types de particules lipidiques submicroniques à maintenir un filtre UV organique à la surface de la peau tout en améliorant son efficacité photo-protectrice.

L'objectif principal de ce travail était de développer des suspensions de particules lipidiques submicroniques pour formuler des filtres UV inorganiques et organiques en limitant leur éventuelle perméation percutanée tout en augmentant leur efficacité photo-protectrice. Ces travaux ont permis de développer des suspensions de particules lipidiques submicroniques encapsulant des filtres UV inorganiques dont les propriétés physico-chimiques restent stables dans le temps. Cette étude a également mis en évidence l'intérêt de ces suspensions de particules lipidiques submicroniques pour encapsuler un filtre UV organique et limiter sa perméation percutanée tout en augmentant son efficacité filtrante dans le domaine UV.

L'objectif spécifique de ce travail était de développer des émulsions solaires à partir de suspensions de particules lipidiques submicroniques encapsulant des filtres UV inorganiques. Les émulsions solaires développées devaient montrer de hauts indices de photo-protection solaire avec la concentration la plus faible possible en filtres UV inorganiques. Les modes opératoires de formulation des suspensions de particules lipidiques submicroniques et des émulsions solaires les intégrant devaient être reproductibles à l'échelle industrielle de manière à pouvoir commercialiser les émulsions solaires développées.

Chapitre I:

Les écrans solaires : définition, formulation et évaluation de leur efficacité photo-protectrice

A- Composition et mode d'action des écrans solaires:

1- Mécanismes d'action des filtres UV après application cutanée:

Deux types de filtres UV peuvent être incorporés dans les écrans solaires : les filtres UV organiques (ou chimiques) et les filtres UV inorganiques (ou minéraux). Les filtres UV organiques sont des molécules comprenant un ou plusieurs cycles aromatiques qui absorbent le rayonnement UV en passant sous un état excité avant de dissiper l'énergie absorbée sous forme de chaleur pour revenir à leur état de base. Les propriétés physico-chimiques des filtres UV organiques leur permettent de pénétrer au niveau des couches cutanées superficielles (espaces inter-cellulaires du SC). Les filtres UV inorganiques sont des particules qui agissent physiquement, comme des miroirs, en reflétant et en diffusant le rayonnement UV incident. Ils peuvent également en absorber une petite partie [11]. Ces particules vont agir à la surface de la peau, leurs propriétés physico-chimiques ne leur permettant pas de pénétrer les couches cutanées. (Figure 4).

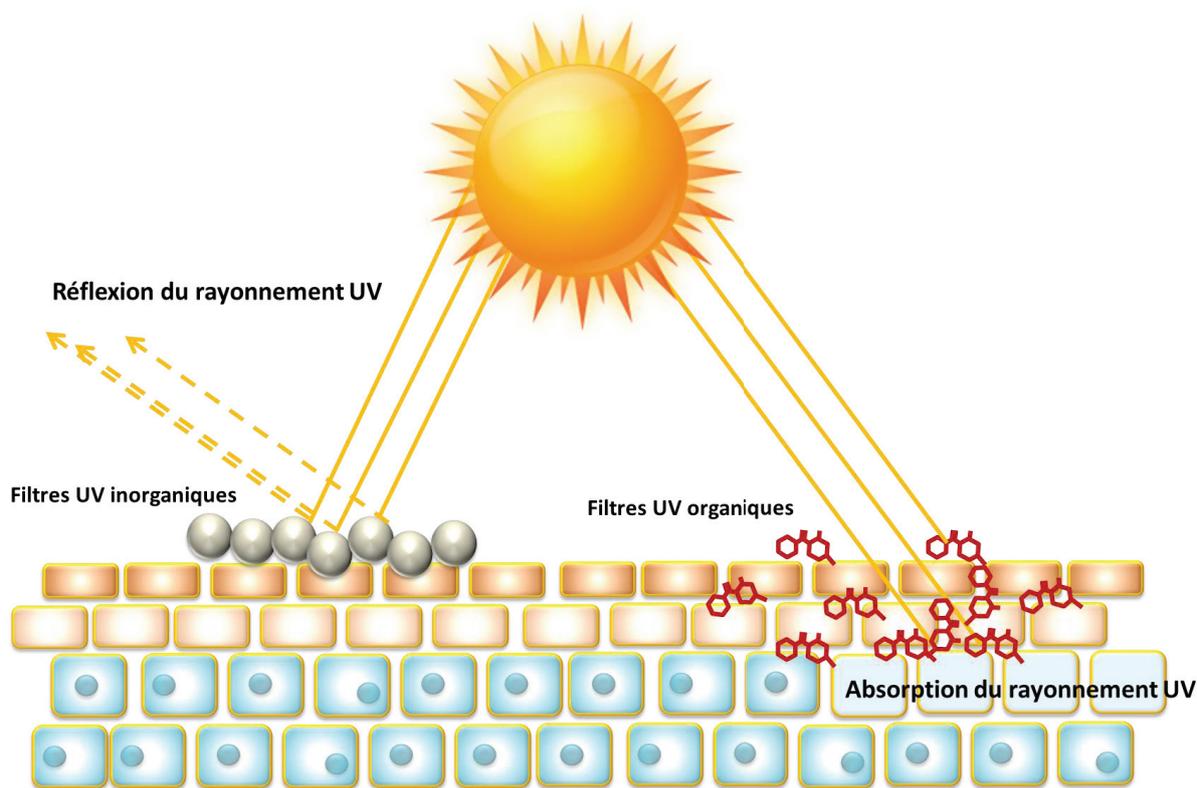


Figure 4 : Mécanisme d'action des filtres UV inorganiques et organiques sur la peau.

Les filtres UV inorganiques se présentent sous la forme de pigments ou de micro-pigments minéraux d'origine naturelle ou synthétique. Ces filtres UV ne pénètrent pas la peau [12]. Ils sont donc considérés comme hypoallergéniques et plus respectueux pour la peau que les filtres UV organiques. Ce sont les filtres UV les plus efficaces, puisqu'ils reflètent à la fois les domaines UVB et UVA. Cependant, les filtres UV inorganiques sont les plus difficiles à

formuler car ils ont tendance à donner des formulations pâteuses, difficiles à étaler et laissant des résidus blancs à l'issue de l'application [13]. Seuls deux types de filtres UV inorganiques sont listés en tant que tels à travers le monde: le dioxyde de titane (TiO_2) et l'oxyde de zinc (ZnO). Cependant, il existe d'autres minéraux aux propriétés anti-UV intéressantes comme le dioxyde de cérium (CeO_2), l'hydroxyapatite et les kaolins [14]. Les particules de TiO_2 et de ZnO sont préalablement enrobées par un matériau inerte qui peut être soit inorganique (e.g. oxyde d'aluminium, silice, zircone) soit organique (e.g. silicones, diméthicones, silanes) afin d'inhiber leur potentiel photo-catalytique et faciliter leur formulation dans les écrans solaires [15, 16]. Ces particules minérales réfléchissent non seulement le rayonnement UV mais aussi le spectre visible de la lumière à l'origine de la couleur blanche prononcée sur la peau après étalement de l'écran solaire. La taille des particules minérales influence leur spectre de réflexion de la lumière. Les particules de plus de 100 nm réfléchissent la lumière de façon homogène dans les domaines visible et invisible et apparaissent donc très blanches sur la peau (Figure 5) tandis que les particules dont la taille est inférieure à 100 nm réfléchissent plus efficacement la lumière UVB mais beaucoup moins dans le domaine UVA et celui du visible [17].

Ainsi, pour formuler un écran solaire minéral à large spectre d'efficacité avec un effet blanc limité à l'étalement, plusieurs tailles de particules minérales doivent être incorporées afin d'assurer une photoprotection à la fois dans les domaines UVB et UVA (Figure 6).

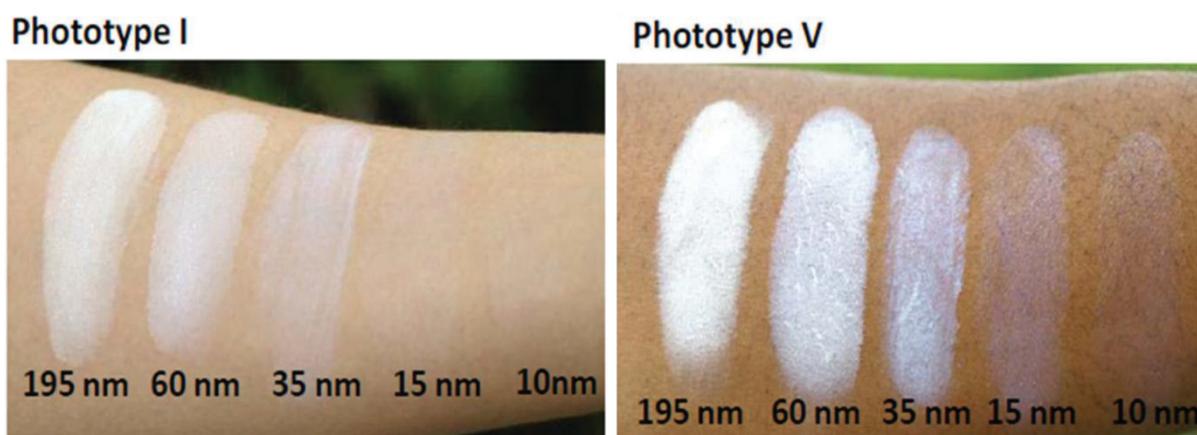


Figure 5 : Comparaison de l'effet blanc à l'étalement de dispersions lipidiques contenant des particules de TiO_2 de différentes tailles lorsqu'elles sont appliquées sur la peau d'un individu de phototype I et d'un autre de phototype V.

<http://www.koboproductsinc.com>

Les filtres UV organiques sont plus faciles à formuler que les filtres UV inorganiques. Ce type de filtres UV permet de formuler des écrans solaires faciles à étaler et agréables à utiliser puisqu'ils apparaissent invisibles à l'étalement. Actuellement, peu de filtres UV organiques (comme le groupe des benzophénones) sont capables d'absorber à la fois dans les domaines UVB et UVA. De plus, à concentrations égales, les filtres UV organiques sont moins efficaces que les filtres UV inorganiques. Afin d'atteindre une photo-protection large spectre, il faut

donc mélanger plusieurs filtres UV organiques. Les filtres UV organiques doivent être associés à un filtre UV inorganique pour formuler des écrans solaires à haut et très haut facteur de protection solaire (FPS) c'est-à-dire dont la valeur du FPS est supérieure à 30 [18]. Les données publiées concernant leur potentiel toxique font que ces molécules doivent être formulées avec une attention particulière afin de ne pas favoriser leur perméation percutanée ainsi que leur dégradation.

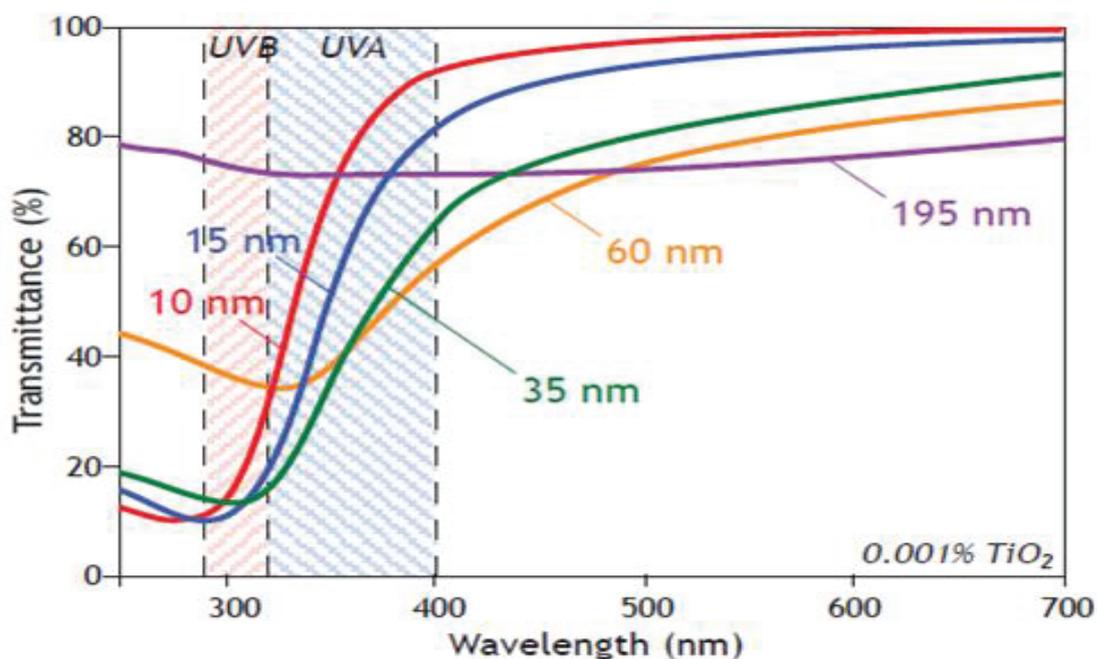


Figure 6 : Spectres de transmittance lumineuse de différentes dispersions lipidiques de TiO₂ contenant différentes tailles de particules.
<http://www.koboproductsinc.com>

2- Composés adjuvants des écrans solaires:

Le choix des composés incorporés dans les écrans solaires est particulièrement important puisqu'ils peuvent influencer la pénétration cutanée des filtres UV et donc leur efficacité photo-protectrice [19]. Les filtres UV doivent rester localisés au niveau des couches cutanées les plus superficielles afin qu'ils puissent exercer leur rôle photo-protecteur de manière optimale. La présence de promoteurs de la pénétration cutanée comme les acides oléique et linoléique, le myristate d'isopropyle ou le palmitate d'isopropyle, peut favoriser la pénétration des filtres UV dans la peau en agissant sur les lipides du SC ce qui diminue leur efficacité photo-protectrice et peut entraîner des effets indésirables.

Les agents occlusifs agissent également en favorisant la pénétration cutanée des molécules en augmentant l'hydratation des couches cutanées [20]. En revanche, l'incorporation de certains agents texturants et d'antioxydants dans ces formulations constitue un avantage non négligeable. En effet, les agents texturants, comme certains polymères, permettent de faciliter l'étalement de la formulation sur la peau tout en permettant la formation d'un film

de formulation homogène. Les filtres UV doivent être dispersés de manière homogène dans la formulation afin, qu'à l'étalement, il ne persiste aucune zone cutanée photo-exposée non protégée (Figure 7). Les agents antioxydants ont une action anti-radicalaire et génoprotectrice [21, 22]. L'alpha tocopherol, le bêta-carotène et l'acide ascorbique sont couramment incorporés dans les écrans solaires pour leur rôle adjuvant photo-protecteur.

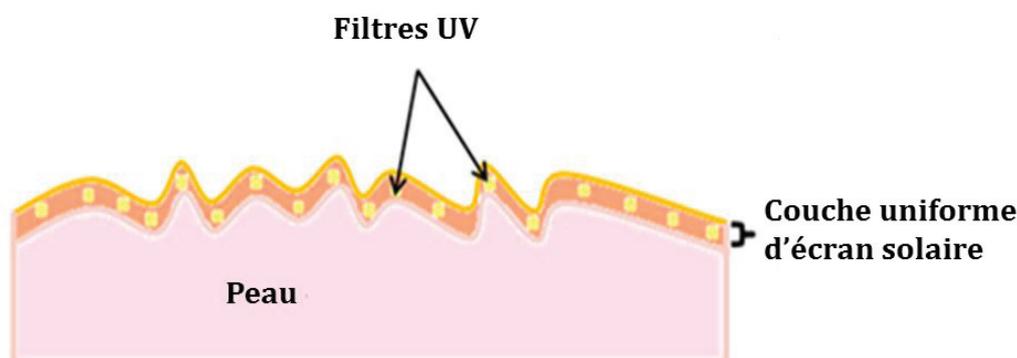


Figure 7 : Représentation schématique de la répartition optimale d'un écran solaire sur la peau.

B- Formulation des écrans solaires:

1- Formulation classique des filtres UV:

La majorité des écrans solaires comprend un mélange de filtres UV organiques et inorganiques afin d'assurer une photo-protection cutanée efficace dans tout le domaine UV tout en conférant à la formulation des propriétés sensorielles agréables. La forme galénique la plus classique des écrans solaires est l'émulsion. Une émulsion est un système comprenant trois phases : une phase lipidique, une phase aqueuse et un ou plusieurs agents tensioactif(s). Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles comprenant une partie lipophile et une partie hydrophile. Dans une émulsion, la phase lipidique peut être dispersée dans la phase aqueuse sous forme de gouttelettes, elle est alors appelée communément émulsion huile dans eau (H/E). A l'inverse, la phase aqueuse peut être dispersée dans la phase lipidique et l'émulsion ainsi obtenue est alors appelée émulsion eau dans huile (E/H) (Figure 8). Le sens de l'émulsion (H/E ou E/H) est fonction de l'agent tensioactif et plus particulièrement de la valeur de sa balance hydrophile / lipophile (HLB). L'échelle de HLB de Griffin, décrite en 1949, permet de définir le caractère hydrophile ou hydrophobe majoritaire des tensioactifs [23].

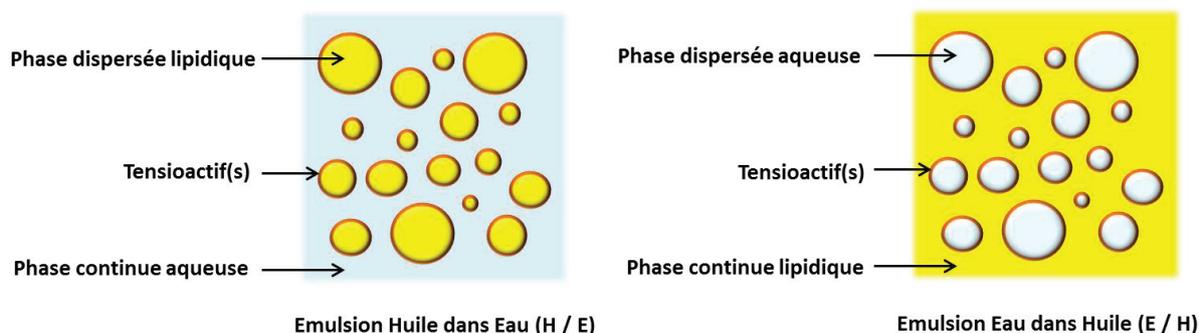


Figure 8 : Représentation schématique de l'organisation d'une émulsion huile dans eau et d'une émulsion eau dans huile.

Cette échelle s'étend de 0 à 40. Les tensioactifs de HLB inférieure ou égale à 8 possèdent une partie lipophile de masse moléculaire plus importante que leur partie hydrophile et inversement, les tensioactifs de HLB supérieure à 8 possèdent une partie hydrophile de masse moléculaire plus importante que leur partie lipophile. Ainsi, lorsqu'un tensioactif de HLB inférieure ou égal à 8 est ajouté dans un mélange Huile / Eau, l'émulsion formée sera de type E/H et inversement, si la valeur de HLB du tensio-actif est supérieure ou égale à 8 alors l'émulsion formée sera de type H/E. Lorsque l'émulsion est obtenue au moyen d'un mélange de tensioactifs, le HLB de ce mélange (HLB_m) est calculé selon l'équation (1).

$$HLB_m = \frac{(m_1 \times HLB_1) + (m_2 \times HLB_2)}{(m_1 + m_2)} \quad (\text{Eq.1})$$

Avec :

m_1 : masse du tensioactif 1 dans la formulation (g)

m_2 : masse du tensioactif 2 dans la formulation (g)

HLB_1 : valeur HLB du tensioactif 1

HLB_2 : valeur HLB du tensioactif 2

Les émulsions H/E constituent la majorité des formulations des écrans solaires. Les filtres UV choisis sont alors dispersés dans la phase lipophile ou hydrophile selon leur polarité. Les agents tensioactifs sont également dispersés selon leur polarité. Un apport d'énergie est nécessaire à la formation de l'émulsion. Cette énergie peut être magnétique, mécanique ou encore sonore. Cet apport d'énergie est particulièrement important puisqu'il va influencer la taille des gouttelettes de phase dispersée en suspension ainsi que la stabilité de l'émulsion dans le temps. Fondamentalement, une émulsion n'est pas thermodynamiquement stable. En effet, les deux phases non miscibles sont vouées à se séparer dans le temps de par leur différence de polarité. Cependant, il est possible d'augmenter la stabilité des émulsions notamment en sélectionnant le ou les agents tensioactifs par rapport aux propriétés

physico-chimiques des phases lipidique et aqueuse. Afin de garantir la stabilité optimale des gouttelettes de phase dispersée dans la phase dispersante, le HLB du tensioactif doit correspondre au HLB requis (HLB_r) de la phase dispersée, en l'occurrence la phase lipidique dans le cas d'une émulsion H/E. Le HLB_r d'une phase lipidique correspond au HLB sous lequel cette phase sera dispersée de manière optimale dans la phase aqueuse. Les HLB_r de nombreuses phases lipidiques sont publiés dans la littérature [24]. Afin de garantir la stabilité optimale d'une émulsion, il convient donc d'utiliser un tensioactif ou bien un mélange de tensioactifs dont le HLB correspond au HLB_r de la phase dispersée. L'équation 2 permet de déterminer, lorsque l'on travaille avec un mélange de tensioactifs, les concentrations de chaque tensioactif à utiliser afin que le HLB du mélange de tensioactifs soit égal au HLB_r de la phase lipidique.

$$HLB_m = x HLB_1 + (1-x) HLB_2 = HLB_r \quad (\text{Eq.2})$$

Ce qui donne :

$$x = \frac{HLB_r - HLB_2}{HLB_1 - HLB_2}$$

Avec :

x : fraction massique du tensioactif 1 dans le mélange (%)

HLB_m : HLB du mélange de tensioactifs

HLB_1 : valeur HLB du tensioactif 1

HLB_2 : valeur HLB du tensioactif 2

HLB_r : HLB requis de la phase lipophile

Les émulsions de type E/H sont celles qui permettent d'obtenir des écrans solaires résistants à l'eau [25] ce qui leur confère un avantage non négligeable en termes d'efficacité photo-protectrice. Cependant, les émulsions solaires de type E/H sont esthétiquement moins agréables à utiliser.

Les écrans solaires sont également commercialisés sous forme d'huiles, de gels, de sticks et même de poudres [26].

2- Application topique des écrans solaires:

L'application des écrans solaires sur la peau est un paramètre particulièrement important afin de garantir l'efficacité photo-protectrice optimale de la formulation. Il est recommandé

d'appliquer 2 mg.cm^{-2} de formulation sur la peau. En effet, l'efficacité des écrans solaires est évaluée *in vivo* avec cette quantité. Cependant, plusieurs études ont montré, qu'en moyenne, les consommateurs n'appliquent que le tiers de cette quantité [27]. La quantité de formulation appliquée sur la peau influence la valeur du FPS de cette formulation. Si un consommateur applique $0,67 \text{ mg.cm}^{-2}$ (soit le tiers de la quantité recommandée) d'écran solaire affichant un FPS de 50 sur sa peau, le FPS procuré ne sera pas celui affiché sur le conditionnement, il sera beaucoup moins important. En effet, une étude a révélé qu'en moyenne, le FPS réel d'un écran solaire appliqué correspondait en réalité à entre 20 et 50 % du FPS affiché sur le conditionnement du produit [28]. De même, l'étalement de la formulation sur la peau va influencer son efficacité. L'écran solaire doit être appliqué de manière homogène afin de protéger toutes les zones cutanées photo-exposées.

Les propriétés d'étalement d'un écran solaire sont notamment liées aux propriétés rhéologiques de la formulation [29]. Des études ont montré que les écrans solaires dont le comportement rhéologique était de type rhéofluidifiant permettaient la formation d'un film protecteur homogène à l'application [30]. En revanche, les fluides newtoniens ne permettent pas l'étalement homogène de la formulation sur la peau [31]. La valeur du FPS est donc influencée par le comportement rhéologique de la formulation d'écran solaire. A concentrations équivalentes en filtres UV, une formulation au comportement rhéofluidifiant aura un FPS plus important que celle dont le comportement rhéologique est newtonien.

C- Evaluation de l'efficacité des écrans solaires:

1- Généralités:

L'efficacité des écrans solaires est caractérisée par trois paramètres : le FPS, le facteur de protection UVA (FPUVA) et la longueur d'onde critique (λ_c). Le FPS, aussi nommé indice de protection solaire (IPS), ne reflète que la protection dans le domaine UVB dont les longueurs d'ondes sont plus érythémateuses que celles du domaine UVA. Jusque dans les années 1990, seul le rayonnement UVB était pris en compte lors de la formulation des écrans solaires. Cependant, les données expérimentales publiées au cours de ces dernières années concernant l'implication du rayonnement UVA dans la photo-carcinogenèse cutanée et le photo-vieillessement cutané accéléré [32] ont poussé la commission européenne à promulguer un certain nombre de recommandations permettant d'assurer une protection minimale vis-à-vis du rayonnement UVA [33]. En effet, il est imposé aux industriels de développer des écrans solaires procurant une photo-protection dans le domaine UVA correspondant au moins au tiers du FPS. Par exemple, un écran solaire affichant un FPS de 30 doit présenter un FPUVA égal à une valeur minimale de 10. L'efficacité d'un écran solaire est également déterminée par λ_c correspondant à la longueur d'onde du domaine UV (de 290 nm à 400 nm) en dessous de laquelle l'écran solaire exerce 90 % de son efficacité. La longueur λ_c renseigne sur la largeur du spectre d'efficacité de l'écran solaire et notamment

de son étendue dans le domaine UVA1 (Figure 9). Les recommandations européennes mentionnent qu'un écran solaire doit avoir une λ_c d'au minimum 370 nm. Ces recommandations rendues par la commission européenne du 22 septembre 2006 concernant les produits de protection solaire sont entrées en vigueur dès l'année 2007 en France [33]. Les autres pays européens ont appliqué ces diverses recommandations les uns après les autres si bien qu'en 2008, tous les pays de l'Union Européenne (UE) les ont mises en pratique.

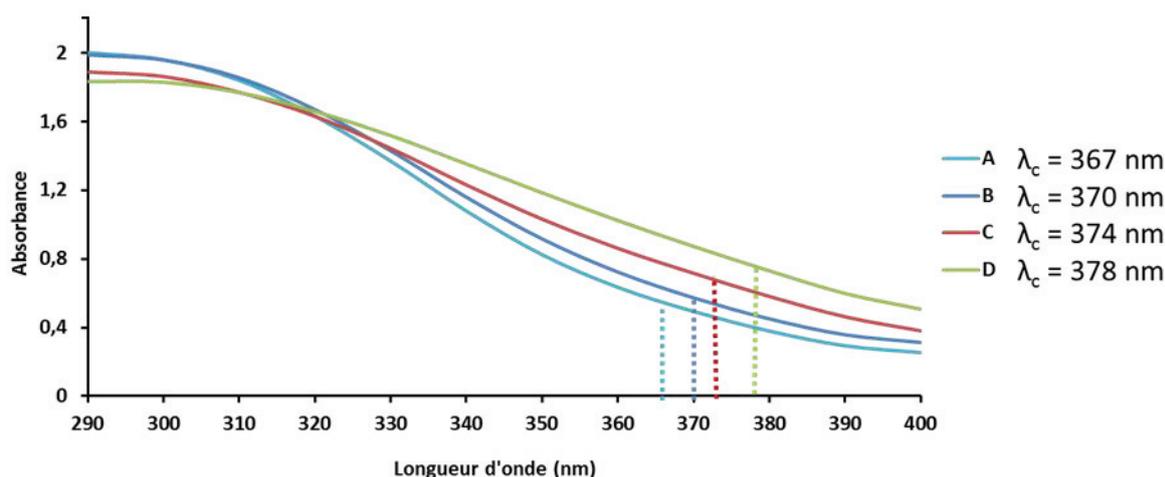


Figure 9 : Spectres d'absorption dans le domaine UV de quatre formulations d'écrans solaires de FPS 40 présentant différentes longueurs d'ondes critiques.

2- Méthodes d'évaluation *in vivo* de l'efficacité des écrans solaires:

L'évaluation *in vivo* du FPS et du FPUVA des écrans solaires repose sur des réponses cutanées biologiques induites par le rayonnement UV : l'érythème et la pigmentation cutanée persistante respectivement pour les rayonnements UVB et UVA. Le FPS d'un écran solaire correspond au rapport entre la dose érythémateuse minimale (DEM) évaluée sur peau protégée par l'écran solaire dont l'efficacité est testée et la DEM évaluée sur peau non protégée (Eq.3).

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEM évaluée sur peau protégée}}{\text{DEM évaluée sur peau non protégée}} \quad (\text{Eq.3})$$

La DEM correspond à la plus faible dose de rayonnement UV induisant un érythème visible, bien délimité, sur la peau. Le FPS est évalué *in vivo* selon une norme internationale publiée en 2010 [34]. La méthode est la suivante : plusieurs zones de mêmes dimensions sont délimitées sur la peau du dos de volontaires. Les zones sont alors irradiées avec des doses croissantes de rayonnement UVB. La DEM de l'individu est alors déterminée 24 heures après l'irradiation. De nouvelles zones sont alors délimitées sur le dos du même volontaire sur

lesquelles $2\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de formulation sont appliqués. Les zones cutanées sont alors irradiées avec des doses croissantes de rayonnement UVB choisies en fonction de la DEM de l'individu et du FPS attendu. Le rapport entre la DEM obtenue sur la zone cutanée protégée par la formulation avec celle obtenue sur la zone cutanée non protégée est alors calculé (Figure 10).

Le FPUVA correspond au rapport entre la plus faible dose de rayonnement UVA induisant une pigmentation cutanée persistante (PPD pour « persistent pigment darkening ») sur peau non protégée par celle induisant une PPD sur peau protégée par l'écran solaire dont l'efficacité est testée (Eq. 4). Le FPUVA est déterminé *in vivo* selon une norme internationale publiée en 2011 [35]. La méthode consiste à délimiter plusieurs zones de mêmes dimensions sur le dos de volontaires et d'irradier ces zones avec des doses croissantes d'UVA afin de déterminer la plus faible dose de rayonnement UVA induisant une PPD sur la peau de l'individu non protégée (Figure 11). D'autres zones sont alors délimitées sur lesquelles $2\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de l'écran solaire à tester sont appliqués avant que la PPD soit de nouveau mesurée. Le rapport entre la PPD évaluée sur la peau de l'individu protégée par l'écran solaire à tester et celle obtenue sur la peau de l'individu non protégée est alors calculé.

$$\text{FPUVA} = \frac{\text{PPD évaluée sur peau protégée}}{\text{PPD évaluée sur peau non protégée}} \quad (\text{Eq.4})$$

Les méthodes d'évaluation *in vivo* de l'efficacité des écrans solaires présentent toutefois des limites en termes de fiabilité des résultats obtenus et de corrélation avec l'efficacité de la formulation appliquée en conditions réelles par les consommateurs. En effet, en laboratoire, la pesée et l'étalement de la formulation sur la peau des individus sont très standardisés. Or, ce n'est pas le cas en conditions réelles lorsqu'un individu applique un écran solaire sur sa peau. Des études ont révélé que la quantité d'écran solaire qui est appliquée par les consommateurs est bien moindre que celle utilisée pour caractériser le pouvoir photo-protecteur de la formulation [30]. Ainsi, le FPS procuré par l'écran solaire utilisé ne sera pas le même que celui obtenu lors des tests *in vivo*.

3- Méthodes d'évaluation *in vitro* de l'efficacité des écrans solaires:

Le FPS ainsi que le FPUVA des écrans solaires peuvent également être déterminés *in vitro*. A ce jour, il n'existe qu'une norme internationale publiée en 2012 concernant la détermination du FPUVA et de la λ_c *in vitro* [36]. En effet, bien que de nombreux laboratoires utilisent des méthodes de détermination *in vitro* du FPS, aucune norme internationale n'est publiée. Cette méthode n'est donc utilisée qu'à des fins de screening des formulations pour limiter les coûts de développement de l'écran solaire puisque la méthode d'évaluation *in vivo* est une méthode relativement coûteuse. En plus de leurs avantages liés à leur faible coût de mise en œuvre, les méthodes d'évaluations *in vitro* de l'efficacité des écrans solaires représentent une bonne alternative en considérant les problèmes éthiques que la méthode

d'évaluation *in vivo* implique. En effet, la mise en œuvre de la méthode d'évaluation *in vivo* de l'efficacité des écrans solaires requiert l'irradiation d'individus avec d'importantes doses de rayonnements UVB et UVA ce qui est discutable en considérant toutes les données sur le caractère délétère pour l'organisme d'un tel rayonnement et notamment le caractère carcinogène. Les méthodes d'évaluation *in vitro* du FPS et du FPUVA reposent sur la mesure de la transmittance UV à travers un substrat sur lequel l'écran solaire à tester est étalé. Les substrats d'étalement sont des plaques en poly(méthacrylate de méthyle) (PMAM). La norme internationale publiée sur la détermination du FPUVA et de la λ_c recommande de peser $1,3 \text{ mg.cm}^{-2}$ de formulation à tester répartis en multiples gouttelettes sur la plaque de PMAM. La formulation ainsi déposée est ensuite étalée de manière homogène sur toute la surface de la plaque PMAM. La plaque est ensuite placée à l'obscurité pendant au minimum 15 minutes avant que la transmittance UV soit mesurée. La transmittance UV à travers la plaque recouverte de la formulation à tester est alors mesurée avec un spectrophotomètre possédant une sphère d'intégration. Le FPS et le FPUVA est alors calculé selon les équations 5 et 6 décrites par Diffey [37].

$$\text{FPS} = \frac{\int_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} d_{\lambda}}{\int_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} d_{\lambda}} \quad (\text{Eq.5})$$

$$\text{FPUVA} = \frac{\int_{320}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} d_{\lambda}}{\int_{320}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} d_{\lambda}} \quad (\text{Eq.6})$$

Avec :

E_{λ} : spectre d'action érythémale de la longueur d'onde λ donné par la commission internationale de l'éclairage

S_{λ} : irradiance spectrale de la longueur d'onde λ

T_{λ} : transmittance spectrale de la longueur d'onde λ

d_{λ} : domaine d'intégration

La λ_c d'un écran solaire est évaluée *in vitro* en déterminant la longueur d'onde en dessous de laquelle l'aire sous la courbe du spectre d'absorption de l'écran solaire dans les domaines UVB et UVA (de 290 nm à 400 nm) atteint 90 % de l'aire totale sous la courbe du spectre d'absorption de la formulation testée. La λ_c est déterminée selon l'équation 7.

$$\int_{290}^{\lambda_c} \lg \left[\frac{1}{T(\lambda)} \right] d\lambda = 0,9 \times \int_{290}^{400} \lg \left[\frac{1}{T(\lambda)} \right] d\lambda \quad (\text{Eq. 7})$$

Avec :

T_{λ} : transmittance spectrale de la longueur d'onde λ

d_{λ} : domaine d'intégration

Lampes délivrant différentes doses de rayonnement UVB



DEM évaluée sur peau non protégée = 26 mJ.cm⁻²

DEM évaluée sur peau protégée = 826 mJ.cm⁻²

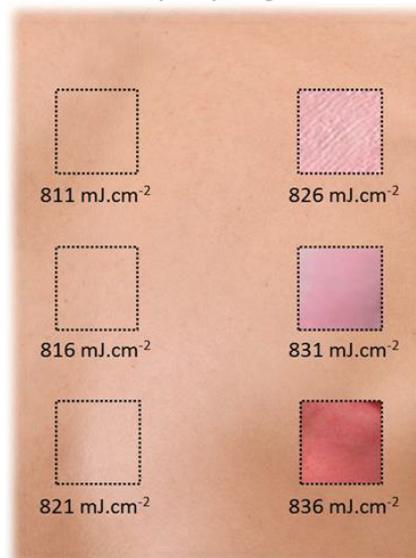
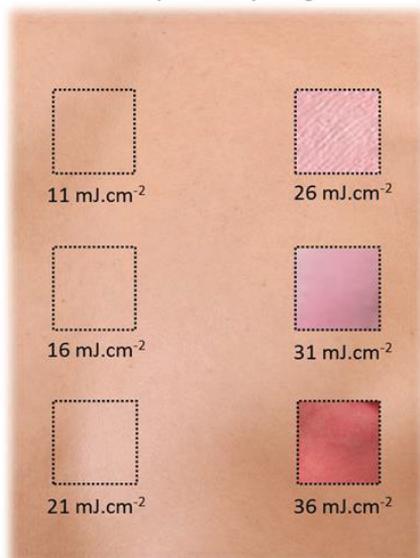


Figure 10: Méthode d'évaluation *in vivo* du FPS. Exemple de détermination *in vivo* de l'efficacité d'un écran solaire dont le FPS est de 31.

$$\text{FPS} = \frac{\text{DEM évaluée sur la peau après application de l'écran solaire}}{\text{DEM évaluée sur la peau avant application de l'écran solaire}}$$

$$\text{FPS} = \frac{826}{26}$$

$$\text{FPS} = 31$$

Lampes délivrant différentes doses de rayonnement UVA



PPD évaluée sur peau non protégée = 45 mJ.cm⁻²



PPD évaluée sur peau protégée = 45 mJ.cm⁻²

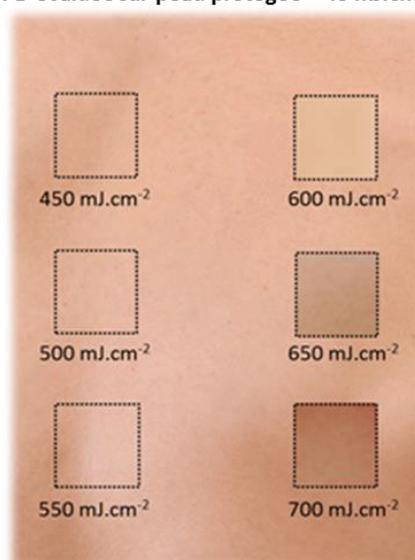
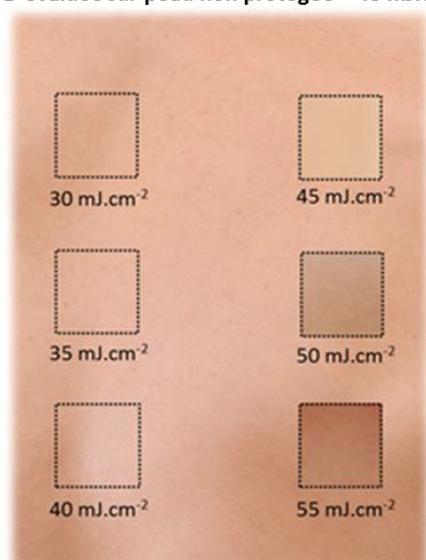


Figure 11 : Méthode d'évaluation *in vivo* du FPUVA. Exemple de détermination *in vivo* de l'efficacité d'un écran solaire dont le FPUVA est de 13.

$$\text{FPUVA} = \frac{\text{PPD évaluée sur la peau après application de l'écran solaire}}{\text{PPD évaluée sur la peau avant application de l'écran solaire}}$$

$$\text{FPUVA} = \frac{600}{45}$$

$$\text{FPUVA} = 13$$

4- Classification des écrans solaires selon leur FPS:

Afin de faciliter le choix des consommateurs, en Europe, les écrans solaires sont classés dans différentes catégories en fonction de leur FPS. Ainsi, on distingue (i) les écrans solaires conférant une faible photo-protection cutanée qui regroupent les écrans solaires de FPS 6 et 10, (ii) les écrans solaires procurant une moyenne photo-protection cutanée regroupant les formulations de FPS 15, 20 et 25, (iii) les écrans solaires de FPS 30 et 50 procurant une haute photo-protection cutanée et enfin (iv) les écrans solaires dits de très haute photo-protection cutanée regroupant les formulations de FPS 50+ (Figure 12). Au fur et à mesure que le FPS augmente, les différences en termes de pourcentage de rayonnement UVB filtré par les écrans solaires s'amenuisent. Ainsi, un écran solaire de FPS 50 ne filtre pas deux fois plus de rayonnement UVB qu'un écran solaire de FPS 25 mais seulement 2 % en plus. Cependant, lorsque l'on compare les écrans solaires en fonction du nombre de photons qu'ils laissent atteindre la peau, les différences en termes d'efficacité sont alors plus nettes (Figure 13). Ainsi, un écran solaire de FPS 25 laisse passer deux fois plus de photons UVB qu'un écran solaire de FPS 50. En ces termes, un écran solaire de FPS 50 est alors deux fois plus efficace pour protéger la peau qu'un écran solaire de FPS 25. Il est important de noter qu'il n'existe aucun écran solaire pouvant filtrer la totalité du rayonnement UV.

La législation européenne impose aux écrans solaires commercialisés de procurer une photo-protection UVA correspondant au moins au tiers de la photo-protection UVB procurée. Ainsi, les écrans solaires commercialisés revendiquant un FPS de 30 doivent avoir un FPUVA d'au minimum 10. De même, les écrans solaires commercialisés doivent avoir une λ_c d'au minimum 370 nm. Plus la λ_c d'un écran solaire est importante, plus l'écran solaire protège la peau de façon étendue dans le domaine UVA et notamment dans le domaine UVA I.

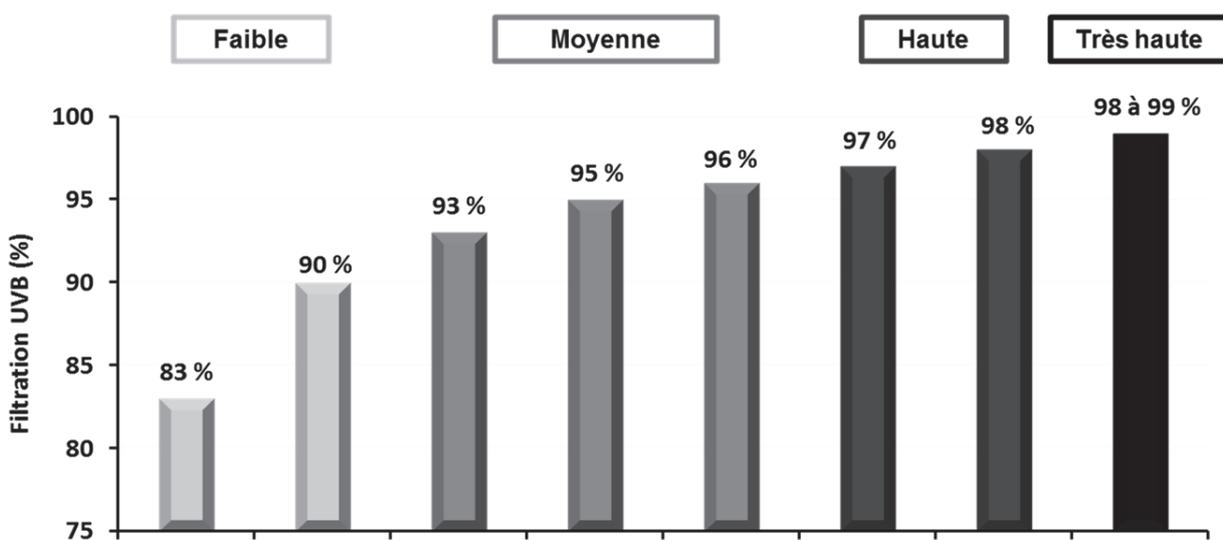


Figure 12 : Classement des écrans solaires en fonction du pourcentage de rayonnement UVB filtré et du degré de photo-protection cutanée qu'ils procurent : Faible, Moyenne, Haute et Très haute.

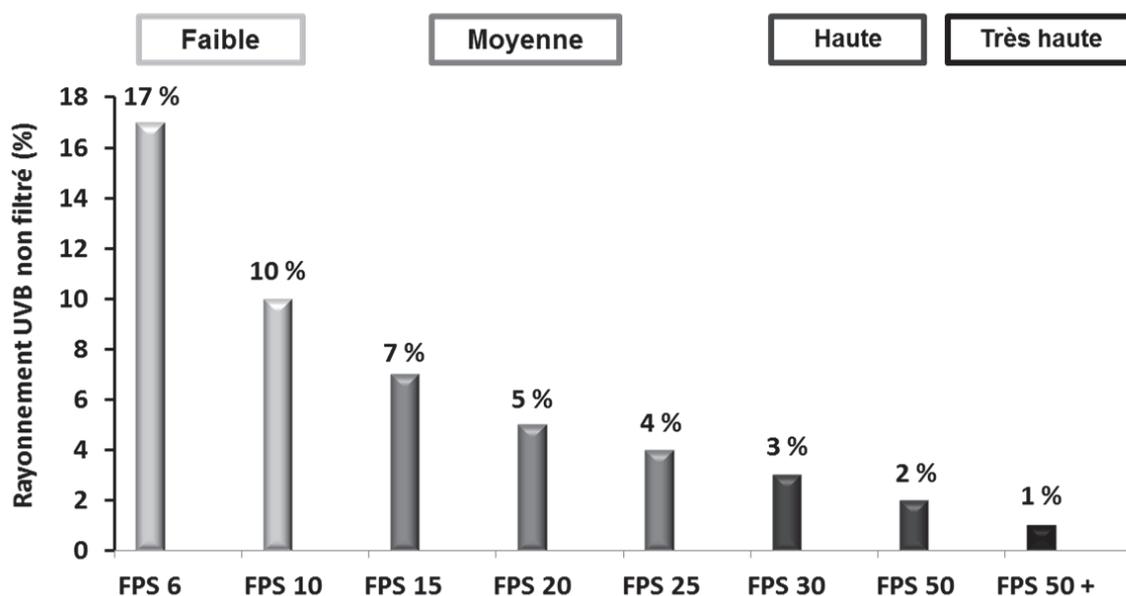


Figure 13 : Classement des écrans solaires en fonction du pourcentage de rayonnement UVB atteignant la peau et du degré de photo-protection cutanée qu'ils procurent : Faible, Moyenne, Haute et Très haute.

5- Choix de l'indice de protection solaire approprié:

Tous les individus ne présentent pas la même sensibilité au rayonnement UV. En 1975, Fitzpatrick a décrit six phototypes cutanés en prenant en compte la pigmentation naturelle de la peau ainsi que ses capacités à brûler et à bronzer lorsqu'elle est exposée au soleil sans photo-protection [38, 39] (Tableau 2). Tous les individus peuvent déterminer leur phototype cutané de manière subjective en évaluant leur capacité à bronzer et à brûler. Le phototype cutané peut également être déterminé plus objectivement en prenant en compte les valeurs de DEM dans les domaines UVA et UVB. La classification de Fitzpatrick classe les six phototypes du plus clair au plus foncé. Plus le phototype cutané est clair, plus la peau est sensible aux radiations UV et brûle facilement. Plus le phototype cutané est foncé et plus il contient de mélanine photo-protectrices et donc il sera moins sensible aux radiations UV. Les phototypes les plus foncés sont donc moins enclins à développer un cancer cutané que les phototypes les plus clairs. Les individus de phototypes I et II sont dits mélano-compromis, ceux de phototypes III et IV sont dits mélano-compétents et enfin les individus de phototypes V et VI sont dit mélano-protégés.

Tableau 2: Classification des phototypes cutanés selon Fitzpatrick.

Phototype cutané	Description	Bronzage immédiat	Bronzage	Coloration cutanée naturelle	DEM induite par les UVA (mJ.cm ⁻²)	DEM induite par les UVB (mJ.cm ⁻²)
I	Brûle toujours, ne bronze jamais	Jamais	Jamais	Blanche ivoire	20 – 35	15 – 30
II	Brûle facilement, peut bronzer mais difficilement et très légèrement	Très faible	Très faible	Blanche	30 – 45	25 - 40
III	Brûle modérément, bronze modérément mais uniformément	Faible mais bien défini	Faible à modéré	Blanche	40 - 55	30 - 50
IV	Brûle modérément, bronze facilement modérément à fortement	Modéré	Modéré	Beige – Olive, mate	50 - 80	40 - 60
V	Brûle rarement, bronze très facilement et intensément	Intense	Fort, intense	Brune modérée, très hâlée	70 - 100	60 - 90
VI	Ne brûle jamais, bronze intensément	Intense	Fort, intense	Brune intense à noire	100	90 - 150

Le phototype cutané peut également être déterminé selon la valeur de l'angle de typologie individuelle (angle ITA° de l'anglais individual typology angle). L'angle ITA° caractérise la coloration cutanée des individus. Sa valeur est calculée à partir des paramètres de coloration cutanée (L*, a* et b*) mesurés avec un chromamètre. La valeur de l'angle ITA° est déterminée selon l'équation 8.

$$ITA^\circ = [\text{Arc Tangent} ((L^* - 50) / b^*)] 180 / 3,1416 \quad (\text{Eq. 8})$$

Avec:

L*: valeur de luminance

b*: paramètre de chrominance décrivant la couleur dans un axe allant du bleu au jaune

La valeur de l'angle ITA° est utilisée pour déterminer le phototype cutané des individus notamment avant de réaliser les mesures de FPS *in vivo* des produits de protection solaire. En effet, les valeurs d'angle ITA° peuvent être associées aux phototypes cutanés (Tableau 3).

Les écrans solaires doivent donc être choisis en fonction du phototype cutané. Il est à noter qu'aucun phototype ne permet de se passer de l'utilisation d'écrans solaires sans risquer des dommages cutanés.

Le choix du FPS de l'écran solaire utilisé doit également prendre en compte la localisation géographique de l'individu. En effet, l'incidence du rayonnement UV diffère d'une région du monde à une autre (Figure 14). A 1000 mètres d'altitude, l'incidence du rayonnement UV augmente de 10 à 12 %. Il faut également prendre en compte la réverbération du rayonnement UV selon la nature du sol du lieu où on se trouve. En effet, la neige réfléchit 85 % du rayonnement UV incident, le sable en réfléchit 17%, l'eau 5 % et l'herbe 3 %. L'indice de rayonnement solaire universel est un indice, préconisé par l'organisation mondiale de la santé (OMS), qui permet de caractériser l'intensité du rayonnement UV en

fonction du risque qu'elle représente pour la santé. Cet indice universel renseigne sur le risque de lésions (cutanées et oculaires) induites par le rayonnement UV et donc sur les moyens de photo-protection à employer [40] (Figure 15).

Tableau 3 : Correspondance entre la valeur de l'angle ITA° mesurée et le phototype cutané.

Coloration cutanée	Valeur de l'angle ITA°	Phototype cutané
Très claire	> 55°	I
Claire] 41° à 55°]	II
Intermédiaire] 28° à 41°]	III
Tannée] 10° à 28°]	IV
Très tannée] - 30° à 10°]	V
Noire	≤ - 30°	VI



Figure 14 : Indice de rayonnement UV universel dans le monde.

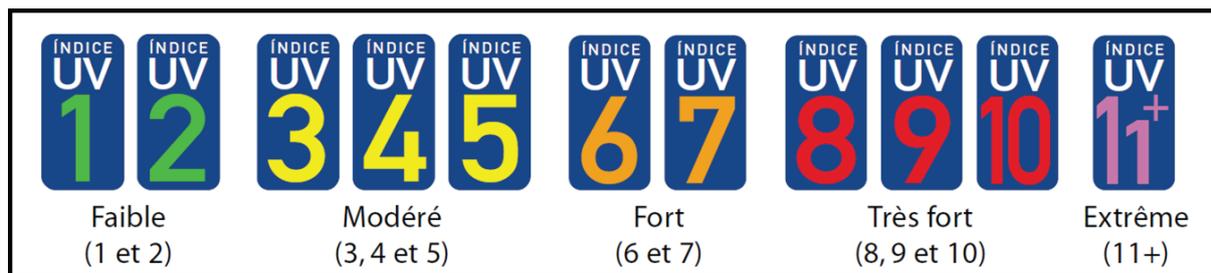


Figure 15 : Correspondance des indices de rayonnement UV universels définis par l'OMS.
http://www.who.int/uv/intersunprogramme/activities/uv_index/fr/

D- Conclusion:

Les écrans solaires constituent un moyen efficace de protéger la peau des effets délétères du rayonnement UV. Cependant, ces formulations doivent être utilisées selon des recommandations précises (quantités appliquées, réapplication régulière, choix du FPS, bon étalement) afin de garantir une photo-protection cutanée optimale. Les écrans solaires doivent être choisis en fonction du phototype mais également de la localisation géographique. La formulation des filtres UV est un paramètre très important qui influence l'efficacité de l'écran solaire. La formulation des filtres UV inorganiques et organiques dans des nanoparticules lipidiques sera abordée dans les chapitres 4 et 5.

Chapitre II:

Règlementation, usage et toxicité des filtres UV

A- Toxicité des filtres UV pour l'Homme:

1- Toxicité cutanée:

Les données de cette dernière décennie concernant la toxicité des filtres UV organiques et inorganiques sont mentionnées dans une review publiée en 2013 et insérée à la fin de ce chapitre [41].

a) Les filtres UV organiques:

Les filtres UV organiques regroupent un ensemble de molécules capables d'absorber et de dissiper l'énergie UV incidente. Ces molécules peuvent être classées en groupes chimiques avec l'acide para-aminobenzoïque et ses dérivés, les benzophénones, les dérivés du benzimidazole, les dérivés du benzotriazole, les dérivés du camphre, les cinnamates, les dérivés du dibenzoylméthane, les salicylates, les triazines et les autres molécules.

Chaque molécule possède un spectre d'absorption lui permettant de protéger la peau dans un domaine UV. Bien que le groupe des benzophénones filtrent à la fois les domaines UVB et UVA, la plupart des filtres UV organiques ne sont efficaces que dans le domaine UVB (Tableau 4). Les concentrations maximales autorisées dans les écrans solaires sont dépendantes de la législation du pays dans lequel ils sont commercialisés. La plupart des écrans solaires comportent un mélange de plusieurs filtres UV (organiques et/ou inorganiques) afin de garantir une photo-protection large spectre (Tableau 5).

Les filtres UV organiques sont pratiques à utiliser puisque ces molécules sont simples à formuler. Ce type de filtres UV permet de formuler des écrans solaires à la texture légère et agréables à appliquer sur la peau (non collants, sans résidus blancs). Cependant, ces molécules peuvent causer des désagréments chez les consommateurs à commencer par des réactions cutanées de type allergiques et photo-allergiques. L'acide para-aminobenzoïque (PABA) et ses dérivés regroupent un ensemble de molécules au pouvoir hautement allergisant. Ces molécules ont d'ailleurs été retirées de la liste des filtres UV autorisés en Europe depuis 2008 suite aux données publiées concernant leur potentiel allergisant et photo-allergisant ainsi qu'à leurs effets cytotoxiques [42]. L'avobenzone, l'octocrylène, l'octyl salicylate, l'octyl triazone ainsi que les benzophénones 3 et 4 (BP-3 et BP-4), sont également connus pour déclencher des réactions cutanées allergiques et photo-allergiques [41].

Certains filtres UV organiques comme l'avobenzone et l'octyl methoxycinnamate (OMC) sont des molécules photo-instables qui tendent à se décomposer sous la lumière UV [43, 44]. Cette instabilité peut entraîner la perte du pouvoir photo-protecteur de la molécule et également favoriser la génération de dérivés cytotoxiques pour la peau. En effet, l'avobenzone peut perdre jusqu'à 60 % de ses propriétés absorbantes dans l'UV et se décomposer en benzyle et aryle glyoxale qui sont deux dérivés déclenchant des réactions photo-allergiques de contact. Certaines de ces molécules peuvent réagir entre elles si bien

que certaines associations de filtres UV comme l'avobenzène et l'OMC ne sont pas autorisées dans certains pays. A l'inverse, certaines associations comme l'octocrylène, la BP-3 et l'OMC sont recommandées dans la mesure où elles permettent de stabiliser les molécules entre elles et donc d'éviter la synthèse de dérivés cytotoxiques ainsi que leur dégradation [41].

Plusieurs filtres UV organiques sont connus pour induire la formation de DRO sous stimulation UV comme le PABA, l'octocrylène, la BP-3, l'OMC et l'acide benzilidène camphre sulfonique [43-47]. Des études ont montré que le PABA, l'octocrylène et la BP-3 induisent la formation de DRO sans stimulation UV préalable. Les DRO formés peuvent entraîner des effets cytotoxiques sur les cellules nucléées de la peau ce qui peut conduire à leur apoptose. Cependant, pour atteindre les cellules nucléées, les filtres UV organiques doivent pénétrer le SC qui lui est constitué par une succession de couches de cellules mortes, kératinisées.

De nombreuses études ont montré que la pénétration cutanée des molécules était notamment influencée par leur taille et également par leur polarité [48, 49]. La majorité des filtres UV organiques sont des molécules lipophiles avec un poids moléculaire inférieur à 500 g.mol^{-1} (Tableau 5). Le calcul du coefficient de partage Octanol / Eau ($K_{\text{Oct/Eau}}$) d'une molécule permet de déterminer expérimentalement sa lipophilie en étudiant sa distribution dans un système bi-phasique composé d'octanol (phase lipophile) et d'eau (phase hydrophile). Cette approche est un bon moyen d'évaluer le comportement d'une molécule dans les couches cutanées puisque la peau comprend elle même un compartiment lipophile constitué par le SC et un compartiment hydrophile constitué par les autres couches épidermiques et le derme. Le coefficient de partage $K_{\text{Oct/Eau}}$ d'une molécule correspond donc au rapport entre les concentrations à l'équilibre de la molécule dissoute dans l'octanol et dans l'eau (Eq.9).

$$K_{\text{Oct/Eau}} = \frac{C_{\text{Oct}}}{C_{\text{Eau}}} \quad (\text{Eq.9})$$

Avec :

C_{Oct} : concentration de la molécule d'intérêt dans l'octanol

C_{Eau} : concentration de la molécule d'intérêt dans l'eau

Le coefficient de partage d'une molécule est habituellement donné sous la forme de son logarithme de base 10 ($\log (K_{\text{Oct/Eau}})$). Les molécules à caractère hydrophobe vont préférentiellement se solubiliser dans l'octanol et auront donc un $\log (K_{\text{Oct/Eau}})$ élevé. A l'inverse, les molécules à caractère hydrophile vont préférentiellement se solubiliser dans l'eau et auront donc un $\log (K_{\text{Oct/Eau}})$ faible. Les molécules dont le $\log (K_{\text{Oct/Eau}})$ est égal à 0 sont aussi miscibles dans l'octanol que dans l'eau. La valeur du $\log (K_{\text{Oct/eau}})$ des filtres UV organiques est en majorité positive mais modérément élevée (Tableau 6).

Les espaces inter-cellulaires du SC sont principalement constitués de céramides, de cholestérol et d'acides gras libres (dont 56 % d'acides cérotiques et lignocériques) [50]. Le Tableau 6 présente les principaux constituants du SC et leur $\log(K_{Oct/Eau})$. Le $\log(K_{Oct/Eau})$ des constituants du SC sont supérieurs à 6. Le SC constitue donc un milieu très lipophile de par sa composition structurelle.

Tableau 6 : Valeur du $\log(K_{Oct/Eau})$ des principaux constituants des espaces inter-cellulaires du SC.

Constituants du SC	$\log(K_{Oct/Eau})^{\S}$
Céramides	8,02 à 25,80
Cholestérol	9,85
Acide cérotique	12,47
Acide lignocérique	11,40
Acide palmitique	7,15
Acide arachidonique	6,91
Acide linoléique	7,18
Acide stéarique	8,22
Acide oléique	7,70

Cependant, l'épiderme vivant (i.e. *stratum spinosum* et *stratum basale*) et le derme sont des milieux hydrophiles. Les molécules dont le $\log(K_{Oct/eau})$ est positif vont avoir de l'affinité pour le SC. Les molécules dont la valeur du $\log(K_{Oct/eau})$ est très élevée (i.e. > 4) seront stockées dans le SC puisqu'elles n'ont pas d'affinité pour les couches sous-jacentes de l'épiderme plus hydrophiles. A l'inverse, les molécules dont la valeur du $\log(K_{Oct/eau})$ est modérément élevée (i.e. compris entre 2,5 et 3,6) pénétreront les couches cutanées hydrophiles et seront potentiellement distribuées dans la circulation systémique [51, 52].

Ainsi, la BP-3, les 3 et 4-méthyl benzylidène camphre (3-MBC et 4-MBC), l'OMC et l'octyl salicylate sont des molécules connues pour pénétrer les couches cutanées. La BP-3, les 3 et 4-MBC ainsi que l'OMC peuvent être détectés dans le sang et les urines [53, 54], le lait maternel [54-56], le liquide amniotique [57] et le placenta [58] après application topique chez l'Homme. Le PABA, les benzophénones 1, 2 et 3 (BP-1, BP-2 et BP-3), les 3 et 4-MBC, l'OMC ainsi que l'octyl salicylate exerceraient une activité œstrogénique dans l'organisme [57-61, 62-64]. En effet, ces molécules seraient capables de mimer l'effet des œstrogènes sur les récepteurs notamment localisés au niveau des tissus mammaires et utérins ce qui entrainerait la prolifération cellulaire de ces tissus.

De plus, une étude menée chez la femme a montré qu'il existait une corrélation entre les concentrations en BP-1 excrétées dans les urines et l'endométriose qui est une maladie œstrogéno-dépendante [65]. Bien que les concentrations maximales autorisées en filtres UV

organiques soit particulièrement contrôlées, il est important de préciser que les filtres UV organiques ne sont pas seulement incorporés dans les écrans solaires mais également dans d'autres produits cosmétiques tels que les gels douches, les shampoings, les sprays capillaires, les crèmes de jour, les sticks à lèvres, les lotions corporelles, les dentifrices et les produits de maquillage. Une étude a révélé que sur 231 produits cosmétiques commercialisés en Chine et aux Etats-Unis, 188 contiennent de la BP-3 [66]. Les lotions corporelles, les produits de maquillage et les produits d'hygiène corporelle sont ceux qui en contiennent le plus. Certaines personnes utilisant quotidiennement ce type de produits peuvent se retrouver en contact avec ces molécules à des concentrations élevées.

b) Les filtres UV inorganiques:

Les filtres UV inorganiques listés par la plupart des pays comprennent le TiO_2 et le ZnO . Ces particules sont utilisées dans l'industrie pour générer des réactions photo-catalytiques notamment utiles pour dépolluer les eaux et l'air mais aussi pour générer de l'électricité à partir de cellules photovoltaïques [67-70].

Le TiO_2 existe principalement sous deux formes cristallines : anatase et rutile. Ces deux formes cristallines ne présentent pas le même potentiel photo-catalytique [71, 72, 73]. En effet, la forme anatase du TiO_2 est la plus photo-catalytique et génère des DRO sous stimulation UV [74]. Dans les écrans solaires, le TiO_2 sous forme anatase n'est presque plus utilisé. L'enrobage de ces particules par un matériau inerte permet d'inhiber leur potentiel photo-catalytique évitant aux biomolécules cutanées de se retrouver en contact direct avec la surface réactive du TiO_2 . L'enrobage des filtres UV inorganiques permet également de faciliter leur formulation dans les écrans solaires [16, 75].

Les filtres UV inorganiques ont tout d'abord été incorporés dans les écrans solaires sous forme de microparticules (i.e. > 100 nm). Cependant, les désagréments que ce type de particules pose au cours de la formulation des écrans solaires (formulations épaisses, effet blanc à l'étalement) ont incité les formulateurs à les utiliser sous forme de nanoparticules (i.e. < 100 nm). Ainsi, la présence de nanoparticules minérales dans les écrans solaires s'est banalisée. Une étude australienne a révélé qu'en 2005, 70 % des écrans solaires contenant du TiO_2 et 30 % de ceux contenant du ZnO étaient formulés avec des nanoparticules [76]. La taille des espaces entre les cornéocytes du SC est inférieure à 100 nm [77, 78]. Il est donc judicieux de se demander si des particules de taille inférieure à 100 nm peuvent pénétrer le SC et rejoindre la circulation systémique.

De nombreuses études concernant l'évaluation de la pénétration cutanée des nanoparticules de TiO_2 et de ZnO ont été publiées ces dix dernières années [77, 79, 12]. Actuellement, aucune d'entre elles n'a permis de mettre en évidence la capacité de ces nanoparticules à pénétrer la peau [41]. En effet, ces nanoparticules n'ont jamais été détectées au-delà des premières couches cellulaires du SC. Cependant, en Europe, l'agence pour la sécurité des consommateurs a demandé des études complémentaires notamment réalisées sur peau lésée et en utilisant exactement les mêmes nanoparticules minérales

utilisées dans les écrans solaires commercialisés afin d'écartier tout risque potentiel de pénétration cutanée. En effet, des études tendent à montrer que les nanoparticules de TiO₂ et de ZnO pourraient déclencher l'apoptose des cellules de l'épiderme [80-83].

En attendant de nouvelles études, l'agence nationale de sécurité du médicament (ANSM) recommande de ne pas utiliser d'écran solaire contenant des nanoparticules de TiO₂ sur peau lésée, sur le visage ou dans des locaux fermés lorsque l'écran solaire est conditionné en spray [84]. Depuis le 11 juillet 2013, la présence de nanoparticules dans les produits cosmétiques commercialisés en Europe doit obligatoirement être mentionnée sur le conditionnement [85].

L'inhalation de nanoparticules de TiO₂ serait à l'origine de l'inflammation des voies respiratoires et d'une cytotoxicité. Le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le TiO₂ comme agent potentiellement cancérigène. L'institut national de recherche et de sécurité (INRS) a émis plusieurs recommandations visant à protéger les salariés travaillant avec du TiO₂ qu'il soit sous forme de nanoparticules ou non [86]

2- Toxicité sur les organes périphériques:

En pénétrant la peau, les filtres UV peuvent se retrouver dans la circulation systémique et atteindre les organes périphériques. La BP-3, les 3 et 4 MBC, l'OMC et l'éthylhexyl salicylate peuvent pénétrer dans la peau si bien qu'il est possible de retrouver ces molécules au niveau du plasma, des urines et même du lait maternel pour ce qui est de la BP-3 [87-92].

Plusieurs études ont montré qu'une application topique répétée de BP-3 augmentaient son absorption systémique [93, 94]. La BP-3 est un des filtres UV organiques les plus susceptibles de pénétrer la peau [93, 94] de par la valeur de son log (K_{Oct/Eau}) modérément élevée et son poids moléculaire de 228,25 g.mol⁻¹. Des études montrent qu'entre 1 et 2 % de la dose totale de BP-3 appliquée sur la peau peuvent être détectés dans les urines [87, 88]. Ce filtre UV organique est très utilisé que ce soit dans les écrans solaires ou dans les autres produits cosmétiques du fait de son efficacité large spectre dans les domaines UVB et UVA.

Les autorités sanitaires recommandent d'appliquer 2 mg d'écran solaire par cm² de peau puisque c'est en utilisant cette quantité que l'efficacité d'un écran solaire est évaluée *in vivo*. Selon la taille et le poids des individus, la surface corporelle et donc la surface potentielle de diffusion des molécules varie [95]. Par exemple, un individu d'1,80 m pesant 75 kg présente une surface corporelle de 1,94 m² comme cela a été calculé selon l'équation 10.

$$\text{Surface corporelle} = 0,007184 \times [\text{Taille}]^{0,725} \times [\text{Poids}]^{0,425} \quad (\text{Eq. 10})$$

Avec :

Surface corporelle : en m²

Taille : en cm

Poids : en kg

Cet individu devra donc appliquer 38,8 g d'écran solaire sur l'entière surface de son corps afin de protéger sa peau de manière optimale du rayonnement UV. Les autorités sanitaires recommandent également de réappliquer l'écran solaire toutes les deux heures et après chaque baignade. Les filtres UV organiques, dont la BP-3, peuvent ainsi pénétrer la peau sur une large surface de diffusion et avec un apport constant.

En se retrouvant dans la circulation systémique, ces molécules peuvent agir au niveau des organes périphériques. Le PABA, les BP-1, 2, et 3, les 3 et 4-MBC, l'OMC, l'homosalate et l'éthylhexyl salicylate montrent une activité œstrogénique au niveau de l'organisme. En effet, ces molécules seraient capables de mimer l'effet des œstrogènes au niveau des récepteurs de l'organisme. Ces récepteurs sont notamment retrouvés dans les tissus mammaires et utérins ce qui peut engendrer la prolifération cellulaire dans ces tissus [59-64, 96, 97].

Des études réalisées *in vitro* ont en effet révélé que le 4-MBC et les BP-1, 2 et 3 entraînaient la prolifération des cellules tumorales mammaires (lignée MCF-7). Ces mêmes filtres UV organiques auraient la capacité d'augmenter le poids du tissu utérin chez le rat immature. Le fort potentiel œstrogénique de la BP-3 peut être expliqué par le fait qu'elle soit métabolisée en BP-1 et en benzophénone 8 (BP-8) [62-64, 98-101] lorsqu'elle passe dans l'organisme. La BP-1 possède une plus forte activité œstrogénique que la BP-3 [96, 101, 102]. Bien que la majorité des études concernant l'activité œstrogénique de certains filtres UV organiques aient été réalisées chez le modèle animal, quelques études ont été réalisées chez l'Homme. En 2012, Kunisue et *al.* ont mis en évidence la présence de BP-3, de BP-1 et de BP-8 dans les urines de respectivement 99 %, 93,3 % et 83,8 % d'un groupe de 625 femmes américaines [65]. L'étude a également montré une corrélation entre la présence de BP-1 dans les urines et le développement de l'endométriose chez ces femmes. L'endométriose est une maladie œstrogène-dépendante ce qui tend à confirmer le caractère perturbateur endocrinien de la BP-1. Compte tenu du nombre d'études ayant mis en évidence la pénétration cutanée de plusieurs filtres UV organiques ainsi que leur potentiel toxique pour l'organisme, ces molécules doivent donc être formulées avec précautions.

De plus, les rayonnements UVB et UVA ont la capacité de désorganiser la fonction barrière de la peau ce qui peut favoriser la pénétration des filtres UV [103]. Les formulations d'écrans solaires doivent donc limiter la pénétration cutanée de ces molécules et ainsi prévenir les effets indésirables dont elles peuvent être à l'origine. En parallèle, la formulation des filtres UV organiques doit leur permettre d'exercer leur fonction photo-protectrice de manière optimale.

Une étude concernant l'élaboration d'un modèle mathématique visant à prédire la pénétration percutanée de trois filtres UV organiques (i.e. la BP-3, l'octyl-salicylate et l'OMC) a été réalisée au laboratoire. Ce modèle mathématique permet, à partir des données de perméation percutanée de ces trois filtres UV organiques sur un temps relativement court

(i.e. sept minutes), de prédire la perméation percutanée de ces molécules 30 minutes après application. Ces résultats sont intéressants dans la mesure où cette modélisation permet de limiter le temps de contact de la molécule étudiée sur la peau des volontaires. L'article concernant cette étude est présenté en Annexe 1.

B- Impact des filtres UV sur l'environnement:

Les filtres UV sont incorporés dans les écrans solaires mais également dans d'autres produits cosmétiques tels que les gels douche, les shampoings, les sprays capillaires, les parfums, les lotions, les crèmes, les sticks, les produits de maquillage. Les filtres UV organiques sont également incorporés dans les produits ménagers tels que les lessives ainsi que dans les matériaux constituant les emballages des produits (cartons, plastiques etc...) afin de les protéger des phénomènes de photo-dégradation.

Les filtres UV peuvent se retrouver dans l'environnement par voie directe due aux activités aquatiques auxquelles s'adonnent les consommateurs d'écrans solaires et de produits cosmétiques et également par voie indirecte par l'évacuation des eaux usées domestiques et industrielles. Chaque année, il y a donc une certaine quantité de filtres UV qui s'accumule dans les lacs, les rivières, les eaux usées, les boues, les piscines ainsi que dans les couches d'eau superficielles des mers et des océans. Les écrans solaires constituent le moyen de photo-protection cutanée le plus utilisé par les individus depuis que l'effet carcinogène du rayonnement UV sur la peau a été démontré. Plusieurs études mettent en évidence l'impact des filtres UV organiques et inorganiques déversés dans l'environnement sur la faune et la flore notamment aquatiques. Les concentrations en filtres UV les plus importantes dans l'environnement sont relevées durant les périodes estivales [104].

1- Filtres UV organiques:

Les filtres UV que l'on retrouve le plus dans la nature sont les benzophénones, l'avobenzone, l'octinoxate, l'octocrylène et l'enzacamène [66, 104-109].

Des études ont mis en évidence la présence de ces molécules dans les eaux sauvages [110-113], les piscines [113], l'eau potable [113, 114], le sol et les sédiments [115] et dans la poussière des habitats [116]. Les filtres UV organiques sont des molécules lipophiles dont le $\log (K_{\text{Oct}/\text{Eau}})$ est majoritairement supérieur à 3. Or, des études ont révélé que les molécules lipophiles de $\log (K_{\text{Oct}/\text{Eau}})$ supérieur à 3 étaient particulièrement susceptibles de s'accumuler dans l'environnement et plus spécifiquement dans les organismes aquatiques tels que les poissons où elles sont stockées avant d'être métabolisées sur une durée plus ou moins longue [63, 109, 113, 117-119].

Les filtres UV organiques exercent différents effets délétères sur l'organisme du poisson de par leur activité œstrogénique [96, 120, 121]. En effet, ces molécules altèrent le développement des gonades et la production des œufs chez le poisson ce qui perturbe leur reproduction [120]. La BP-3 ainsi que la BP-4 perturberaient l'expression de certains gènes

chez le poisson zèbre notamment des gènes impliqués dans les voies hormonales [107, 122, 123]. L'OMC, l'octocrylène, la BP-3 et l'éthyl hexylsalicylate peuvent favoriser le blanchiment des coraux avec lesquels ils se retrouvent en contact [124].

2- Filtres UV inorganiques:

Compte tenu des quantités de filtres UV inorganiques déversées dans l'environnement, de plus en plus d'études s'intéressent à leur potentiel toxique pour l'environnement. Des études ont ainsi montré que les nanoparticules de TiO_2 et de ZnO exerçaient des effets délétères sur la faune et la flore notamment aquatiques [125, 126]. Les nanoparticules de TiO_2 favoriseraient la mort des récifs coraliens.

Le TiO_2 est également utilisé dans les peintures et les matériaux composites. La loi Grenelle II comporte un texte concernant la prévention des risques pour la santé et l'environnement résultant de l'exposition aux substances à l'état nanoparticulaire [127].

C- Législation des écrans solaires à travers le monde:

1- Classification des écrans solaires:

Les écrans solaires n'ont pas le même statut selon les pays. Aux Etats-Unis, en Australie, au Canada et en Nouvelle Zélande, les écrans solaires sont considérés comme des médicaments en vente libre. Cependant, au Canada, les écrans solaires ne contenant que des filtres UV inorganiques sont considérés comme des produits de santé naturels et sont donc moins règlementés. A l'inverse, en Europe, en Chine, en Inde et au Japon, les écrans solaires sont règlementés comme des produits cosmétiques.

Les concentrations maximales autorisées en filtres UV dans les écrans solaires diffèrent d'un pays à un autre (Tableau 4). Il est donc compliqué de formuler un écran solaire qui réponde aux exigences règlementaires de tous les pays [128].

2- Législation des filtres UV:

Les filtres UV sont règlementés selon la législation en vigueur du pays dans lequel ils sont commercialisés. Il existe de grandes disparités en matière de concentrations maximales autorisées en filtres UV dans les écrans solaires selon le pays dans lequel ils sont commercialisés (Tableau 5). En Europe, l'efficacité et la sécurité des filtres UV sont évaluées avant leur mise sur le marché par le comité scientifique des produits de consommation (CSPC). Cette évaluation d'efficacité et de sécurité est réalisée selon treize critères qui comprennent le type de produit, la concentration des ingrédients dans le produit, la quantité de produit appliquée, la fréquence d'application, la surface traitée, les modalités d'application, le site anatomique, la durée de contact, la quantité susceptible de pénétrer

dans l'organisme, le type de consommateur, le mésusage prévisible, l'estimation du nombre de consommateurs potentiels et l'application sur des zones exposées au soleil.

Les études d'absorption percutanée des filtres UV sont particulièrement importantes compte tenu du risque systémique lié à l'importance de la surface d'application des écrans solaires. L'organisation de coopération et de développement économique (OCDE) a décrit une méthode d'évaluation de l'absorption percutanée des molécules [129]. La cellule de Franz est le dispositif de référence pour étudier l'absorption percutanée des molécules bien qu'il présente plusieurs désavantages [130].

Au laboratoire, un nouveau dispositif d'étude de l'absorption percutanée des molécules a été développé et breveté: le dispositif Vitropharma [131]. Une étude comparant la cellule de Franz et le dispositif Vitropharma a permis de mettre en évidence les avantages de ce nouveau dispositif d'étude bien qu'il reste encore quelques points sur lesquels travailler avant qu'il ne soit optimal. Ce nouveau dispositif permet notamment d'obtenir plus d'informations concernant la pénétration cutanée des molécules ce qui est particulièrement intéressant pour étudier la pénétration cutanée des filtres UV. La publication concernant cette étude est présentée en Annexe 2.

Les filtres UV actuellement sur le marché, en particulier les plus anciens font l'objet d'une réévaluation par le CSPC. L'ANSM a mis en place un groupe de travail sur les ingrédients cosmétiques qui se charge des études de réévaluation des filtres UV. A mesure que de nouvelles données toxicologiques concernant ces molécules et particules sont publiées, les concentrations maximales autorisées sont revues principalement à la baisse.

Certains filtres UV peuvent également être retirés de la liste des filtres UV autorisés comme ce fut le cas du PABA qui a été retiré de la liste des filtres UV autorisés en Europe en 2008.

En comparant la liste des filtres UV autorisés en Europe, aux Etats-Unis, en Australie, au Japon, en Chine et au Canada, seuls huit d'entre eux sont communs à tous ces pays. En Europe, l'intégration du ZnO en tant que filtre UV inorganique listé est attendu prochainement tandis qu'aux Etats-Unis, la food and drug administration (FDA) est en cours d'étude de huit filtres UV organiques autorisés en Europe en vue de leur éventuelle intégration [128].

D- Conclusion:

Il existe de nombreuses études publiées concernant le potentiel toxique des filtres UV organiques mais également sur celui des filtres UV inorganiques. Cependant, les études concernant la pénétration cutanée des nanoparticules manquent de normalisation. En effet, peu d'études sont, au final, comparables puisque dans la plupart des études, le modèle, les protocoles expérimentaux, les véhicules et les concentrations utilisés diffèrent. A ce jour, aucune étude n'a permis de montrer que les nanoparticules pouvaient pénétrer la peau. A l'inverse, il existe de nombreuses études montrant le potentiel toxique pour l'organisme des filtres UV organiques ainsi que sur leur capacité à pénétrer la peau.

En parallèle, le relargage des filtres UV dans l'environnement a des effets délétères pour la faune et la flore notamment aquatiques. La formulation des filtres UV est donc un travail compliqué où plusieurs critères doivent être pris en compte dont les critères d'efficacité anti-UV. Les écrans solaires doivent être formulés de manière à éviter leur pénétration cutanée d'où l'importance du choix de ses composés. De plus, les concentrations en filtres UV utilisées dans les écrans solaires devraient être les plus basses possibles compte tenu de leurs effets délétères sur l'environnement.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses publications montrent l'intérêt des nanoparticules et nanocapsules lipidiques pour vectoriser des actifs pharmaceutiques et cosmétiques. Ces transporteurs lipidiques sont particulièrement intéressants pour formuler les filtres UV et ils pourraient constituer une piste intéressante en matière d'innovation pour formuler les écrans solaires. Cette partie est développée dans les chapitres III et IV.

Tableau 4: Liste des filtres UV listés dans le monde avec leur numéro CAS, leur formule chimique, leur poids moléculaire, leur log (K_{oct/(Eau)}) et leur domaine d'absorption UV.

Classes chimiques	Nom chimique	Numéro CAS	Formule chimique	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Log(K _{oct/(Eau)}) §	Spectre d'absorption UV (nm)
Acide para-aminobenzoïque et ses dérivés	Acide para-aminobenzoïque	150-13-0	C ₇ -H ₇ -N-O ₂	137,14	0,83	UVB
	Lisadimate	136-44-7	C ₁₀ -H ₁₃ -N-O ₄	211,22	-0,28	UVB
	Meradimate	134-09-8	C ₁₇ -H ₂₅ -N-O ₂	275,39	5,96	UVAII
	Padimate A	14779-78-3	C ₁₄ -H ₂₁ -N-O ₂	235,33	3,85	UVB
	Padimate O	21245-02-3	C ₁₇ -H ₂₇ -N-O ₂	277,41	6,15	UVB
	PEG-25 PABA	116242-27-4	C ₁₃ -H ₁₉ -N-O ₄	253,29	1,63	UVB
	Roxadimate	58882-17-0	C ₁₅ -H ₂₃ -N-O ₄	281,35	2,32	UVB
	2,4-Dihydroxybenzophénone	131-56-6	C ₁₃ -H ₁₀ -O ₃	214,22	3,17	UVB, UVA
	Benzophénone-2	131-55-5	C ₁₃ -H ₁₀ -O ₅	246,22	3,16	UVB, UVA
	Benzophénone-3	131-57-7	C ₁₄ -H ₁₂ -O ₃	228,25	3,79	UVB, UVAII
Benzophénones	Sulisobenzone	4065-45-6	C ₁₄ -H ₁₂ -O ₆ S	308,31	0,89	UVB, UVAII
	Sulibenzone	6628-37-1	C ₁₄ -H ₁₁ -Na-O ₆ -S	330,29	0,37	UVB, UVA
	Benzophénone-6	131-54-4	C ₁₃ -H ₁₀ -O ₅	274,27	4,10	UVB, UVA
	Dioxybenzone	131-53-3	C ₁₄ -H ₁₂ -O ₄	244,25	3,93	UVB, UVAII
	Benzophénone-9	3121-60-6	C ₁₅ -H ₁₄ -Na ₂ -O ₁₁ -S ₂	480,37	-2,32	UVB, UVA
	4-(2-beta-glucopyranosiloxy)propoxy-2/hydroxybenzophénone	-	C ₂₂ -H ₂₆ -O ₉	434,44	1,39	UVB, UVA
	Ensilizole	27503-81-7	C ₁₃ -H ₁₀ -N ₂ -O ₃ -S	274,30	1,50	UVB
	Bisulizole disodium	180898-37-7	C ₂₀ -H ₁₂ -N ₄ -Na ₂ -O ₁₂ S ₄	674,57	-8,06	UVAI
	Ethylhexyl diméthoxybenzylidène oxoimidazoline propionate	106293-57-6	C ₁₃ -H ₁₀ -N ₂ -O ₃ -S	274,30	3,16	UVB
	Bisotrizole	103597-45-1	C ₄₁ -H ₅₀ -N ₆ -O ₂	658,89	14,35	UVB, UVAI, UVAII
Dérivés du benzotriazole	Drometrisole trisiloxane	155633-54-8	C ₂₄ -H ₃₉ -N ₃ -O ₃ -Si ₃	501,84	9,79	UVB, UVAII
	Camphor benzalkonium methosulfate	52793-97-2	C ₂₁ -H ₃₁ -N-O ₅ -S	409,54	0,28	UVB
Dérivés du camphre	Ecamsule	92761-26-7	C ₂₈ -H ₃₄ -O ₈ S ₂	562,70	1,35	UVAII, UVAI
	Benzylidène camphor sulfonic acid	56039-58-8	C ₁₇ -H ₂₀ -O ₄ -S	320,41	2,74	UVB

Dérivés du camphre	Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	113783-61-2	C ₂₁ -H ₂₅ -N-O ₂	323,43	3,42	UVB
	Enzacamene	36861-47-9	C ₁₈ -H ₂₂ -O	254,37	4,95	UVB
	3-Benzylidene camphor	15087-24-8	C ₁₇ -H ₂₀ -O	240,34	4,49	UVB
	Octinoxate	5466-77-3	C ₁₈ -H ₂₆ -O ₃	290,40	5,66	UVB
	Amiloxate	71617-10-2	C ₁₅ -H ₂₀ -O ₃	248,32	4,06	UVB
	Ensulizole	27503-81-7	C ₁₃ -H ₁₀ -N ₂ -O ₃ -S	274,30	1,50	UVB
	Diethanolamine methoxycinnamate	56265-46-4	C ₁₄ -H ₂₁ -N-O ₅	283,32	1,98	UVB
	Cinnamic acid, 2,4-diisopropyl-, ethyl ester	32580-72-6	C ₁₇ -H ₂₄ -O ₂	260,38	5,39	UVB
	Acide ferulique	1135-24-6	C ₁₀ -H ₁₀ -O ₄	194,19	1,64	UVB, UVA
	Glyceryl ethylhexanoate dimethoxycinnamate	103527-88-4	C ₂₂ -H ₃₄ -O ₈	426,50	1,09	UVB
Cinnamates	Isopentyl trimethoxycinnamate trisiloxane	-	C ₁₇ H ₃₂ O ₇ Si ₃	432,69	3,65	UVB
	Isopropyl p-methoxycinnamate + Ethyl-diisopropylcinnamate + Methyl-2,4-diisopropylcinnamate	5466-76-2 32580-72-6 32580-71-5	C ₁₃ -H ₁₆ -O ₃ C ₁₇ -H ₂₄ -O ₂ C ₁₆ -H ₂₂ -O ₂	220,27 260,37 246,35	3,06 5,39 5,01	UVB
	Ethyl diisopropylcinnamate	32580-72-6	C ₁₇ -H ₂₄ -O ₂	260,37	5,39	UVB
	Avobenzone	70356-09-1	C ₂₀ -H ₂₂ -O ₃	310,39	4,81	UVAI
	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	302776-68-7	C ₂₄ -H ₃₁ -N-O ₄	397,51	6,93	UVAII
	Trolamine salicylate	2174-16-5	C ₁₃ -H ₂₁ -N-O ₆	287,31	1,98	UVB
	Homosalate	118-56-9	C ₁₆ -H ₂₂ -O ₃	262,34	5,82	UVB
	Octisalate	118-60-5	C ₁₅ -H ₂₂ -O ₃	250,33	5,77	UVB
	Octyl triazone	88122-99-0	C ₄₈ -H ₆₆ -N ₆ -O ₆	823,07	15,53	UVB
	Iscotrizinol	154702-15-5	C ₄₄ -H ₅₉ -N ₇ -O ₅	765,98	11,89	UVB, UVA
Triazines	Bemotrizinol	187393-00-6	C ₃₈ -H ₄₉ -N ₃ -O ₅	627,81	13,89	UVB, UVA
	Tris-biphenyl triazine (nano)	31274-51-8	C ₃₉ H ₂₇ N ₃	537,65	10,48	UVB, UVAII
Autres molécules	1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,3-pentanedione	135099-97-7	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	264,32	3,90	UVB

	Polysilicone-15	207574-74-1	-	799,06	-	UVB
	Octocrylene	6197-30-4	C ₂₄ -H ₂₇ -N-O ₂	361,48	7,53	UVB, UVAIL
	Digalloyl trioleate	17048-39-4	C ₆₈ H ₁₀₆ O ₁₂	1115,5734	24,75	UVB
Minéraux	Dioxyde de titane	13463-67-7	O ₂ -Ti	79,87	-	UVB, UVAIL
	Oxyde de zinc	1314-13-2	O-Zn	81,39	-	UVB, UVAIL, UVAI

§ Source : <http://www.chemspider.com/>

Tableau 5 : Concentrations maximales autorisées des filtres UV listés en Europe, en Chine, aux Etats-Unis, en Australie, au Canada et au Japon.

Classes chimiques	Nom chimique	Europe	Chine	USA	Australie	Canada	Japon
Acide para-aminobenzoïque et ses dérivés	Acide para-aminobenzoïque	-	5	15	-	15	4
	Lisadimate	-	5	15	-	15	4
	Meradimate	-	5	15	-	15	4
	Padimate A	-	5	15	-	15	4
	Padimate O	-	5	15	-	15	4
	PEG-25 PABA	-	5	15	-	15	4
	Roxadimate	-	5	15	-	15	4
Benzophénones	2,4-Dihydroxybenzophenone	-	-	-	-	-	10
	Benzophénone-2	-	-	-	-	-	10
	Benzophénone-3	10	10	8	10	6	5
	Sulisobenzone	5	5	10	10	10	10
	Sulibenzone	5	5	-	10	-	10
	Benzophénone-6	-	-	-	-	-	10
	Dioxybenzone	-	-	3	3	3	-
	Benzophénone-9	-	-	-	-	-	10
	4-(2-beta-glucopyranosiloxy) propoxy-2/hydroxybenzophenone	-	-	-	-	-	5
Dérivés du benzimidazole	Ensilizole	8	8	4	4	4	3
	Bisdilizole disodium	10	10	-	10	-	-
	Ethylhexyl diméthoxybenzylidene oxoimidazoline propionate	-	-	-	-	-	3
Dérivés du benzotriazole	Bisoctrizole	10	10	-	10	-	10
	Drometrisole trisiloxane	15	15	-	15	15	15
	4-((2-Oxo-3-bornylidene)methyl)-phenyltrimethylammonium methylsulfate	6	6	-	6	-	-
Dérivés du camphre	Ecamsule	10	10	-	10	10	10
	Benzylidene camphor sulfonic acid	6	6	-	6	-	-
	Polyacrylamidomethyl benzylidene camphor	6	6	-	-	-	-
	Enzacamene	4	4	-	4	6	-
Cinnamates	3-Benzylidene camphor	2	2	-	-	-	-
	Octinoxate	10	10	7,5	10	7,5	20

Cinnamates	Amiloxate	10	10	-	10	-	-	-	-
	Cinoxate	-	-	3	6	3	5	-	-
	Diethanolamine methoxycinnamate	-	-	-	-	10	-	-	-
	Acide ferulique	-	-	-	-	-	10	-	-
	Glyceryl ethylhexanoate dimethoxycinnamate	-	-	-	-	-	10	-	-
	Isopentyl trimethoxycinnamate trisiloxane	-	-	-	-	-	-	7,5	-
	Isopropyl p-methoxycinnamate + Ethyl-diisopropylcinnamate + Methyl-2,4-diisopropylcinnamate	-	-	-	-	-	-	10	-
	Avobenzone	5	5	3	5	3	10	-	-
	Diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate	10	10	-	10	-	10	-	-
	Trolamine salicylate	-	-	12	12	12	-	-	-
Salicylates	Homosalate	10	10	15	15	15	10	-	-
	Octisalate	5	5	5	5	5	10	-	-
	Octyl triazone	5	5	-	5	5	5	-	-
	Iscotrizinol	10	10	-	-	-	-	-	-
Triazines	Bemotrizinol	10	10	-	10	-	3	-	-
	Tris-biphenyl triazine (nano)	10	-	-	-	-	-	-	-
	1-(3,4-Dimethoxyphenyl)-4,4-dimethyl-1,3-pentanedione	-	-	-	-	-	7	-	-
Autres molécules	Polysilicone-15	10	10	-	10	-	10	-	-
	Octocrylene	10	10	10	10	10	10	-	-
	Dioxyde de titane	25	25	25	25	25	Pas de limite	25	Pas de limite
Minéraux	Oxyde de zinc	-	25	25	25	25	Pas de limite	25	Pas de limite



Review Article

Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies

E. Gilbert^{*}, F. Pirot^{*†}, V. Bertholle^{*}, L. Roussel^{*}, F. Falson^{*} and K. Padois^{*}

^{*}Fonctions normales et pathologiques de la barrière cutanée, Laboratoire de Recherche et Développement de Pharmacie Galénique Industrielle, Université de Lyon 1, EA 4169, ISPB, 8, avenue Rockefeller, 69373, Lyon Cedex 08, France and [†]Service Pharmaceutique-Fabrication et contrôles des médicaments, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Pavillon X-Place d'Arsonval, 69437, Lyon Cedex 03, France

Received 15 June 2012, Accepted 08 December 2012

Keywords: skin permeation, sunscreens, UV filters toxicity, ZnO and TiO₂ nanoparticles

Synopsis

Sunscreens provide broad-spectrum UV skin protection and contain more often UV filter combinations. Their efficacy reducing skin photo carcinogenesis and photo ageing is widely documented. However, there are many concerns about UV filter safety. Organic UV filters were the first targeted by scientist concerns, as they were showed to trigger skin allergic reactions. Inorganic UV filters were then at the heart of scientist debate especially because of their nanometric size. Over the last years, many studies have been published tending to highlight that organic as well as inorganic UV filters could lead to variable side effects after sunscreen application. However, these studies are still very controversial due to different experimental conditions and models. This review reveals that complementary studies using standardized methods are mandatory before ascertaining that UV filters threaten human health.

Résumé

Les produits solaires destinés à protéger la peau contre les irradiations UV contiennent le plus souvent des combinaisons de filtres UV. Ces filtres permettent de réduire le vieillissement prématuré de la peau ainsi que la survenue de cancer cutané. Cependant, la nocivité des filtres UV est toujours un sujet de controverse. Ainsi, des réactions allergiques liées à l'utilisation de produits solaires contenant des filtres UV organiques ont été rapportées dans la littérature. Récemment, l'utilisation de filtres UV minéraux à l'échelle nanométrique, dispersés dans les produits destinés à la protection solaire a fait l'objet de travaux scientifiques visant à établir le niveau de pénétration cutanée. Ces dernières années, de nombreuses études ont été publiées tendant à montrer que les filtres UV organiques et inorganiques peuvent entraîner divers effets indésirables. Mais, ces diverses études restent très controversées notamment à cause des différences dans les conditions expérimentales et les modèles utilisés. Cette revue révèle que des études complémentaires utilisant des méthodes standardisées sont nécessaires pour confirmer ou infirmer que les filtres UV présentent un risque sanitaire.

Correspondence: Elodie Gilbert, Université de Lyon 1, EA 4169, Fonctions normales et pathologiques de la barrière cutanée, Laboratoire de Recherche et Développement de Pharmacie Galénique Industrielle, ISPB, 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon cedex 08, France. Tel: 33[0]478772811; Fax: 33[0]478777245; e-mail: elodie.gilbert@polaar.com

Introduction

Over the past decade, a continuous increase in skin cancer incidence rate has been registered. Skin cancers are more and more numerous and appear to be a public health problem. In response to this issue, international health authorities have advised people to take protective measures against UV radiation harmful effects. These measures include sun exposition avoidance during peak radiation hours, use of protective clothes and sunscreens. Sunscreen products are good alternatives to protect the skin against UV damages [1]. UV filters incorporated into sunscreen formulations can be organic (chemical compounds) or inorganic (mineral compounds). Modern sunscreens use a combination of several organic and inorganic UV filters to provide broad UV spectrum protection reaching the highest UV protection [2, 3]. Inorganic UV filters do not lead to skin allergic reactions contrary to organic UV filters [4]. Unfortunately, inorganic UV filters leave unpleasant white marks onto the skin when high quantities are incorporated into sunscreens products [5]. To avoid this effect, formulators incorporate nanoparticle form of inorganic UV filters permitting to elaborate more pleasant sunscreens with transparent and light textures. Nanotechnology is an emerging science involving matter manipulation at the nanometer scale. Nanomaterials are present in various marketed products such as sunscreens [1]. However, there are many questions about nanoparticle safety notably because of their ability to disturb cell functions [69, 93].

There are also many concerns about organic UV filter toxicity [4], including deleterious cell damages and biological function disruptions.

It is then relevant to wonder whether these UV filter cocktail products are safe for consumers. In this article, several studies are reviewed concerning the toxicity of UV filters currently used in sunscreen products. Zinc oxide (ZnO) and titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle toxicity and organic UV filters commonly used in sunscreens are largely discussed here.

UV filters in sunscreens

Organic and inorganic UV filters are currently used as sunscreens. They act differently when applied onto the skin. Organic UV filters are able to absorb UV rays through chemical reactions, whereas inorganic UV filters reflect incident UV radiations [7] and also absorb a part of UV radiations arriving onto the skin [8].

Contrary to inorganic UV filters, organic ones tend to trigger allergic reactions when applied onto the skin [9]. Organic UV filters are used in combination with others organic or inorganic UV filters because none of them are able individually to provide efficient Sun Protection Factor (SPF). Moreover, because of photoinstability and possible unfavourable synergistic interactions between them, restrictions exist limiting the choice of organic UV filter combinations.

Titanium dioxide (TiO₂), which has a high refractive index, is a very efficient UV filter blocking both UVA and UVB light preventing sunburns and others photodamages [10, 11]. Thus, it is considered as the best inorganic UV filter. It is usually present under two crystalline forms: anatase and rutile. These two different forms have different photocatalytic properties. TiO₂ anatase crystalline form is more photoreactive than the rutile one and it was showed to be more cytotoxic and inflammatory in human cell cultures [12, 13]. In sunscreens, TiO₂ crystalline rutile form is the most used form, but a mix of both forms can be used.

National and international cooperators on cosmetic regulation define the threshold of UV filter concentrations incorporated into sunscreen formulations [1, 14, 15]. Organic UV filters are more controlled than inorganic UV filters because of their allergenic properties. In the last years, there is an increase in interest concerning inorganic UV filters showing hypoallergenicity notably to elaborate sunscreen products for children and sensitive skin people. The use of inorganic UV filters leaving unpleasant white marks onto the skin, colourless nano- or micro-sized TiO₂ and ZnO have been incorporated into sunscreen formulations with high SPF. To be safe and efficient, sunscreens should cover and protect the skin with limited epidermal penetration and no permeation into deeper skin layers to avoid systemic absorption. Moreover, they must be photostable and they must dissipate efficiently the absorbed energy from UV rays through photophysical and photochemical pathways preventing reactive oxygen species (ROS) and others harmful intermediate compound formation. Most of ROS consist of superoxide radical, hydrogen peroxide (H₂O₂) and lipid peroxidation. In normal conditions, main sources generating ROS (98%) are mitochondria. SuperOxide Dismutase (SOD) and catalase cell enzymes usually dissipate these ROS. Sunscreens should not penetrate human cells where they can cause deleterious DNA damages and finally sunscreens should minimize UVB and UVA radiation extent that might reach DNA in cell

nuclei. Sunscreen efficiency is usually tested more with respect to its macroscopic ability to prevent skin erythema and sunburns than to the molecular and cellular level to ascertain protection against skin cancer risk. Several studies tend to demonstrate current UV filter ability to penetrate *stratum corneum* (SC) reaching deeper skin cell layers and blood vessels, leading to undesirable side effects.

Organic UV filters toxicity

Organic UV filters are commonly used in sunscreens because of their ability to filter UV rays without leaving unpleasant white marks onto the skin. They permit lighter and more pleasant sunscreen formulations than those containing inorganic UV filters. More often, organic UV filter combinations are used to achieve a sufficient SPF. However, some of these chemical compounds are known to be photounstable, decomposing under UV light, generating ROS and toxic derivative compounds and losing their UV filter properties [16]. Organic UV filters are known to be allergenic triggering photoallergic contact dermatitis [4, 9]. Photoallergic contact dermatitis is a skin allergy reaction to light mediated by contact with some chemical compounds [17]. A correlation between photoallergic contact dermatitis case reports and organic UV filter use into sunscreen formulations (concentration and first appearance on the market) has been described by Kerr *et al.* [18]. In 2010, a study reported that sunscreen chemical compounds were the main photoallergen agents responsible for photoallergic contact dermatitis [17, 19]. Organic UV filter compounds absorb UV radiations and convert them through chemical reactions that can lead to their breakdown and thus to photounstable reactive intermediate generation in direct contact with the skin [10, 20]. These reactive intermediates can behave as photo oxidants promoting phototoxic or photoallergic reactions and no longer provide protection against UV ray damages [21]. Moreover, organic UV filters can be inactivated by UV radiations [22] losing their photoprotective effect [23]. Another concern about UV filter photoinstability is their ability to generate ROS with or without UV light stimulation. However, ROS transfer through the SC is still the object of controversy. There are many organic UV filters used in sunscreen formulations. This review focuses on para-aminobenzoic acid, avobenzene, octocrylene, benzophenone compounds, organic camphor derivatives, octyl-methoxycinnamate, octyl-triazone and salicylate compounds summarized in Table I.

Table I CAS numbers, chemical formula, molecular weights, log *P*, maximum authorized concentrations in European Union and in United States, solubility and absorption spectra of the different organic UV filters referred in this review

Compounds	CAS number [113]	Chemical formula [113]	Molecular weight (g mol ⁻¹) [113]	Log <i>P</i> [113]	Maximum authorized concentrations in European Union (%) [114]	Maximum authorized concentrations in United-States FDA (%) [114]	Solubility [114]	Absorption spectrum [114]
Para-aminobenzoic acid	150-13-0	C ₇ -H ₇ -N-O ₂	137.1	0.830	5	15	Hydrophilic	UVB
Avobenzene	70356-09-1	C ₂₀ -H ₂₂ -O ₃	310.4	4.510	5	3	Lipophilic	UVAI
Octocrylene	6197-30-4	C ₂₄ -H ₂₇ -N-O ₂	361.5	6.890	10	10	Lipophilic	UVB
Benzophenone 3	131-57-7	C ₁₄ -H ₁₂ -O ₃	228.2	3.790	10	6	Lipophilic	UVB, UVAII
3-(4'-methylbenzylidene) camphor	36861-47-9	C ₁₈ -H ₂₂ -O	254.4	3.390	2	4	Lipophilic	UVB
Octyl-methoxycinnamate	5466-77-3	C ₁₈ -H ₂₆ -O ₃	290.4	5.800	10	7.5	Lipophilic	UVB
Octyl-triazone	88122-99-0	C ₄₈ -H ₆₆ -N ₆ -O ₆	823.1	15.50	5	5	Lipophilic	UVB
Octyl-salicylate	118-60-5	C ₁₅ -H ₂₂ -O ₃	250.3	5.934	5	5	Lipophilic	UVB
Homosalate	119-36-8	C ₈ H ₈ O ₃	152.2	5.940	10	15	Lipophilic	UVB
2-phenyl-benzimidazole-5-sulfonic acid	27503-81-7	C ₁₃ -H ₁₀ -N ₂ -O ₃ -S	274.3	2.100	8	4	Hydrophilic	UVB

Para-aminobenzoic acid (PABA) and its derivatives (e.g. octyldimethyl-PABA (OD-PABA)) are known to trigger photoallergies [24]. A recent published report documented the development of photocontact allergies to PABA, highlighting the need of continued vigilance to these organic UV filters [25]. An *in vitro* experiment focusing on PABA showed that it induces ROS and DNA thymine dimer formation in aqueous solution under sunlight irradiation [26, 27]. DNA thymine dimers consist of double liaison formation between two consecutive DNA thymine bases after nonionizing irradiation like UV rays. These dimers prevent DNA polymerase to make cell replication and, if they are not repaired, lead to cell death or cancer formation. Moreover, it was showed that PABA produced ROS in phosphate-buffered saline (PBS) solution without sunlight irradiation [10, 28]. This is quite worrying because PBS mimics human organism extracellular fluid and thus this mean that this organic UV filter could be cytotoxic reaching extracellular fluid. Another study assessing oestrogenic activity of OD-PABA revealed that it presents oestrogenic activity on MCF-7 cells *in vitro* leading to their proliferation [29].

Avobenzene (AVB) was revealed to be one of the most photoallergenic UV filters [17, 24]. Actually, AVB is highly photolabile photodegrading to benzyls and arylglyoxals [10, 20]. The latter compound is a strong skin sensitizer, and thus photocontact allergy to this UV filter may be due to the formation of arylglyoxals in contact with the skin [20]. AVB photoinstability lead to a 60% loose of its photoprotective properties after sun exposure [10, 30]. Moreover, AVB can affect the stability of others organic UV filters it is in presence with [31]. However, this chemical compound can be stabilized notably with octocrylene, another organic UV filter, to avoid its photoinstability [21, 32].

Octocrylene (OC) was also shown to be one of the most photoallergenic organic UV filters [17]. However, OC seems to maintain high UV filter abilities after being irradiated compared to others organic UV filters [21]. In 2006, Hanson *et al.* demonstrated the ability of OC to generate ROS in human living epidermis cell layers after UV exposure [33]. Other organic UV filters such as benzophenone compounds, organic camphor derivatives, octyl methoxycinnamate and salicylate, have already been reported to penetrate through human SC [34–39] due to their relative low molecular weight and their lipophilic character permitting them to pass through intercellular spaces of SC cells [40]. Given the structural similarity of these organic UV filters, OC is also susceptible to penetrate human SC. Consequently, OC could generate ROS in human epidermis nucleated keratinocytes cytoplasm after UV exposure, as it was observed using two-photon fluorescence microscopy [33]. However, in this experiment, OC was incorporated into oil in water emulsions that are susceptible to enhance its penetration into the skin. Actual sunscreen formulations are elaborated without seriously considering their ability to enhance organic UV filter penetration into the skin. Given that sunscreen formulations are applied on a large skin area for a long period of time, a constant and high input of organic UV filters into skin viable cell layers and into systemic circulation might be assured. Moreover, it was showed that OC produces ROS in phosphate-buffered saline (PBS) solution without sunlight irradiation [10, 28].

Different chemical types of benzophenone compounds from benzophenone-1 (Bp-1) to benzophenone-12 (Bp-12) are used as organic UV filters. Bp-3, also known as oxybenzone, is largely incorporated into sunscreens even if it was showed to have the highest incidence of photoallergic contact dermatitis [17, 41]. In 1997 and then in 2002, studies revealed that Bp-3 can be detected

in urine after sunscreen topical application on human volunteers [34, 35, 39]. It appeared that between 1 and 2% of Bp-3 total amount applied onto the skin was recovered into human volunteer urines. Bp-3 has also been detected in human plasma after 4 days of whole-body topical application [35]. Concentrations used in this study were 10%, the maximum allowed in the European Union, whereas maximum Bp-3 concentration approved in the United States is 6% [35]. Bp-3 has also been detected in human breast milk after topical application [39, 42]. Tape stripping experiments also suggested that Bp-3 penetrates into human epidermis [34, 38, 39]. This ability could be due to its low molecular weight and lipophilic character permitting it to pass through intercellular spaces of SC cells [40]. In this experiment, Bp-3 was incorporated in oil in water emulsions susceptible to enhance organic UV filter penetration into the skin. In 2006, a study demonstrated Bp-3 ability to generate ROS in human living epidermis keratinocytes cytoplasm using two-photon fluorescence microscopy [33].

Given that sunscreen formulations are applied on a large skin area for a long period of time, a constant and high input of organic UV filters into skin viable cell layers and into systemic circulation are permitted. In 2007, Kasichayanula *et al.* demonstrated that Bp-3 penetrates porcine skin reaching blood circulation and being excreted in urine [43]. According to data observed in these different studies, it is relevant to wonder if benzophenone compounds have the possibility, reaching systemic blood circulation, to act on others organism tissues and cells. Another study assessed oestrogenic activity of three commonly used benzophenone derivative organic UV filters: Bp-1, Bp-2 and Bp-3. It appeared that all of them presented oestrogenic activity on MCF-7 cells (human tumour mammary cells) *in vitro* leading to their proliferation [29]. Oestrogenic activity of these organic UV filters was also evaluated *in vivo* using uterotrophic assays on rat. Data revealed that Bp-1, Bp-2 and Bp-3 significantly increase uterine weight in immature rat demonstrating their strong oestrogenic activity *in vivo*. Another study reporting *in vitro* Bp-3 increase effect on MCF-7 cells proliferation also noted a dose-dependent increase in immature Long-Evans rat uterine weight when fed with Bp-3 [44]. In 2005, Morohoshi *et al.* published ERs competitive binding assays results carried out using 37 commonly used organic UV filters [45]. Data confirmed benzophenone derivatives oestrogenic activity. A study revealed that Bp-4 seems to be more photoallergenic, as it is combined with others organic compounds, including Bp-3 [24].

Organic camphor derivatives, such as 3-benzilidene camphor (3-BC) or 4-methylbenzilidene camphor (4-MBC), are largely used in cosmetic industries for their ability to protect the skin against UV rays. A recent study showed an important skin permeation concerning both of these chemicals using porcine skin model [46]. Skin permeation of these compounds permits them to reach blood vessels localized in deeper skin cell layers and thus systemic circulation. After *in vitro* identification of 4-MBC oestrogenic activity in rat [36], this activity was also revealed *in vivo* in mammals [47, 48]. 4-MBC binds competitively to oestrogen receptors (ERs) and initiates their transactivation [48, 49]. In 2005, a study carried out *in vivo* in rat model revealed that 4-MBC ingestion changes oestrogen-regulated genes expression in uterus [50]. Moreover, it showed that 4-MBC acts as a partial oestrogenic receptor agonist *in vitro* on MCF-7 cells and *in vivo* on immature rat uterus. Other studies assessing oestrogenic activity of 3-BC and 4-MBC revealed that both presented oestrogenic activity on MCF-7 cells *in vitro* leading to their proliferation [29, 44]. Globally, these data demonstrated that 4-MBC exposure at the minimal dose of 0.7 mg kg⁻¹,

during early development and postnatal life can lead to significant changes in the expression of ERs nuclear receptor coregulators and oestrogen target genes in rat uterus at mRNA and protein expression level. In this study, 4-MBC was ingested by rat, but this can happen to human sunscreen consumers notably using lipstick sunscreens, and even with classical sunscreens. Oestrogenic activity of these organic UV filters was also evaluated *in vivo* using uterotrophic assays on rat. Data revealed that 4-MBC significantly increase uterine weight in immature rat demonstrating their strong oestrogenic activity *in vivo*. Moreover, data showed that 4-MBC pre and postnatal exposure affects hypothalamo-pituitary-gonadal system development in rat male and female.

Octyl methoxycinnamate (OMC), also known as octinoxate, produces ROS in phosphate-buffered saline (PBS) solution without sunlight irradiation [10, 28]. Another *in vitro* study, carried out on porcine skin in 2006 showed that about 9% from the applied dose of OMC penetrates the skin with a flux of $27 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ when hydroethanolic solution is used as receiver medium [37]. Tape stripping experiments also suggested that OMC penetrates into human epidermis [38, 39].

In 2006, Hanson *et al.* demonstrated the ability of OMC to generate ROS in human living epidermis cell layers after UV exposure [33]. OMC has previously been reported to penetrate through human SC [34, 38] due to its relative low molecular weight and its lipophilic character [40]. Consequently, OMC could generate ROS in the cytoplasm of epidermis-nucleated keratinocytes, as it was observed using two-photon fluorescence microscopy. OMC has been detected in human plasma and urine after 4 days of whole-body topical application [35]. OMC concentration used in this study was 10%, the maximum allowed in European Union, whereas the maximum approved concentration of this organic UV filter in United States is 7.5% [35]. OMC has also been demonstrated to trigger MCF-7 cell proliferation *in vitro* [29, 44]. This study also noted a dose-dependent increase in immature Long-Evans rat uterine weight when fed with OMC. However, in 2005, Morohoshi *et al.* published controversial data. ERs competitive binding assays were carried out on 37 commonly used organic UV filters notably OMC. *In vitro* and *in vivo* assays showed that OMC has no agonistic effect on oestrogenic receptors [45]. However, other cinnamate derivative UV filters have been reported to be poorly photoallergenic [51, 52]. Another study revealed that OMC is not photostable losing 60% of its photoprotective properties after sun exposure [10, 30]. In 2003, Yener *et al.* studied OMC entrapment into solid lipid microspheres (SLM) [53]. It appeared that OMC does not penetrate rat skin SC when entrapped into SLM whereas, when it is spread into oleaginous cream, it can freely penetrate in it. Moreover, when OMC is entrapped into SLM, it does not decompose into derivative compounds contrary to when it is dispersed into oleaginous cream, oil in water emulsion or carbopol gel. More important, entrapped into SLM, OMC keeps his UV filter effectiveness. Thus, organic UV filter vehicles in sunscreens are very important to prevent their UV dependant decomposition leading to ROS formation and to the lost of their effectiveness.

Octyl-triazone organic UV filter has been reported as a strong sensitizer causing allergic contact dermatitis in children and photoallergic contact dermatitis in adults [54, 55].

Salicylate compounds are rarely associated with allergic and photoallergic contact dermatitis or with any oestrogenic activity and are thus often incorporated into sunscreens [45, 51, 52]. However, a recent study reported the development of allergic contact dermatitis to octyl-salicylate [56]. Tape stripping experiments also suggested that it penetrates into human epidermis [38, 39].

Another study assessing homosalate oestrogenic activity revealed that it enhances MCF-7 cell proliferation *in vitro* [29].

Previous *in vitro* experiments concerning 2-phenyl-benzimidazole-5-sulfonic acid (PBSA) organic UV filters showed that it induces ROS and DNA thymine dimer formation in aqueous solution under sunlight irradiation [26, 27].

Some organic UV filter combinations are not suitable to elaborate sunscreens because they can react with each other leading to derivative chemical compound formation and also to their UV filter abilities decrease when they are subjected to sunlight or artificial UV radiations. AVB can affect the stability of other organic UV filters it is in presence with [31]. However, this chemical compound can be stabilized notably with OC to avoid its photoinstability [21, 32]. In 2006, Gaspar *et al.* studied photostability of some organic UV filter combinations [21]. The most photostable combination revealed was OMC, Bp-3 and OC that do not lead to chemical derivative formation. However, it appeared that OMC in presence of AVB lead to photoproduct formation, as they react each other. OC seems to be more effective than 4-MBC to avoid this chemical reaction occurring between OMC and AVB. Thus, combining OMC, BP-3 and OC or OC, OMC and AVB could be less deleterious than combining 4-MBC, OMC and AVB in sunscreen formulations. Given that some organic UV filter combinations are not suitable to elaborate sunscreens, a list of permitted combinations of approved organic UV filters has been established. This list also gives maximal concentrations that can be used for each chemical compound [7].

Organic UV filter vehicles in sunscreens are very important to prevent their UV dependant decomposition leading to ROS formation and the lost of their effectiveness, as shown by Yener *et al.* study focusing on OMC entrapment into SLM [53]. In 2006, a study showed that grafting UV filter chemical compounds on a jojoba wax backbone permit to avoid compound absorption into nude mice skin [57]. Moreover, this strategy tends to enhance UV filter ability to protect the skin against UV damages.

Organic UV filter toxicity studies are numerous. However, considerable variations concerning allergen testing methods, result interpretations and data comparison difficulties have to be taken into account. This lack of standardization in methodology was summarized in a study highlighting differences in irradiation wavelengths, UVA dosage, duration of test allergen application and post irradiation reading times [18]. Controversial data observed concerning organic UV filter oestrogenic activity assessment could be due to differences in organic UV filter concentrations used for the assays and also to experiment conditions that were not similar. Thus, other studies on organic UV filter oestrogenic activity are needed as well as standardized study methods. In the same way, studies concerning organic UV filter penetration into the skin are very controversial. However, these studies were not carried out in same conditions using different experiments, and models.

However, nowadays, formulators start looking for more elaborated sunscreen formulations preventing UV filter penetration across skin SC.

Inorganic UV filter toxicity

The two most common inorganic UV filters used in sunscreen formulations are zinc oxide (ZnO) and titanium dioxide (TiO₂) particles. They are traditionally used in sunscreens because of their ability to strongly filter UV rays. TiO₂ and ZnO bulk form leads to thick unaesthetic formulations leaving unpleasant white marks onto the skin after application. To avoid this nuisance, sunscreens

formulators use nanosized forms of these compounds. Moreover, these forms reflect more efficiently UV light. Actually, ZnO and TiO₂ nanoparticles permit to develop transparent, fluid and easy-spreading sunscreen formulations. By definition, nanoparticles are particles sizing less than 100 nm. Despite of poor knowledge about biological effects of nanoparticles, we can find them in most of sunscreens. For example, in Australia, it has been estimated that 70% of sunscreens contain TiO₂ nanoparticles and 30% of them contain ZnO nanoparticles [58, 59].

Potential toxicity concern about nanoparticles in sunscreens is due to their small size, their ability to evade immunologic defence mechanisms, to form complexes with proteins and to induce ROS formation. Actually, particle toxicity is determined by its surface reactivity. Given their structure, nanoparticles exhibit more important reactivity surface area than larger particles and thus are more likely to generate ROS under UV light catalysing reaction.

Concerns about ZnO and TiO₂ nanoparticle toxicity focus mainly on ROS generation because both of these compounds are well-known photocatalysts used notably to generate electricity in photovoltaic cells. When these compounds are exposed to UV light, they emit electrons inducing free radicals, peroxides and others ROS generation [60]. Particle ability to penetrate SC is defined by its molecular size. Intercellular spaces between SC cells measure around 100 nm. These spaces can be modified and notably widened by various topical products [61, 62] or after a stress like UV ray exposition.

Several studies have already reported ZnO nanoparticle cytotoxic effects on different mammalian cell lines, such as on human mesothelioma and rodent fibroblasts [63], neuroblastoma cells [64], vascular endothelial cells [65], human neural cells [66], human

alveolar epithelial cells [67], and also neural stem cells [68]. Skin barrier represents the first level of exposure to ZnO nanoparticle toxicity after sunscreen use. Toxicity of these particles can occur at two different levels: on cells constituting skin barrier and in a second time on tissues reached from systemic circulation. In the last years, some studies concerning ZnO nanoparticle toxicity on human dermal fibroblasts have been published. It appeared that ZnO nanoparticles ($\theta \approx 20$ nm) could trigger human dermal fibroblast apoptosis, through p53-p38, pathway even at the very low concentration of $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Fig. 1) [69]. P38 MAP kinases are a protein family that is activated by genotoxic stresses. When activated, they enhance p53 activity by phosphorylation and leads to cell cycle arrest or apoptosis. It has also recently been tested bulk ($\theta \approx 550$ nm) and nanoparticulate ZnO ($\theta \approx 60$ nm) phototoxicity in *Caenorhabditis elegans* nematode [70]. Results showed that nanosized and bulk ZnO phototoxicity are significantly enhanced under natural sunlight and also that ZnO nanoparticles seem to be more likely to induce phototoxicity than bulk ZnO particles.

There is a way to reduce undesirable ZnO particle photoreactivity in sunscreens. These particles can be modified notably coating them with organic (such as alkoxy titanates, silanes and methyl polysiloxanes) or inorganic (such as alumina, silica and zirconia) elements and doping them with manganese ions [71, 72]. Particle coat forms hydrated oxides, which can capture hydroxyl radicals and thus reduce phototoxicity minimizing or eliminating potential reactivity of photoactivated ZnO particles by quenching and/or reducing ROS generated before they interact with skin components.

In 2011, Cao *et al.* demonstrated that capping ZnO nanoparticles using organically modified silica permits to avoid their photocatalytic activity [73].

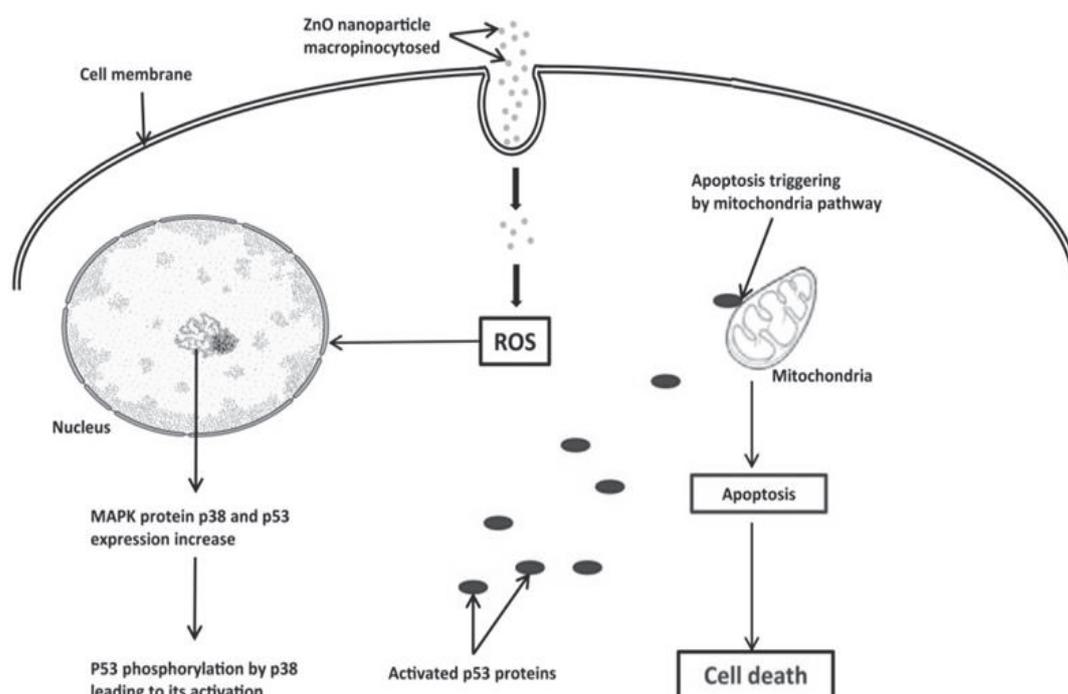


Figure 1 Schematic representation of a possible toxicity model of ZnO nanoparticles on human epidermal cells according to Meyer *et al.* study [69]. ZnO nanoparticles are macropinocytosed by skin cell. They induce ROS formation in cell cytoplasm. Oxidative stress leads to MAPK p38 and p53 expression increase. P38 MAPK phosphorylates p53 triggering its activation. p53 MAPK activated trigger mitochondrial pathway apoptosis of skin cell.

The extent ZnO cutaneous toxicity is related to nanoparticle transport within the *stratum corneum* then into basal cells.

Nowadays, studies concerning ZnO nanoparticle ability to cross normal or altered skin barrier tend to demonstrate that this kind of particles cannot reach living skin cells [6, 74–77].

In 2009, Filipe *et al.* studied ZnO nanoparticle penetration into normal and psoriatic human skin *in vivo* [76]. Data revealed that following a 2-h application period of ZnO nanoparticles contained in three marketed sunscreens on intact human skin, these particles were only detectable in SC. There were no ZnO nanoparticles in deeper skin layers even after a 48-h exposure of sunscreens under occlusion. Thus, this study suggests that ZnO nanoparticles cannot reach viable skin tissues. It was also observed that hair follicles were preferential accumulation sites for these ZnO nanoparticles. However, this study was carried out using only three different hydrophobic marketed sunscreen formulations containing coated ZnO nanoparticles and thus results cannot guarantee the same observations using others marketed sunscreens. Some studies reported the lack of nanoparticle penetration in nonfollicular porcine skin [75] and even on human reconstructed epidermis model [78–81].

Another studies confirmed ZnO nanoparticle harmlessness towards epidermal cells [76, 82].

However, UV radiations can weaken skin barrier by disorganizing intercellular lipid lamellae [83, 84]. Early study demonstrated that tight junction protein expression was disrupted following UVB exposure thus facilitating nanoparticle penetration [85, 86].

It was showed in hairless mice that skin UV-ray exposure led to prostaglandin synthesis [87, 88]. Prostaglandins target E-cadherin receptors and thus prostaglandin synthesis increase led to E-cadherin receptors significant decrease [85]. Cadherin proteins are expressed at cell surface to ensure cell liaisons notably skin cell tight junctions. *In vitro* studies carried out on hairless mouse epidermis and keratinocytes demonstrated that after UV ray exposure, there was an increase in cyclo-oxygenase 2 (COX-2) protein expression. COX-2 protein expression is induced in the epidermis in response to injuries, such as those triggered by UV radiations. This protein is responsible for arachidonic acid conversion into prostaglandin. Thus, there was an increase in prostaglandin proteins expression and notably of Prostaglandin E2 (PGE2) protein. This protein activated growth stimulatory prostaglandin receptors (EP2) that led to reaction cascade in cell triggering E-cadherin protein expression decrease on cell surface. Consequently, there was a disorganization of cell tight junctions and thus of skin cell adhesions [85, 87, 88]. Skin cell adhesion disorganization after UV ray exposure could permit ZnO nanoparticles to penetrate skin layers and reach living cells. UV ray energy applied in these experiments is not higher than the one from sun rays. Data showed that ZnO nanoparticles were able to disturb skin cell functions through direct contact when skin barrier was disrupted or through hair follicles reaching viable epidermis [89–91].

There is no evidence about ZnO nanoparticle permeation across the skin. Until now, studies tend to demonstrate that this kind of particles cannot cross SC skin layer. Thus, even if it was showed that ZnO nanoparticles trigger deleterious damages on different cell lines notably on human skin fibroblasts, it is not really worrying given that it has not been proved that they can reach living cells.

Skin barrier represent the first level of exposure to TiO₂ nanoparticle toxicity after sunscreen use. In actual commercial sunscreens, TiO₂ nanoparticle concentrations are between 3% and 15%. Recommended quantity of sunscreen that must be applied to protect

the skin is 2 mg cm⁻². Thus, an adult should apply 31.25 mg of sunscreen to protect his skin and would be exposed up to 938–4688 mg of TiO₂ nanoparticles. A recent study showed cytotoxic and genotoxic effects of TiO₂ nanoparticles sizing (50 < Ø < 125 nm) on human skin cells *in vitro* [92]. Maximal TiO₂ concentration tested was of 0.080 mg mL⁻¹, which is far less than concentrations used in sunscreens. TiO₂ nanoparticle mechanism of toxicity resided in their ability to induce ROS generation due to their photounstable character leading to DNA epidermal cell damages (Fig. 2). Wamer *et al.* have already reported cytotoxicity of 450 nm TiO₂ particles on human skin fibroblasts after their photoactivation through UVA irradiation [93]. Human skin fibroblast treatment with microcrystalline TiO₂ particles followed by irradiation with UVA resulted in cytotoxicity with human skin fibroblasts significant reduction. Data also revealed that RNA isolated from treated fibroblasts contained high levels of photo oxidation products namely hydroxylated guanine bases. In 2007, Rampaul *et al.* assessed UVA dependant cytotoxicity of various TiO₂ nanoparticles (11 < Ø < 30 nm) directly extracted from marketed sunscreens on a human skin cell line [94]. Some of these TiO₂ nanoparticles induced real phototoxic activity on human skin cells after UVA exposure. This study clearly demonstrated the ability of TiO₂ nanoparticles found in commercialized sunscreens to cause skin cell damages. This could lead to DNA skin cell mutation apparition that will be passed to daughter cells and thus to tumour development.

But, it seems that TiO₂ particle cytotoxicity depends on particle size and crystal form. Anatase TiO₂ particle form sizing between 15 and 120 nm gave more OH radicals *in vitro* than rutile and amorphous forms sizing between 17 and 400 nm after UVA irradiation [95]. Considering that photocatalytic activity of TiO₂ anatase form is approximately 1.5 times higher than the rutile one, these results are logical [96]. This is quite reassuring considering that TiO₂ crystalline rutile form is used in sunscreens [97].

Another study showed that TiO₂ particles themselves were cytotoxic on human bronchial epithelial cells without being activated by UVA radiations [98]. Data demonstrated that cell treatment with 10 µg mL⁻¹ of anatase TiO₂ nanoparticles (10 < Ø < 20 nm) led to oxidative stress and thus to DNA damages without UVA irradiation, whereas anatase and rutile TiO₂ particles (≥ 200 nm) did not lead to such cytotoxicity. In conclusion, the smaller TiO₂ nanoparticles, the higher potency of oxidative stress in absence of photoactivation. ROS formed by UV-exposed TiO₂ particles are able to damage proteins, lipids and DNA they are in contact with. Applying sunscreen formulation containing TiO₂ nanoparticles, skin barrier and notably nucleated cell constituting it, will be the first line where deleterious damages will happen.

To reduce their photoreactivity, TiO₂ particles can be coated with organic or inorganic elements doped with manganese ions [71, 72]. A recent study with coated TiO₂ particles photocatalytically inactive, but still providing protection against UV damaging sunlight radiations showed minimal DNA damages on yield cultures under UV illumination [99]. Despite this process, Dunford *et al.* showed that some TiO₂ particle coatings did not permit to prevent phototoxicity leading to plasmid DNA and human skin fibroblast damages [100]. It has also been demonstrated that some TiO₂ particle coatings such as TiO₂/Al₂O₃ or TiO₂/SiO₂ enhanced photoreactivity [101]. These results were confirmed by Rampaul *et al.* in 2007 showing that some coated inorganic UV filters incorporated into actual sunscreens, such as a mixed anatase and rutile crystal form of TiO₂ with a dimethicone or organosilane coating,

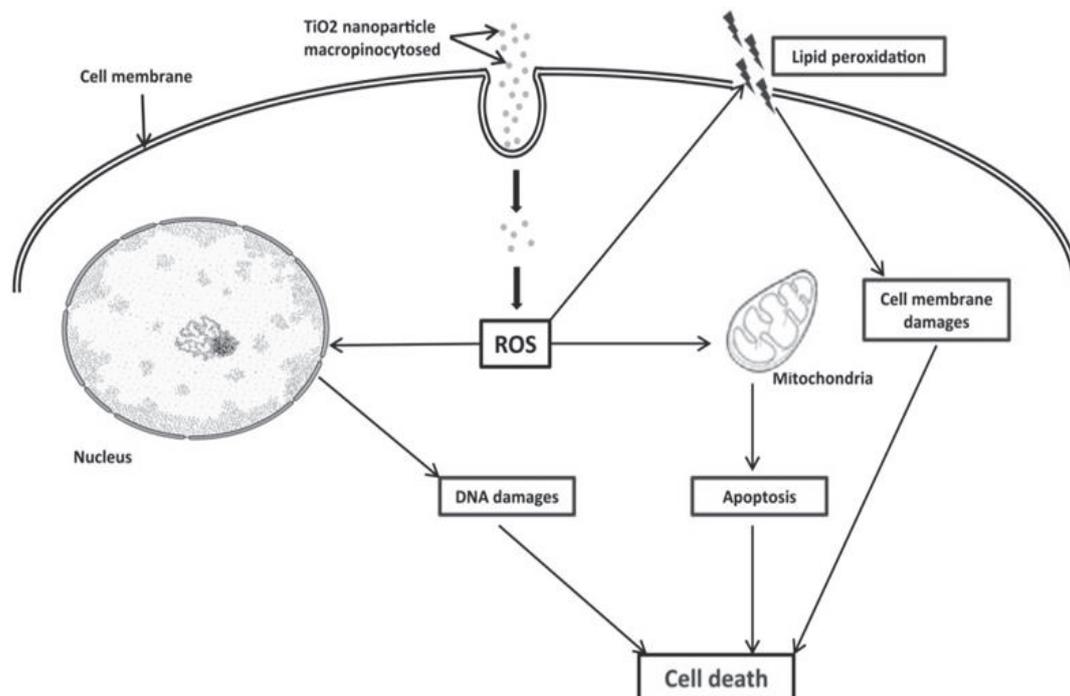


Figure 2 Schematic representation of a possible toxicity model of TiO₂ nanoparticles on human epidermal cells according to Shukla *et al.*, Rampaul *et al.* and Tiano *et al.* studies [93, 95, 96]. TiO₂ nanoparticles are macropinocytosed by skin cell. They induce ROS formation in cell cytoplasm. Oxidative stress leads to DNA damages and membrane lipid peroxidation that enhance cell apoptosis.

was still destructive leading to photocatalytic human skin and others, animal epithelium DNA cell damages triggering their apoptosis, whereas others particle types, such as manganese doped or alumina-coated rutile TiO₂ particles protected the skin without being phototoxic [94]. More recently, Tiano *et al.* demonstrated that TiO₂ particle anatase form was cytotoxic on human skin fibroblasts either coated or uncoated [95]. Moreover, this cytotoxicity was more aggressive after fibroblast exposition to UVA radiations. However, several previous studies demonstrated that TiO₂ particle anatase form was also cytotoxic without fibroblast exposition to UVA radiations [98, 102]. Tiano *et al.* concluded that coating treatments, including organic compounds, were improper for sunscreen elaboration. Actually, this kind of coating enhanced TiO₂ particle phototoxicity. However, it appeared that alumina/dimethicone, alumina/manganese and alumina hydroxide coatings were well adapted to sunscreens preventing TiO₂ particle phototoxicity. Importantly, it appeared that some modified TiO₂ particles specially developed and marketed for sun care and skin care still exhibited photocatalytic activity [95].

All these studies concerning TiO₂ nanoparticle toxicity on human skin cells would be relevant only if these particles could cross SC barrier. It is then interesting to focus on studies about TiO₂ nanoparticle absorption through skin barrier. In 2009, an *in vivo* study made on porcine skin demonstrated that TiO₂ nanoparticles ($4 < \text{Ø} < 60$ nm) could penetrate skin SC [103]. This study revealed that TiO₂ nanoparticle penetration was size and time dependant. Further investigations carried out on hairless mice revealed that after 60 consecutive days of daily TiO₂ nanoparticle application at 8 mg cm^{-2} under dorsal skin, particles crossed the skin to be entrapped notably in liver, spleen and lung using systemic circulation. However, it is important to precise that mice skin

is a half thinner than human skin. For percutaneous penetration studies, it is judicious to choose pig skin that show many parallels to human skin [104]. In 2004, Menzel *et al.* tended to show ultra-fine TiO₂ nanoparticle ability to cross skin barrier [105]. In this study, penetration tests were carried out on pig skin model using TiO₂ nanoparticles (45–150 nm long and 17–35 nm wide) contained into four different marketed sunscreens. Results revealed that TiO₂ nanoparticles mainly concentrated at skin surface and in skin SC. TiO₂ particles were also found in skin *stratum granulosum*, but not in *stratum spinosum*. Thus, this study showed that TiO₂ particles present in some marketed sunscreen formulations were able to penetrate SC intercellular spaces reaching *stratum granulosum* living skin tissue layers.

In 2008, Mortensen *et al.* studied quantum dots ($\text{Ø} = 30$ nm) penetration across mouse skin beforehand exposed to UV radiations [86]. Results showed quantum dots penetration into viable epidermis and dermis when skin is injured notably by UV rays. This study concludes saying that TiO₂ nanoparticles could also penetrate skin barrier. However, they did not use TiO₂ quantum dots in these experiments. Thus, it is not possible to extend results obtained to TiO₂ nanoparticles.

Some studies tend to demonstrate TiO₂ nanoparticle ability to cross skin barrier and reach systemic blood circulation. It is then relevant to wonder if these particles exhibit any toxicity against erythrocytes that are blood dominant cells (99%) and on others blood circulating cells. In 2008, Li *et al.* assessed TiO₂ nanoparticle toxicity on rabbit erythrocytes [106]. It appeared that TiO₂ nanoparticles significantly increased erythrocyte sedimentation and agglutination damaging their membranes in a dose-dependent way. Moreover, photonic microscopy analysis of erythrocytes treated with TiO₂ microparticles and nanoparticles revealed erythrocyte abnormal

shape. Results also exhibited that in presence of TiO₂ nanoparticles, lipid peroxidation increased. Erythrocytes are incapable to produce SOD and catalase that are cell enzymes taking charge of generated ROS. Thus, this kind of cells is particularly vulnerable to extraneous toxicants and their cell membrane could be easily damaged during lipid peroxidation occurring in presence of TiO₂ particles.

It also showed genotoxicity and cytotoxicity of TiO₂ nano (90 < Ø < 110 nm) and bulk particles due to their capacity to generate ROS on human blood circulating lymphocytes leading to deleterious damages in their DNA [107].

These results are very controversial. Actually, some studies demonstrated that this kind of insoluble nanoparticles cannot cross normal or even altered human skin [6, 74–77].

Nohynek *et al.* tended to demonstrate that TiO₂ nanoparticles do not penetrate healthy or altered skin. Moreover, their results tended to show that this kind of nanoparticles incorporated into sunscreens do not present any risk to human health [6, 74].

In 2007, Pinheiro *et al.* *in vivo* study reported that TiO₂ nanoparticle (contained in a commercial sunscreen formulation) permeation profile was similar in human normal skin and in human psoriatic skin [75]. However, in human normal skin, TiO₂ nanoparticles seemed to be retained at SC outermost corneocyte layers, whereas in human psoriatic skin, SC fragility seemed to facilitate TiO₂ nanoparticle penetration inside SC, although they did not reach living cell layers. Thus, results presented in this study tended to demonstrate that TiO₂ nanoparticles do not penetrate deeper into altered human skin.

In 2009, Filipe *et al.* also studied TiO₂ nanoparticle penetration into human normal skin and human psoriatic skin *in vivo* [76]. It was observed the same results like for ZnO nanoparticles. There was not TiO₂ nanoparticles in deeper skin layers even after exposure to sunscreen under occlusion. Hair follicles were also showed to be preferential accumulation sites for these particles. Some studies reported the lack of nanoparticle penetration in nonfollicular porcine skin [74] and even on human reconstructed epidermis model [79–81, 90].

Gopee *et al.* showed that TiO₂ nanoparticle subcutaneous administration did not produce toxicity or unexpected body distribution [108]. Theogaraj *et al.* showed that TiO₂ nano and micro particles were safety, no causing cytotoxicity, genotoxicity or phototoxicity on Chinese Ovarian Cell (CHO) cultures [109].

However, UV radiation effects on skin barrier [83, 84] organization have to be taking into account considering that tight junctions can be altered permitting TiO₂ nanoparticles to penetrate easily into living skin cell layers [80, 84, 85, 90–92].

Mixed ZnO/TiO₂ powders were showed to be destructive on skin cells. This is not very surprising given that ZnO is a photocatalyst [110] able to enhance TiO₂ photocatalytic activity [111], but it is quite worrying given that many marketed sunscreens contain both ZnO and TiO₂ nanoparticles.

As it was observed for ZnO nanoparticles, there is no evidence about TiO₂ nanoparticle permeation across the skin.

Considering all these studies, ZnO and TiO₂ nanoparticles seem to be susceptible to enhance deleterious damages on living cells. Crossing this biological barrier, these particles could reach systemic blood circulation with cytotoxic effects on blood circulating cells before to be entrapped into vital organs. ZnO and TiO₂ nanoparticle damage cell mechanisms rely on their photoinstability leading to ROS generations that are highly cytotoxic. However, most of studies concerning these nanoparticles tend to demonstrate that they cannot cross skin barrier. Thus, sunscreens

containing TiO₂ and ZnO nanoparticles seem to pose no risk to human health.

The lack of standardized methods to study ZnO and TiO₂ nanoparticle cytotoxicity made these studies controversial. In the present time, there are no definite agreements in the literature on whether these nanoparticles, regardless their size, present in sunscreens penetrate skin barrier entering in the epidermis or not. It is then not possible to certify ZnO and TiO₂ toxicity in sunscreens.

Inorganic UV filter association with organic UV filters

In 2010, Migdal *et al.* focused their study on the effect of classical and modified TiO₂ nanoparticles on human Langerhans cells playing an essential role in immune response [112]. Data showed that classical TiO₂ nanoparticles as well as PABA coated ones did not affect skin Langerhans cell viability. Even if it was showed that both the kinds of TiO₂ nanoparticles were internalized into skin Langerhans cells through macropinocytosis, they stayed in cell cytoplasm vesicles before to be quickly released confirming their lack of cytotoxicity. Moreover, these nanoparticles did not induce skin Langerhans cell activation meaning the lack of inflammatory response. PABA coated TiO₂ nanoparticles did not induce ROS generation, whereas PABA organic UV filter can enhance photoallergies and induces ROS generation. Thus, TiO₂ association with PABA avoids ROS-mediated toxicity of PABA.

Discussion

Dermatologists highly warn their patients against UV ray skin damages. They strongly suggest sunscreen use to avoid UV ray side effects and skin cancer development. However, as their apparition in consumer life, sunscreens are the subject of many studies tending to call their safety into questions. Some of them bring evidence of their deleterious effects notably in skin cells and others refute this hypothesis. Organic UV filters are chemical compounds known to be allergenic and to cross skin barrier due to their low molecular weight and their lipophilic character. Organic UV filters are thus more expected to induce toxicity than inorganic ones. Most of studies agreed with organic UV filter photoinstability leading to deleterious damages on skin cells through ROS formation. However, their potential oestrogenic characters as well as their entrapment into vital organs are still very controversial. Concerning inorganic UV filters, their ability to cross skin barrier is still under scientific debate. Then, even if several studies showed cytotoxic effect of ZnO and TiO₂ particles, it is not very worrying given that at this time, there is not uncontested evidence of their ability to cross SC to exercise their cytotoxicity on living cells.

These studies concerning UV filter toxicity used different methods and different models. Then, nowadays, it is not possible to claim that UV filters currently incorporated into sunscreens are toxic or safe. Actually, improved studies using standardized methods are needed to be sure of sunscreen safety. However, sunscreen formulators should concentrate on UV filter carriers in formulations because some of them are able to prevent UV filter penetration across skin SC, whereas others can enhance this effect.

Then, it is not necessary to alarm consumers about sunscreen toxicity at the risk of seeing them boycott, these protective products leading to skin cancer rate increase. If UV filter safety is still under

debate, UV noxiousness does not need to be proved anymore. Every year, 66 000 deaths of melanomas are registered in the world and this number does not need to be increased because of false rumours about sunscreen use safety.

Conclusion

There is not uncontested evidence on UV filter toxicity. Other studies using standardized methods and acceptable models are needed before claiming sunscreen toxicity. Sunscreen phobia may

lead to a decrease in sunscreen use meaning higher exposure to UV radiations and thus increasing rates of melanoma and other skin cancers. Formulators should pay more attention to UV filter vehicles incorporated into sunscreens to avoid the possible ability that they could have to cross skin barrier.

Acknowledgement

We thank Kurbiel SAS cosmetic company (France) for their support during the redaction of this study.

References

- Sambandan, D.R. and Ratner, D. Sunscreens: an overview and update. *J. Am. Acad. Dermatol.* **64**, 748–758 (2011).
- Villalobos-Hernandez, J.R. and Müller-Goymann, C.C. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: the synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale. *Int. J. Pharm.* **322**, 161–170 (2006).
- Mader, K., Wissing, S.A. and Müller, R.H. Solid lipid nanoparticles (SLN) – a novel carrier for UV blockers. *Pharm. Unserer Zeit* **10**, 783–786 (2001).
- Wong, T. and Orton, D. Sunscreen allergy and its investigation. *Clinics Dermatol.* **29**, 306–310 (2011).
- Anderson, M.W., Hewitt, J.P. and Spruce, S.R. Broad spectrum physical sunscreens: titanium dioxide and zinc oxide. In: *Sunscreens* (Marcel and Dekker eds.), pp. 353–398. Cosmetic science and Technology Series, New York (1997).
- Nohynek, G.J., Lademann, J., Ribaud, C. and Roberts, M.S. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety *Crit. Rev. Toxicol.* **37**, 251–277 (2007).
- Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use*, Final monograph. Federal register 64 27666, US Food and Drug Administration, Rockville, MD, (2000). Available from <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr990521.html>.
- Salinaro, A., Emeline, A.V., Zhao, J., Hidaka, H., Ryabchuk, V.K. and Serpone, N. Terminology, relative photonic efficiencies and quantum yields in heterogeneous photocatalysis. Part I: suggested protocol. *Pure Appl. Chem.* **71**, 321–335 (1999).
- Collaris, E.J. and Frank, J. Photoallergic contact dermatitis caused by ultraviolet filters in different sunscreens. *Int. J. Dermatol.* **47**, 35–37 (2008).
- Bouillon, C. Recent advances in sun protection. *J. Dermatol. Sci.* **23**, 57–61 (2000).
- Gasparro, F.P., Mitchnick, M. and Nash, J.F. A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem. Photobiol.* **68**, 243–256 (1998).
- Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P.A. et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicol. Sci.* **92**, 174–185 (2006).
- Sclafani, A. and Herrmann, J.M. Comparison of the photoelectronic and photocatalytic activities of various anatase and rutile forms of titania in pure liquid organic phases and in aqueous solutions. *J. Phys. Chem.* **100**, 13655–13661 (1996).
- Therapeutic Good Administration. *Australian Regulatory Guidelines for OTC Medicines (ARGOM)* (2009). Available from: <http://www.tga.gov.au/docs/html/argom>.
- Council Directive of the EEC (76/768/EEC). *List of UV Filters which Cosmetic Products may Contain. Annex VII*, pp. 119–123 (2009). Available at: <http://www.emergo-group.com/files/Cosmetics%20Directive%2076-768-EEC.pdf>.
- Maier, H., Schaubberger, G., Brunnhöfer, K. and Hönigsmann, H. Change of Ultraviolet Absorbance of Sunscreens by Exposure to Solar-Simulated Radiation. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 256–262 (2001).
- Bryden, A.M., Moseley, H., Ibbotson, S.H. et al. Photopatch testing of 1155 patients: results of the UK multicentre photopatch study group. *Br. J. Dermatol.* **155**, 737–747 (2006).
- Kerr, A. and Ferguson, J. Photoallergic contact dermatitis. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **26**, 56–65 (2010).
- Victor, F.C., Cohen, D.E. and Soter, N.A. A 20 year analysis of previous and emerging allergens that elicit photoallergic contact dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **62**, 605–610 (2010).
- Karlsson, I., Hillerström, L., Stenfeldt, A.L., Mårtensson, J. and Börje, A. Photodegradation of dibenzoylmethanes: potential cause of photocontact allergy to sunscreens. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1881–1892 (2009).
- Gaspar, L.R. and Campos, P.M.B.G.M. Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen. *Int. J. Pharm.* **307**, 123–128 (2005).
- Vanquerp, V., Rodriguez, C., Coiffard, C., Coiffard, L.J.M. and De Roeck-Holtzhauser, Y. High-performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. *J. Chromatogr.* **832**, 273–277 (1999).
- Diffey, B.L., Stokes, R.P., Forestier, S., Mazilier, C. and Rougier, A. Sun care product photostability: a key parameter for a more realistic in vitro efficacy evaluation. *Eur. J. Dermatol.* **7**, 226 (1997).
- Hughes, T.M. and Stone, N.M. Benzophenone 4: an emerging allergen in cosmetics and toiletries? *Contact Dermatitis.* **56**, 153–156 (2007).
- Waters, A.J., Sandhu, D.R., Lowe, G. and Ferguson, J. Photocontact allergy to PABA in sunscreens: the need for continued vigilance. *Contact Dermatitis.* **60**, 172–173 (2009).
- Allen, J.M., Gossett, C.J. and Allen, S.K. Photochemical formation of singlet molecular oxygen in illuminated aqueous solutions of PABA. *J. Photochem. Photobiol.* **32**, 33–37 (1996).
- Inbaraj, J.J., Bilski, P. and Chignell, C.F. Photophysical and photochemical studies of 2-phenylbenzimidazole and UVB sunscreen 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid. *Photochem. Photobiol.* **75**, 107–116 (2002).
- Cantrell, A., McGarvey, D.J. and Truscott, T.G. Photochemical and photophysical properties of sunscreens. In: *Sun Protection in Man* (Giacomini, P.U. ed.), pp. 495–519. Elsevier, Amsterdam (2001).
- Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S. et al. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—an update. *Toxicology* **205**, 113–122 (2004).
- Serpone, N., Dondi, D. and Albini, A. Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and sun care products. *Inorg. Chim. Acta.* **360**, 794–802 (2006).
- Sayre, R.M., Dowdy, J.C., Gerwig, A.J., Shields, W.J. and Lloyd, R.V. Unexpected photolysis of the sunscreen octinoxate in the presence of the sunscreen avobenzone.

- Photochem. Photobiol.* **81**, 452–456 (2005).
32. Chatelain, E. and Gabard, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. *Photochem. Photobiol.* **74**, 401–406 (2001).
 33. Hanson, K.M., Gratton, E. and Bardeen, C.J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Rad. Biol. Med.* **41**, 1205–1212 (2006).
 34. Hayden, C.G.J., Roberts, M.S. and Benson, H.A.E. Systemic absorption of sunscreen after topical application. *Lancet* **350**, 863–864 (1997).
 35. Janjua, N.R., Kongshoj, B., Andersson, A.M. and Wulf, H.C. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* **22**, 456–461 (2008).
 36. Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B. and Lichtensteiger, W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Persp.* **109**, 239–244 (2001).
 37. Toutou, E. and Godin, B. Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. *Clinics Dermatol.* **26**, 375–379 (2008).
 38. Treffel, P. and Gabard, B. Skin penetration and SPF of ultraviolet filters from two vehicles. *Pharm. Res.* **13**, 770–774 (1996).
 39. Walters, K.A. and Roberts, M.S. Percutaneous absorption of sunscreens. In: *Topical Absorption of Dermatological Products* (Bronaugh, R.L. and Maibach, H.I. eds.), pp. 465–481. Marcel Dekker, New York (2002).
 40. Roberts, M.S. *The Relationship between Structure and Barrier Functions of the Skin*. Marcel Dekker Ed., New York (1998).
 41. Palm, M.D. and O'Donoghue, M.N. Update on photoprotection. *Dermatol. Ther.* **20**, 360–376 (2007).
 42. Hany, J. and Nagel, R. Detection of sunscreen agents in human breast milk. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* **91**, 341–345 (1995).
 43. Kasichayanula, S., House, J.D., Wang, T. and Gu, X. Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen Oxybenzone from topical skin application. *Toxicol. App. Pharmacol.* **223**, 187–194 (2007).
 44. Bolt, H.M., Guhe, C. and Degen, G.H. Comments on "In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens". *Environ. Health Perspect.* **109**, 358–361 (2001).
 45. Morohoshi, K., Yamamoto, H., Kamata, R., Shiraishi, F., Koda, T. and Morita, M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicol. In Vitro* **19**, 457–469 (2005).
 46. Soeborg, T., Hollesen Basse, L. and Halling-Sorensen, B. Risk assessment of topically applied products. *Toxicol.* **236**, 140–148 (2007).
 47. Tinwell, H., Lefevre, P.A., Moffat, G.J., Burns, A., Odum, J., Spurway, T.D., Orphanides, G. and Ashby, J. Confirmation of uterotrophic activity of 3 (4-methylbenzylidene) camphor in the immature rat. *Environ. Health Persp.* **110**, 533–536 (2002).
 48. Mueller, S.O., Kling, M., Firzani, P.A. et al. Activation of estrogen receptor α and ER β by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicol. Lett.* **142**, 89–101 (2003).
 49. Schreurs, R., Lauser, P., Seinen, W. and Van Den Burg, B. Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Arch. Toxicol.* **76**, 257–261 (2002).
 50. Durrer, S., Maerkel, K., Schlumpf, M. and Lichtensteiger, W. Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor. *Endocrinology* **146**, 2130–2139 (2005).
 51. Kimura, K. and Katon, T. Photoallergic contact dermatitis from the sunscreen ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Contact Dermatitis.* **32**, 304–305 (1995).
 52. Bruynzeel, D. Patch testing in adverse drug reactions. In: *Fisher's Contact Dermatitis*. (Rietschel, R.L. and Fowler, J.F. eds), 5th ed., pp. 479–494. Springer, Philadelphia (2001).
 53. Yener, G., Incegöl, T. and Yener, N. Importance of using lipid microspheres as carriers for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate. *Int. J. Pharm.* **258**, 203–207 (2003).
 54. Avenel-Audran, M., Dutartre, H., Goossens, A. et al. Octocrylene, an emerging photoallergen. *Arch. Dermatol.* **146**, 753–757 (2010).
 55. Sommer, S., Wilkinson, S.M., English, J.S., Ferguson, J. Photoallergic contact dermatitis from the sunscreen octyl-triazone. *Contact Dermatitis.* **46**, 304–305 (2002).
 56. Singh, M. and Beck, M.H. Octyl salicylate: a new contact sensitivity. *Contact Dermatitis.* **56**, 48 (2007).
 57. Toutou, E. and Godin, B. New approaches for UV-induced photodamage protection. *J. Appl. Cosmetol.* **24**, 139–147 (2006).
 58. Australian government TGA, OTC Medicines Section. A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens. (2006). Available from: <http://www.tga.gov.au/npm/sunscreen-zotd.pdf>.
 59. Consumer-Union. Sunscreens: some are short on protection. *Consumer Reports.* **72**, 6 (2007).
 60. Yang, Y.H., Chen, H. and Pan, G. Particle concentration effect in adsorption/desorption of Zn(II) on anatase type nano TiO₂. *J. Environ. Sci.* **19**, 1442–1445 (2007).
 61. Nemanic, M.K. and Elias, P.M. In situ precipitation: a novel cytochemical technique for visualization of permeability pathways in mammalian stratum corneum. *J. Histochem. Cytochem.* **28**, 573–578 (1980).
 62. Ghadially, R., Halkier-Sorensen, L. and Elias, P.M. Effects of petrolatum on stratum corneum structure and function. *J. Am. Acad. Dermatol.* **26**, 387–396 (1992).
 63. Brunner, T.J., Wick, P., Manser, P. et al. In Vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to Asbestos, Silica, and the Effect of Particle Solubility. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 4374–4381 (2006).
 64. Jeng, H.A. and Swanson, J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J. Environ. Sci. Health Tox. Hazard. Subs. Environ. Eng.* **41**, 2699–2711 (2006).
 65. Gojova, A., Guo, B., Kota, R.S., Rutledge, J.C., Kennedy, I.M. and Barakat, A.I. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ. Health Perspect.* **115**, 403–409 (2007).
 66. Lai, J.C., Lai, M.B., Jandhyam, S., Dukhande, V.V., Bhushan, A., Daniels, C.K., Leung, S.W. Exposure to titanium dioxide and other metallic oxide nanoparticles induces cytotoxicity on human neural cells and fibroblasts. *Int. J. Nanomed.* **3**, 533–545 (2008).
 67. Lanone, S., Rogerieux, F., Geys, J. et al. Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines. *Part. Fibre Toxicol.* **6**, 14–26 (2009).
 68. Deng, X., Luan, Q., Chen, W., Wang, Y., Wu, Y., Zhang, H. and Jiao, Z. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnol.* **20**, 101–115 (2009).
 69. Meyer, K., Rajanahalli, P., Ahamed, M., Rowe, J.J. and Hong, Y. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicol. In Vitro.* **25**, 1721–1726. (2011), 10.1016/j.tiv.2011.08.011.

70. Ma, H., Kabengi, N.J., Bertsch, P.M., Unrine, J.M., Glenn, T.C. and Williams, P.L. Comparative phototoxicity of nanoparticulate and bulk ZnO to a free-living nematode *Caenorhabditis elegans*: the importance of illumination mode and primary particle size. *Environ. Poll.* **159**, 1473–1480 (2011).
71. Wakefield, G., Lipscomb, S., Holland, E. and Knowland, J. The effects of manganese doping on UVA absorption and free radical generation of micronized titanium dioxide and its consequences for the photostability of UVA absorbing organic sunscreen components. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**, 648–652 (2004).
72. Schlossman, D. and Shao, Y. Inorganic UV filters. In: *Sunscreens: regulation and commercial development* (Shaat, N.A. ed), pp. 239–279. Taylor and Francis Group, London (2005).
73. Cao, Zhi. and Zhang, Z. Deactivation of photocatalytically active ZnO nanoparticle and enhancement of its compatibility with organic compounds by surface-capping with organically modified silica. *App. Sur. Sci.* **257**, 4151–4158 (2011).
74. Nohynek, G.J., Dufour, E.K. and Roberts, M.S. Nanotechnology, cosmetics and the skin: is there a health risk? *Skin Pharmacol. Physiol.* **21**, 136–149 (2008).
75. Pinheiro, T., Allon, J., Alves, L.C., Filipe, P. and Silva, J.N. The influence of corneocyte structure on the interpretation of permeation profiles of nanoparticles across the skin. *Nuclear Instrum. Methods Phys. Res.* **260**, 119–123 (2007).
76. Filipe, P., Silva, J.N., Silva, R. et al. Stratum corneum is an effective barrier to TiO₂ and ZnO nanoparticle percutaneous absorption. *Skin Pharmacol. Physiol.* **22**, 266–275 (2009).
77. Gopee, N.V., Roberts, D.W., Webb, P. et al. Quantitative determination of skin penetration of PEG-Coated CdSe quantum dots in dermabraded but not intact SKH-1 hairless mouse skin. *Toxicol. Sci.* **111**, 37–48 (2009).
78. Baroli, B., Ennas, M.G., Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R. and Lopez-Quintela, M.A. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1701–1712 (2007).
79. Cross, S.E., Russel, M., Southwell, I. and Roberts, M.S. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. *Skin Pharmacol. Physiol.* **20**, 148–154 (2007).
80. Kiss, B., Biro, T., Czifra, G. et al. Investigation of micronized titanium dioxide penetration in human skin xenografts and its effect on cellular functions of human skin-derived cells. *Exp. Dermatol.* **17**, 659–667 (2008).
81. Kuntsche, J., Bunjes, H., Fahr, A., Pappinen, S., Ronkko, S., Suhonen, M. and Urtti, A. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture model. *Int. J. Pharm.* **354**, 180–195 (2008).
82. Newman, M.D., Stotland, M. and Ellis, J.I. The safety of nanosized particles in titanium dioxide-and zinc oxide-based sunscreens. *J. Am. Acad. Dermatol.* **61**, 685–692 (2009).
83. Jiang, S.J., Chen, J.Y., Lu, Z.F., Yao, J., Che, D.F. and Zhou, X.J. Biophysical and morphological changes in the stratum corneum lipids induced by UVB irradiation. *J. Dermatol. Sci.* **44**, 29–36 (2006).
84. Brouxon, S., Kyrkanides, S., O'Banion, M.K. et al. Sequential Down-regulation of E-Cadherin with squamous cell carcinoma progression: loss of E-Cadherin via a Prostaglandin E₂-EP2-dependent posttranslational mechanism. *Cancer Res.* **67**, 7654–7664 (2007).
85. Yamamoto, T., Kurasawa, M., Hattori, T., Maeda, T., Nakano, H. and Sasaki, H. Relationship between expression of tight junction-related molecules and perturbed epidermal barrier junction in UVB-irradiated hairless mice. *Arch. Dermatol. Res.* **300**, 61–68 (2008).
86. Mortensen, L.J., Oberdörster, G., Pentland, A.P. and Delouise, L.A. In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano Lett.* **8**, 2779–2787 (2008).
87. Brouxon, S., Konger, R.L., VanBuskirk, J.A. et al. Deletion of prostaglandin E₂ EP2 receptor protects against ultraviolet-induced carcinogenesis, but increases tumor aggressiveness. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 439–446 (2007).
88. Tripp, C.S., Blomme, A.G., Chinn, K.S., Hardy, M.M., LaCelle, P. and Pentland, A.P. Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 853–861 (2003).
89. Baroli, B., Ennas, M.G., Loffredo, F., Isola, M., Pinna, R. and Lopez-Quintela, M.A. Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 1701–1712 (2007).
90. Lademann, J., Patzelt, A., Darvin, M., Richter, H., Antoniou, C., Sterry, W. and Koch, S. Application of optical non invasive methods in skin physiology: a comparison of laser scanning microscopy and optical coherent tomography with histological analysis. *Skin Res. Technol.* **13**, 119–132 (2007).
91. Laresse, F.F., D'Agostin, F., Crosera, M., Adami, G., Renzi, N., Bovenzi, M. and Marina, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* **255**, 33–37 (2009).
92. Shukla, R.K., Sharma, Y., Pandey, A.K., Singh, S., Sultana, S. and Dhawan, A. ROS-mediated genotoxicity induced by TiO₂ nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol. In Vitro* **25**, 231–241 (2011).
93. Wamer, W.G., Yin, J.J. and Wei, R.R. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radical Biol. Med.* **6**, 851–858 (1997).
94. Rampaul, A., Parkin, I.P. and Cramer, L.P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **191**, 138–148 (2007).
95. Tiano, L., Armeni, T., Venditti, E. and Barucca, G. Modified TiO₂ particles differentially affect human skin fibroblasts exposed to UVA light. *Free Rad. Biol. Med.* **49**, 408–415 (2010).
96. Kakikoni, K., Yamane, K., Teraoka, R., Otsuka, M. and Matsuda, Y. Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine. *J. Pharm. Sci.* **93**, 582–589 (2004).
97. Merhi, M., Brient, A., Chang, J. et al. *Etude de la génotoxicité in vitro de nanoparticules manufacturées sur une lignée bronchique humaine: exemple des TiO₂*. Séminaire, Environnement & Santé, Lille, 30 Novembre 2010.
98. Gurr, J.R., Wang, A.S.S., Chen, C.H. and Jan, K.Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* **213**, 66–73 (2005).
99. Serpone, N., Salinaro, A., Horikoshi, S. and Hidaka, H. Beneficial effects of photo-inactive titanium dioxide specimens on plasmid DNA, human cells and yeast cells exposed to UVA/UVB simulated sunlight. *J. Photochem. Photobiol.* **179**, 200–212 (2006).
100. Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S., Hidaka, H. and Knowland, J. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett.* **418**, 87–90 (1997).
101. Anderson, C. and Bard, A.J. Improved photocatalytic activity and characterization of mixed TiO₂/SiO₂ and TiO₂/Al₂O₃ materials. *J. Phys. Chem. B.* **101**, 2611–2616 (1997).
102. Karlsson, H.L., Cronholm, P., Gustafsson, J. and Moller, L. Copper oxide nanoparticles

- are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1726–1732 (2008).
103. Wu, J., Liu, W., Xue, C. *et al.* Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Letters.* **191**, 1–8 (2009).
104. Gupta, V.K., Zatz, J.L. and Rerek, M. Percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin in vitro. *Pharm. Res.* **16**, 1602–1607 (1999).
105. Menzel, F., Reinert, T., Vogt, J. and Butz, T. Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO₂ particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nucl. Ins. Meth. Phys. Res.*, **219–220**, 82–86 (2004).
106. Li, S.Q., Zhu, R.R., Zhu, H., Xue, M., Sun, X.Y., Yao, S.D. and Wang, S.L. Nanotoxicity of TiO₂ nanoparticles to erythrocyte *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 3626–3631 (2008).
107. Ghosh, M., Bandyopadhyay, M. and Mukherjee, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere* **81**, 1253–1262 (2010).
108. Gopee, N.V., Roberts, D.W., Webb, P. *et al.* Migration of intradermally injected quantum dots to sentinel organs in mice. *Toxicol. Sci.* **98**, 248–257 (2007).
109. Theogaraj, E., Riley, S., Hughes, L., Maier, M. and Kirkland, D. An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide. *Mut. Res.* **634**, 205–219 (2007).
110. Jing, L., Xu, Z., Sun, X., Shang, J. and Cai, W. The surface properties and photocatalytic activities of ZnO ultrafine particles. *Appl. Surf. Sci.* **180**, 308–314 (2001).
111. Serpone, N., Maruthamuthu, P., Pichat, P., Pelizzetti, E. and Hidaka, H.J. Exploiting the interparticle electron transfer process in the photocatalysed oxidation of phenol, 2-chlorophenol and pentachlorophenol: chemical evidence for electron and hole transfer between coupled semiconductors. *Photochem. Photobiol.* **85**, 247–255 (1995).
112. Migdal, C., Rahal, R., Rubod, A. *et al.* Internalisation of hybrid titanium dioxide/para-amino benzoic acid nanoparticles in human dendritic cells did not induce toxicity and changes in their functions. *Toxicol. Lett.* **199**, 34–42 (2010).
113. United States national library of medicine: ChemIDplus Lite. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/chemidlite.jsp>.
114. Barel, A.O., Paye, M. and Maibach, H.I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. (3rd ed). Informa healthcare, New York, London (2009).

Chapitre III:

Encapsulation de filtres UV inorganiques dans des particules et des capsules lipidiques submicroniques

A- Introduction:

1- Définition et intérêt des particules et capsules lipidiques submicroniques en cosmétologie et en pharmacie pour application topique:

Par définition, une nanoparticule est une particule dont la taille se situe entre 1 et 100 nm [132]. Cependant, les particules lipidiques submicroniques dont la taille se situe entre 50 et 500 nm sont communément appelées nanoparticules lipidiques [133].

Les nanoparticules lipidiques sont des nanosphères dont la matrice est constituée de lipides. Les nanoparticules lipidiques solides (SLN de l'anglais 'solid lipid nanoparticle') ont une matrice lipidique constituée par des composés lipidiques solides à température ambiante. Ce peut-être des glycérides de haut point de fusion (supérieur à la température ambiante) ou des cires [134, 135]. Les transporteurs lipidiques nanostructurés (NLC de l'anglais 'nanostructured lipid carrier') représentent la seconde génération plus élaborée des SLN. Leur cœur est composé d'un mélange de composés lipidiques solides et liquides à température ambiante. L'association de composés lipidiques solides et liquides pour constituer le cœur de ces sphères lipidiques permet de solubiliser au mieux les principes actifs (PA) lipophiles au sein du cœur lipidique des NLC en ralentissant les phénomènes d'expulsion moléculaire de l'actif. En effet, une matrice lipidique constituée uniquement par une cire tend à expulser les molécules au cours du temps en se recristallisant (Figure 16). L'ajout d'un lipide liquide à l'état liquide à température ambiante dans la matrice de lipides solides permet de ralentir ce phénomène de recristallisation et donc de maintenir plus longtemps le PA dans le cœur de la sphère lipidique (Figure 17). La matrice lipidique des SLN et des NLC est entourée par un ou plusieurs agents tensioactifs qui permettent la suspension des sphères lipidiques dans une phase dispersante aqueuse.

Les nanocapsules lipidiques (NC) sont des sphères lipidiques submicroniques dont le cœur comprend un polymère hydrophobe constituant une capsule. La majorité des nanocapsules lipidiques développées ont une matrice lipidique huileuse [136]. Les transporteurs lipidiques polymériques nanostructurés (NPLC de l'anglais 'nanostructured polymeric lipid carrier') constituent une structure hybride entre un NLC et une NC. En effet, les NPLC possèdent une matrice lipidique solide / liquide (similaire à celle des NLC) qui comprend un polymère hydrophobe (similaire à celui des NC). La Figure 18 présente la structure schématique des SLN, des NLC, des NPLC et des NC.

Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques sont étudiées en pharmacie pour délivrer des PA lipophiles par voie parentérale [137, 138], pulmonaire [139, 140], orale [141, 142], rectale [143], ophtalmique [144] et topique [145, 146, 147]. Ces nanostructures, et plus particulièrement les nanocapsules lipidiques, permettent (i) de protéger le PA emprisonné des phénomènes de photo-dégradation, (ii) de contrôler sa libération, (iii) d'augmenter sa biodisponibilité et (iv) de cibler le site d'action [148, 149, 150]. En cosmétique, elles sont étudiées pour améliorer la distribution des actifs au niveau du site d'intérêt, et

principalement au niveau des différentes couches cutanées [151]. Au laboratoire, une étude a mis en évidence l'intérêt des nanocapsules lipidiques pour formuler un antiseptique, la chlorhexidine en améliorant son efficacité anti-microbienne à la surface de la peau [152]. L'article concernant cette étude est présenté en Annexe 3.

Les NC sont plus efficaces que les SLN et les NLC pour contrôler la libération des PA dans le temps grâce à leur capsule polymérique [153]. Il existe plusieurs polymères hydrophobes pouvant être utilisés pour constituer la capsule des NC. Le choix du polymère va déterminer les propriétés de libération du principe actif dans le temps.

Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques peuvent améliorer l'efficacité du PA formulé et notamment celui des filtres UV [151-156]. En effet, ces nanostructures lipidiques peuvent agir à la fois comme des filtres UV inorganiques de par leur structure et également comme des filtres UV organiques en fonction de la composition de leur matrice lipidique [152, 154, 156]. Plusieurs études ont montré que la formulation de filtres UV (organiques et/ou inorganiques) au sein de ces nanostructures permettait d'améliorer le FPS [152-157].

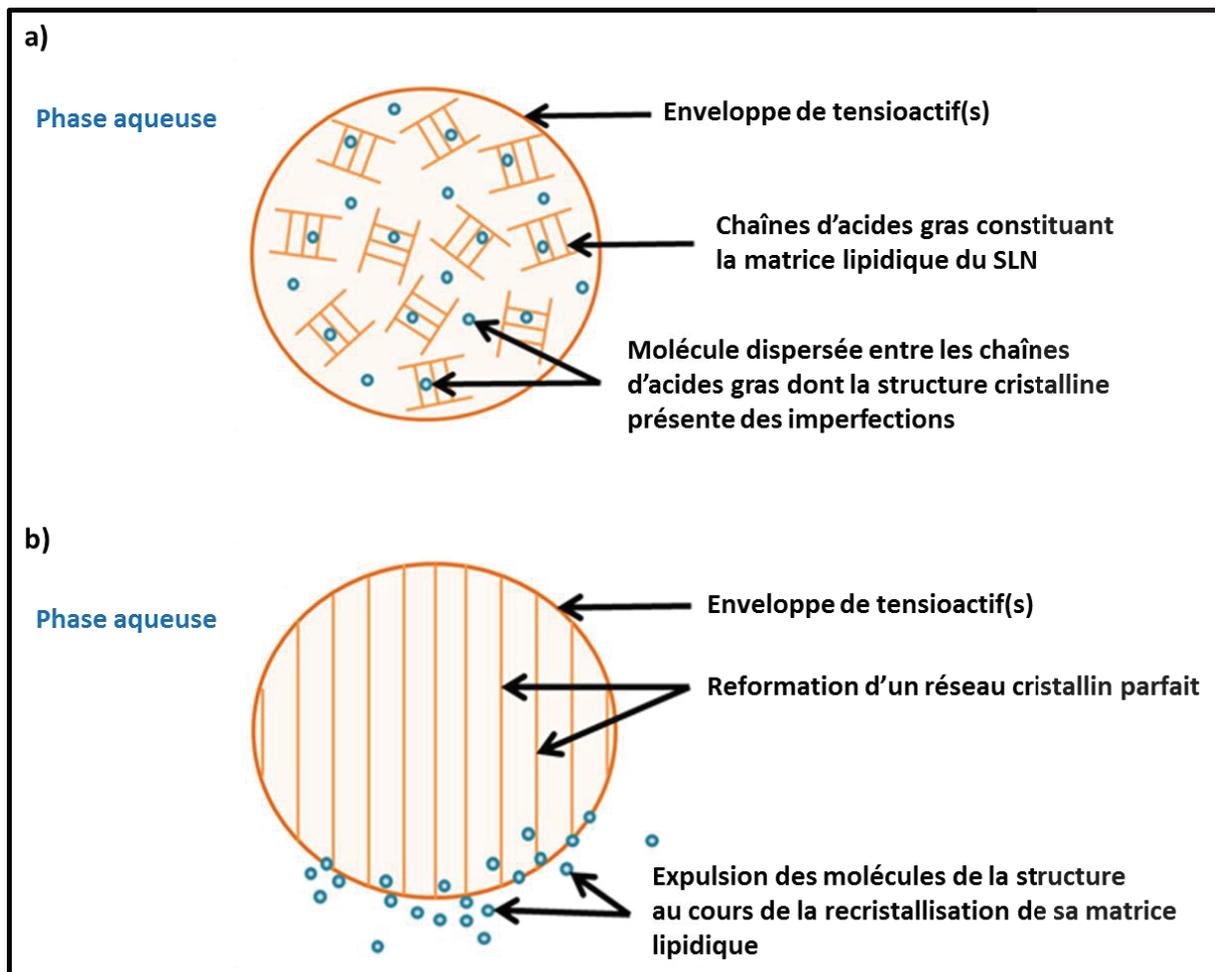


Figure 16 : Représentation schématique d'une nanosphère lipidique solide en suspension dans une phase dispersante aqueuse chargée en molécules (a).

Illustration du phénomène d'expulsion des molécules de la matrice lipidique de la SLN au cours du remaniement du réseau lipidique cristallin de sa matrice (b).

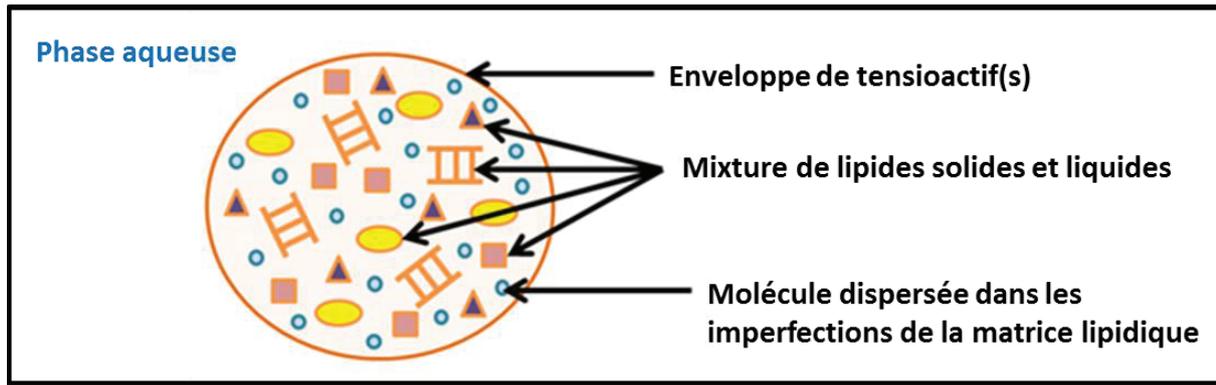


Figure 17 : Représentation schématique d'un NLC dont la matrice constituée d'un mélange de lipides solides et liquides permet au principe actif de venir s'enchâsser dans les nombreuses imperfections.

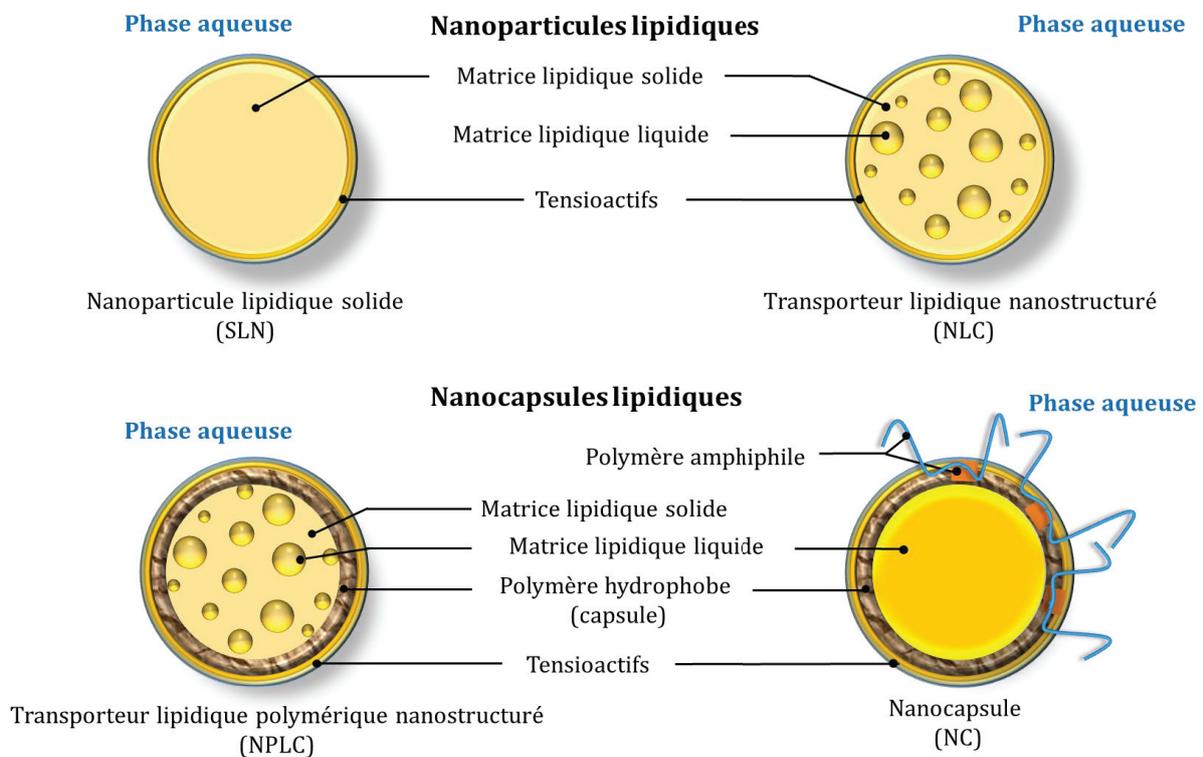


Figure 18 : Représentation schématique d'une SLN, d'un NLC, d'un NPLC et d'une NC.

Le choix des constituants des nanoparticules et nanocapsules lipidiques est le principal facteur influençant leur comportement au niveau de la peau [158]. Actuellement, un challenge vise à élaborer des écrans solaires conférant une photoprotection large dans le spectre UV (étendue dans le domaine UVA), montrant un FPS élevé tout en contenant la plus faible concentration en filtres UV possible. De plus, l'écran solaire doit avoir des propriétés cosmétiques agréables pour les utilisateurs. Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques semblent être prometteuses dans ce domaine.

2- Intérêt de l'encapsulation des filtres UV inorganiques:

Les filtres UV inorganiques sont les filtres UV les plus efficaces. Cependant, ils sont particulièrement difficiles à formuler. En effet, lorsque les filtres UV inorganiques sont incorporés à hautes concentrations dans les écrans solaires, ces formulations deviennent pâteuses, difficiles à étaler et elles ont tendance à laisser des traces blanches inesthétiques sur la peau à l'application ce qui ne motive pas le consommateur à réappliquer son écran solaire de manière régulière. Afin de limiter l'effet blanc inesthétique des filtres UV inorganiques sur la peau, les formulateurs utilisent ces minéraux sous forme de nanoparticules (i.e. < 100 nm). Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques sont des transporteurs intéressants pour formuler les filtres UV inorganiques puisqu'ils permettraient de diminuer la concentration en filtres UV utilisée tout en conférant une haute photoprotection [152, 154, 156, 157]. L'incorporation de plus faibles concentrations en particules minérales dans les écrans solaires permettrait de formuler des écrans solaires plus agréables à utiliser et plus faciles à étaler. De plus, compte tenu des différentes études montrant le potentiel toxique des nanoparticules minérales sur les cellules cutanées nucléées, l'encapsulation de ces nanoparticules permettrait d'assurer leur maintien à la surface de la peau [159, 160].

3- Formulation de suspensions de NLC et de NPLC pour encapsuler des filtres UV inorganiques:

L'incorporation de nanoparticules minérales dans des nanostructures lipidiques peut être facilitée selon l'enrobage des particules minérales. En effet, un enrobage procurant des propriétés hydrophobes à ces particules permet de mieux les disperser au sein de matrices lipidiques. Il existe actuellement une polémique concernant l'habilité des nanoparticules à traverser la barrière cutanée [159, 160] Leur emprisonnement dans des structures supérieures à 100 nm pourrait inhiber, s'il existe, cet éventuelle pénétration cutanée. De plus, il a également été montré que les nanoparticules lipidiques possèdent des propriétés anti-UV propres à leur structure [155-157, 161, 162]. Ces propriétés permettraient d'obtenir une haute protection anti-UV avec une concentration en filtres UV inorganiques plus faible que celle contenue dans les écrans solaires classiques [149].

Ces travaux ont été réalisés en partenariat avec l'entreprise Polaar SAS qui souhaite développer un écran solaire qui soit le plus respectueux possible pour la peau et donc formulé uniquement avec des filtres UV inorganiques. En Europe, seul le TiO₂ est listé en tant que filtre UV inorganique. L'écran solaire formulé doit pouvoir être décliné en FPS 30 et 50 et répondre à des critères esthétiques acceptables et notamment être plus agréable à utiliser que les formulations d'écrans solaires actuelles contenant uniquement des filtres UV minéraux (e.g. formulations dites « bio »). Les technologies visant à emprisonner les filtres UV sont donc particulièrement intéressantes pour ce projet.

Dans cette étude, l'efficacité des NLC et des NPLC pour formuler un filtre UV inorganique (le TiO_2) a été comparée. Ces travaux ont permis de développer des suspensions de NPLC encapsulant des filtres UV inorganiques en réduisant drastiquement la concentration en filtres UV habituellement utilisée pour obtenir des écrans solaires de FPS 30 et 50. Ces suspensions de NPLC ont été brevetées [163]. Le brevet les concernant a été inséré à la fin de ce chapitre. Cette étude a également permis de développer des émulsions solaires de FPS 30 et 50 à base de suspensions de NPLC en divisant au minimum par deux les concentrations en filtres UV inorganiques habituellement utilisées pour atteindre ces FPS. Un lot pilote de 25 kg d'émulsion solaire a été réalisé en prévision sa commercialisation.

B- Etude de l'encapsulation de filtres UV inorganiques dans des particules et des capsules lipidiques submicroniques pour formuler un écran solaire:

1- Matériels et méthodes:

a) Matériels:

Le Tableau 7 présente les différents composés utilisés pour formuler les suspensions de NLC et de NPLC ainsi que les émulsions solaires classiques et les émulsions à base de suspensions de NPLC. Le nom INCI ainsi que le rôle de chacun de ces constituants sont également décrits dans ce tableau.

La cire de carnauba a été choisie pour constituer la matrice lipidique solide des NLC et des NPLC (Figure 18) pour son point de fusion élevé (i.e. 80°C) ainsi que pour sa teneur naturelle en cinnamates, filtres UV organiques.

L'huile d'amande douce a été utilisée comme phase huileuse des émulsions classiques qui ont servi de témoin dans cette étude. Cette huile n'apporte aucun effet photo-protecteur dans le domaine UV.

L'acide oléique a été choisi pour constituer la matrice lipidique liquide des NLC et des NPLC (Figure 18) pour ses propriétés solubilisantes des actifs lipophiles. Il a également été utilisé pour disperser les nanoparticules de TiO_2 au sein de la phase lipidique des émulsions classiques (i.e. ne comprenant pas de suspensions de nanoparticules lipidiques) qui ont servi de témoin dans cette étude.

La poly- ϵ -caprolactone (PCL) a été choisi comme polymère hydrophobe pour constituer une membrane polymérique rigide autour de la matrice lipidique des NPLC (Figure 18). Ce polymère biodégradable est couramment employé pour formuler des suspensions de NC.

Les dispersions lipidiques de nanoparticules de TiO_2 , utilisées dans cette étude, comprennent des nanoparticules de TiO_2 enrobées d'alumine (oxyde d'aluminium, Al_2O_3) qui permet d'inhiber leur potentiel photocatalytique pouvant engendrer des dommages cellulaires cutanés. La présence d'acide stéarique, d'acide polyhydroxystéarique et de

triéthoxycaprylsilane permet de faciliter la dispersion des nanoparticules de TiO_2 dans une phase lipidique.

La dispersion lipidique B, contenant une concentration plus importante en nanoparticules de TiO_2 , a été développée par le fournisseur au cours de cette étude. La première partie de cette étude utilise donc la dispersion lipidique de nanoparticules de TiO_2 A avant de privilégier la dispersion lipidique B dans le reste de l'étude.

Le couple de tensio-actifs comprenant le Montane 80[®] (tensio-actif de HLB 4,3) et le Montanox 20[®] (tensio-actif de HLB 16,7) a été utilisé pour disperser au mieux les NLC et les NPLC dans leur phase dispersante aqueuse de par leur complémentarité. Le mélange de ces deux tensio-actifs a permis de formuler les suspensions de NLC et de NPLC en respectant le HLB_r de leur phase lipidique.

Le Sepineo P600[®] est l'émulsionnant qui a été utilisé pour formuler les émulsions témoins (i.e. ne comprenant pas de suspensions de nanoparticules lipidiques) de cette étude.

Les particules de CeO_2 ont été choisies comme filtre UV inorganique complémentaire au TiO_2 . En effet, des études montrent que le TiO_2 et le CeO_2 agiraient en synergie pour filtrer le rayonnement UV [164].

L'huile de Karanja a été utilisée pour sa teneur naturelle en karanjin et en pongamol qui sont des composés organiques ayant la capacité de filtrer les rayonnements UVB et UVA.

La glycérine a été incorporée dans la phase aqueuse des émulsions utilisées comme témoins dans cette étude afin de faciliter l'étalement des émulsions au cours de l'évaluation *in vitro* de leur FPS.

L'eau déminéralisée a été utilisée comme phase dispersante aqueuse des NLC et des NPLC. Elle a également été utilisée comme constituant de la phase aqueuse des émulsions formulées dans cette étude.

Un ensemble de composés entrant dans la composition des émulsions solaires à base de suspensions de nanoparticules lipidiques a également été utilisé. Cet ensemble de composés comprend notamment une fragrance, un conservateur et un émulsionnant. Cependant, pour des raisons de confidentialité, ces composés ne seront pas décrits.

b) Formulation des suspensions de NLC et de NPLC ainsi que des émulsions solaires:

La composition des suspensions de NLC et de NPLC formulées dans cette étude est décrite dans le Tableau 8. Les suspensions de NPLC comportent les mêmes constituants que les suspensions de NLC en intégrant en plus la PCL dans leur phase lipidique. Les modes opératoires de formulation des suspensions de NPLC et de NLC sont respectivement présentés sur les Figures 19 et 20.

Brièvement, les phases lipidiques des suspensions de NLC et de NPLC ont été chauffées à 85°C sous agitation mécanique pendant trente minutes. Les phases aqueuses ont été chauffées à la même température avant d'être ajoutées dans les phases lipidiques sous agitation mécanique. Après un temps d'homogénéisation de trois minutes, les suspensions

de NLC ont été homogénéisées ultrasoniquement pendant dix minutes avant d'être refroidies à 25°C sous agitation magnétique. Les suspensions de NPLC ont été refroidies à 25°C sous agitation mécanique sans étape d'homogénéisation ultrasonique. Les suspensions de NLC et de NPLC ont été formulées avec une masse finale de 100 g à l'exception des lots pilotes de 12 kg de suspensions de NPLC (Suspensions #13 et #14) préparés à l'échelle industrielle selon le même mode opératoire.

Le Tableau 9 décrit la composition des émulsions solaires H/E classiques (i.e. ne comprenant pas de suspensions de nanoparticules lipidiques) utilisées comme témoins pour l'étude comparative du pouvoir photo-protecteur dans le domaine UV des suspensions de NLC et de NPLC. Ces émulsions (Emulsions #1 à #8) ont été formulées de la manière suivante : la phase lipidique contenant l'émulsifiant a été chauffée à 75°C sous agitation mécanique à 300 tours par minute (Tr/min). Après un temps d'homogénéisation mécanique de 30 minutes, la phase aqueuse a été chauffée à 75°C sous agitation magnétique à 500 rotations par minute (rpm) avant d'être ajoutée à la phase grasse sous agitation mécanique à 500 Tr/min. L'émulsion a ensuite été refroidie à 25°C sous agitation mécanique. Les émulsions ont été formulées avec une masse finale de 100 g.

Le Tableau 10 décrit la composition des émulsions solaires formulées avec des suspensions de NPLC, à l'exception de l'émulsion #10 qui est une émulsion témoin ne contenant pas de suspension NPLC dans sa composition. Seuls les composés filtrants dans le domaine UV sont mentionnés. En effet, pour des raisons de confidentialité, la composition exacte de ces émulsions solaires n'est pas décrite. La formulation de ces émulsions solaires fait intervenir plusieurs étapes. Le mode opératoire de formulation de ces émulsions est présenté sur la Figure 21.

Brièvement, la phase A de l'émulsion est chauffée à 45°C sous agitation mécanique et est laissée homogénéiser ainsi pendant quinze minutes. La Phase A est ensuite chauffée à 75°C. La phase B est ajoutée à la phase A et le mélange est laissé homogénéiser à 75°C pendant dix minutes avant d'être refroidi à 45°C. La phase C est ajoutée au mélange A-B sous agitation mécanique et le mélange est laissé homogénéiser pendant dix minutes à 45°C. La Phase D qui comprend des suspensions de NPLC est ajoutée au mélange A-B-C sous agitation mécanique. Le mélange A-B-C-D est laissé homogénéiser à 45°C pendant quinze minutes avant d'être refroidi à 40°C. La phase E est ajoutée au mélange. Le mélange A-B-C-D-E est laissé homogénéiser mécaniquement à 40°C pendant dix minutes avant d'être refroidi à 30°C. La phase F de l'émulsion est ajoutée dans le mélange. Le mélange A-B-C-D-E-F est homogénéisé mécaniquement à 30°C pendant cinq minutes avant d'être refroidi à 25°C. Les émulsions ont été formulées avec une masse finale de 100 g à l'exception du lot pilote de 25 kg d'émulsion (Emulsion #13) préparé à l'échelle industrielle selon le même mode opératoire.

c) Analyse de la granulométrie et du potentiel Zeta des NLC et des NPLC:

Le diamètre hydrodynamique moyen (*Z-Ave*), l'indice de polydispersité (*Pdl*) ainsi que le potentiel Zeta (ζ) des NLC et des NPLC ont été déterminés selon les principes de diffusion dynamique de la lumière (DDL) et de l'électrophorèse laser Doppler (ELD) respectivement pour le *Z-Ave* et le *Pdl* et pour le potentiel ζ . Le Zetasizer nano ZS® (Malvern Instrument, France) permet d'analyser des solutions colloïdales de suspensions dont la taille des particules se situe entre 0,6 nm et 6 μm sous un angle de détection de 173° et une longueur d'onde de 633 nm. Le potentiel ζ des particules lipidiques en suspension a été mesuré sous une conductivité maximale de $200 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Les formulations ont préalablement été diluées dans de l'eau déminéralisée avant les mesures. Les mesures ont été réalisées à $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ dans des cuves en polystyrène adaptées. Les valeurs de *Z-Ave*, de *Pdl* et de potentiel ζ correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 10 mesures expérimentales.

Tableau 7: Nom INCI et rôle des différents composés utilisés pour formuler les suspensions et les émulsions utilisées dans cette étude.

Composés	Nom INCI	Rôle	Emulsions classiques	Suspensions de NLC	Suspensions de NPLC	Emulsions à base de suspensions de NPLC
Cire de carnauba	Copernicia cerifera cera	Matrice lipidique solide	-	X	X	X
Acide oléique	Oleic acid	Agent solubilisant Matrice lipidique liquide	X	X	X	X
Huile d'amande douce	Prunus amygdalus dulcis oil	Phase huileuse	X	-	-	-
Huile de Karanja	Karanja (Pongamia glabra) seed oil	Phase huileuse Filtre UVB et UVA naturel	-	-	-	X
Poly-ε-caprolactone (PCL)	Poly-ε-caprolactone	Polymère hydrophobe biodégradable	-	-	X	X
Montanox 20®	Polysorbate 20	Tensioactif de HLB 16,7	-	X	X	X
Montane 80®	Sorbitan oleate	Tensioactif de HLB 4,3	-	X	X	X
Sepineo P600®	Acrylamide (And) Sodium acryloyldimethyl taurate copolymer (And) Isohexadecane (And) Polysorbate 80	Emulsionnant, épaississant et stabilisant	X	-	-	-
Dispersion lipidique de nanoparticules de TiO ₂ A	Caprylic/Capric Triglyceride (And) Titanium Dioxide (And) Alumina (And) Polyhydroxystearic Acid (And) Isopropyl Titanium Triisostearate (And)	Filtre UV inorganique Comprend 36,3 % de nanoparticules de TiO ₂ Taille primaire des nanoparticules de TiO ₂ : 10 nm ; Taille des agglomérats de nanoparticules de TiO ₂ : 110 nm	X	X	-	-

Triethoxycaprylylsilane	
	Titane Dioxide (And) Coconut Alkanes (And) Alumina (And) Stearic Acid (And) Polyhydroxystearic Acid (And) Coco-Caprylate/Caprates
Dispersion lipidique de nanoparticules de TiO₂ B	Filtre UV inorganique Comprend 49,2 % de nanoparticules de TiO ₂ Taille primaire des nanoparticules de TiO ₂ : 15 nm ; Taille des agglomérats de nano particules de TiO ₂ : 124 nm
	Filtre UV inorganique
Microparticules de CeO₂	Taille primaire des particules de CeO ₂ : 200 nm Taille des agglomérats de particules de CeO ₂ : non communiquée
Composés complémentaires des émulsions solaires	Fragrance, conservateur, émulsionnant, agent gélifiant...
Glycérine	Agent hydratant
Eau déminéralisée	Phase aqueuse

Tableau 8 : Composition (% m / m) des suspensions de NLC et de NPLC utilisées dans cette étude.

Constituants		Cire de Carnauba	Acide oléique	PCL	Montane 80®	Montanox 20®	Dispersions lipidique de TiO ₂ A	Dispersions lipidique de TiO ₂ B	Particules de CeO ₂	Eau déminéralisée
Suspensions de NLC										
NLC #1	5,00	5,00	-	0,38	4,62	-	-	-	-	Qsp 100
NLC #2	5,00	5,00	-	1,57	8,43	5,51	-	-	-	Qsp 100
NLC #3	5,00	5,00	-	2,50	9,50	11,08	-	-	-	Qsp 100
NLC #4	5,00	5,00	-	2,92	9,08	16,52	-	-	-	Qsp 100
NLC #5	5,00	5,00	-	3,22	8,78	22,04	-	-	-	Qsp 100
NLC #6	5,00	5,00	-	3,35	8,65	24,80	-	-	-	Qsp 100
NLC #7	5,00	5,00	-	3,46	8,54	27,55	-	-	-	Qsp 100
NLC #8	5,00	5,00	-	3,66	8,34	33,88	-	-	-	Qsp 100
Suspensions de NPLC										
NPLC #1	5,00	5,00	0,050	0,38	4,62	-	-	-	-	Qsp 100
NPLC #2	5,00	5,00	0,050	1,57	8,43	5,51	-	-	-	Qsp 100
NPLC #3	5,00	5,00	0,050	2,5	9,50	11,08	-	-	-	Qsp 100
NPLC #4	5,00	5,00	0,050	2,92	9,08	16,52	-	-	-	Qsp 100
NPLC #5	5,00	5,00	0,050	3,22	8,78	22,04	-	-	-	Qsp 100
NPLC #6	5,00	5,00	0,050	3,35	8,65	24,80	-	-	-	Qsp 100
NPLC #7	5,00	5,00	0,050	3,46	8,54	27,55	-	-	-	Qsp 100
NPLC #8	5,00	5,00	0,050	3,66	8,34	33,88	-	-	-	Qsp 100
NPLC #9	5,00	5,00	0,050	3,78	8,22	-	18,29	-	-	Qsp 100
NPLC #10	5,00	5,00	0,050	2,28	9,72	-	6,25	8,00	-	Qsp 100
NPLC #11	5,95	5,95	0,060	4,58	9,70	-	23,81	-	-	Qsp 100
NPLC #12	6,41	6,41	0,064	3,53	11,86	-	11,54	10,26	-	Qsp 100
NPLC #13	5,95	5,95	0,060	4,58	9,70	-	23,81	-	-	Qsp 100
NPLC #14	6,41	6,41	0,064	3,53	11,86	-	11,54	10,26	-	Qsp 100
NPLC #15	5,00	5,00	0,050	3,78	8,22	-	18,29	-	-	Qsp 100
NPLC #16	5,00	5,00	0,050	2,28	9,72	-	6,25	8,00	-	Qsp 100

Tableau 9 : Composition (% m / m) des émulsions classiques utilisées pour l'étude comparative du pouvoir photo-protecteur en fonction de la concentration en TiO₂ des suspensions de NLC, de NPLC et des émulsions formulées avec des concentrations croissantes en TiO₂.

Constituants Emulsions	Huile d'amande douce	Acide oléique	Dispersion lipidique de TiO ₂ A	Emulsionnant	Glycérine	Eau déminéralisée
Emulsion #1	5,00	5,00	-	1,00	10,00	Qsp 100
Emulsion #2	5,00	5,00	5,51	1,00	10,00	Qsp 100
Emulsion #3	5,00	5,00	11,08	1,00	10,00	Qsp 100
Emulsion #4	5,00	5,00	16,52	1,00	10,00	Qsp 100
Emulsion #5	5,00	5,00	22,04	1,00	10,00	Qsp 100
Emulsion #6	5,00	5,00	24,80	1,00	10,00	Qsp 100
Emulsion #7	5,00	5,00	27,55	1,00	10,00	Qsp 100
Emulsion #8	5,00	5,00	33,88	1,00	10,00	Qsp 100

Tableau 10 : Composition (% m / m) des émulsions solaires formulées avec des suspensions de NPLC.

Constituants Emulsions	Cire de Carnauba	Acide oléique	PCL	Montane 80®	Montanox 20®	Dispersion lipidique de TiO ₂ B	Particules de CeO ₂	Suspensions de NPLC	Huile de Karanja	Autres
Emulsion #9	-	-	-	-	-	-	5,00	65 % de suspension #9 18 % de suspension #10	8,00	Qsp 100
Emulsion #10	4,15	4,15	0,17	2,87	7,09	13,10	6,44	-	8,00	Qsp 100
Emulsion #11	-	-	-	-	-	-	-	40 % de suspension #11 15 % de suspension #12	-	Qsp 100
Emulsion #12	-	-	-	-	-	-	5,00	48 % de suspension #11 12 % de suspension #12	6,00	Qsp 100
Emulsion #13	-	-	-	-	-	-	5,00	48 % de suspension #13 12 % de suspension #14	6,00	Qsp 100

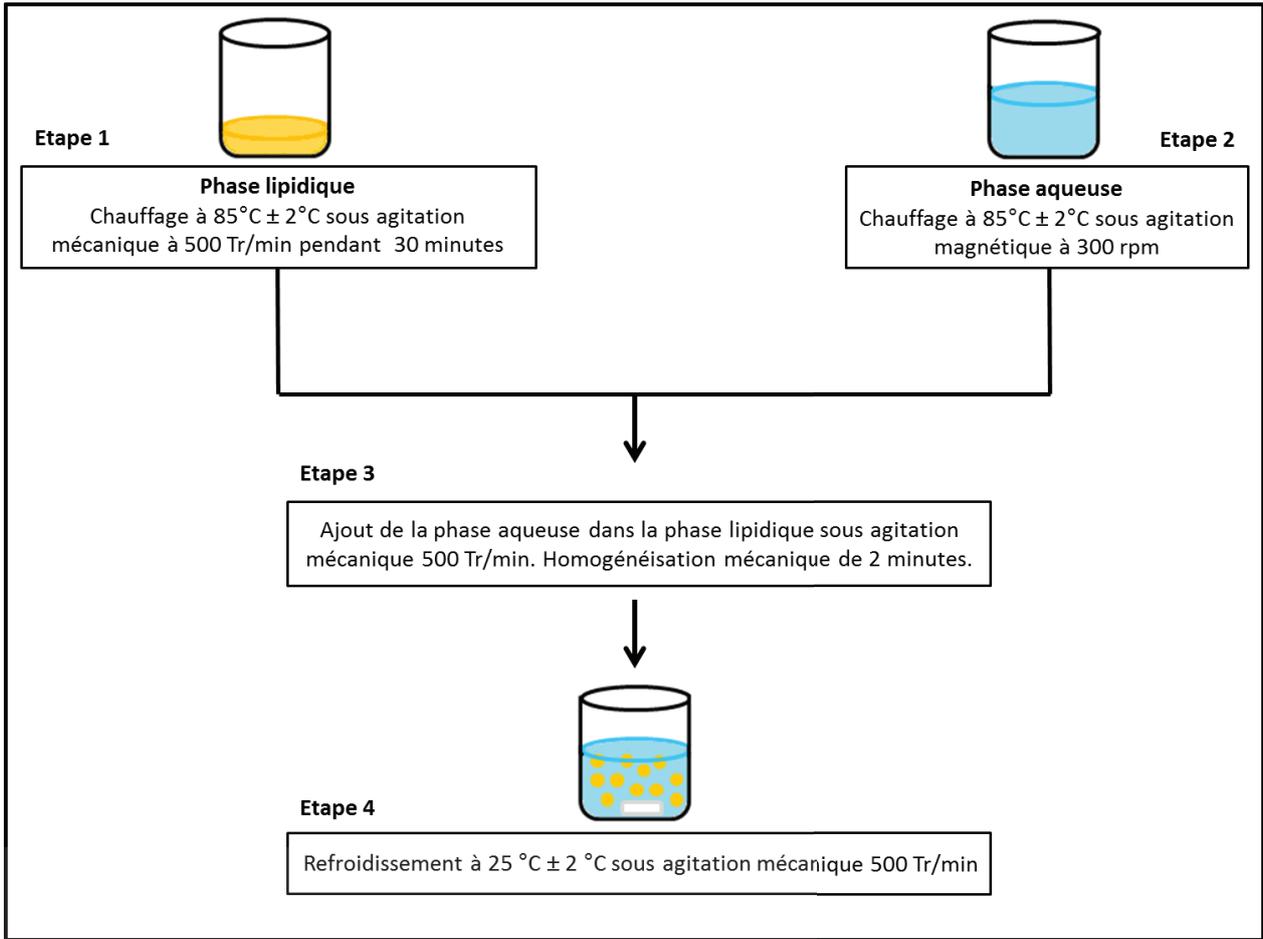


Figure 19 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de NPLC.

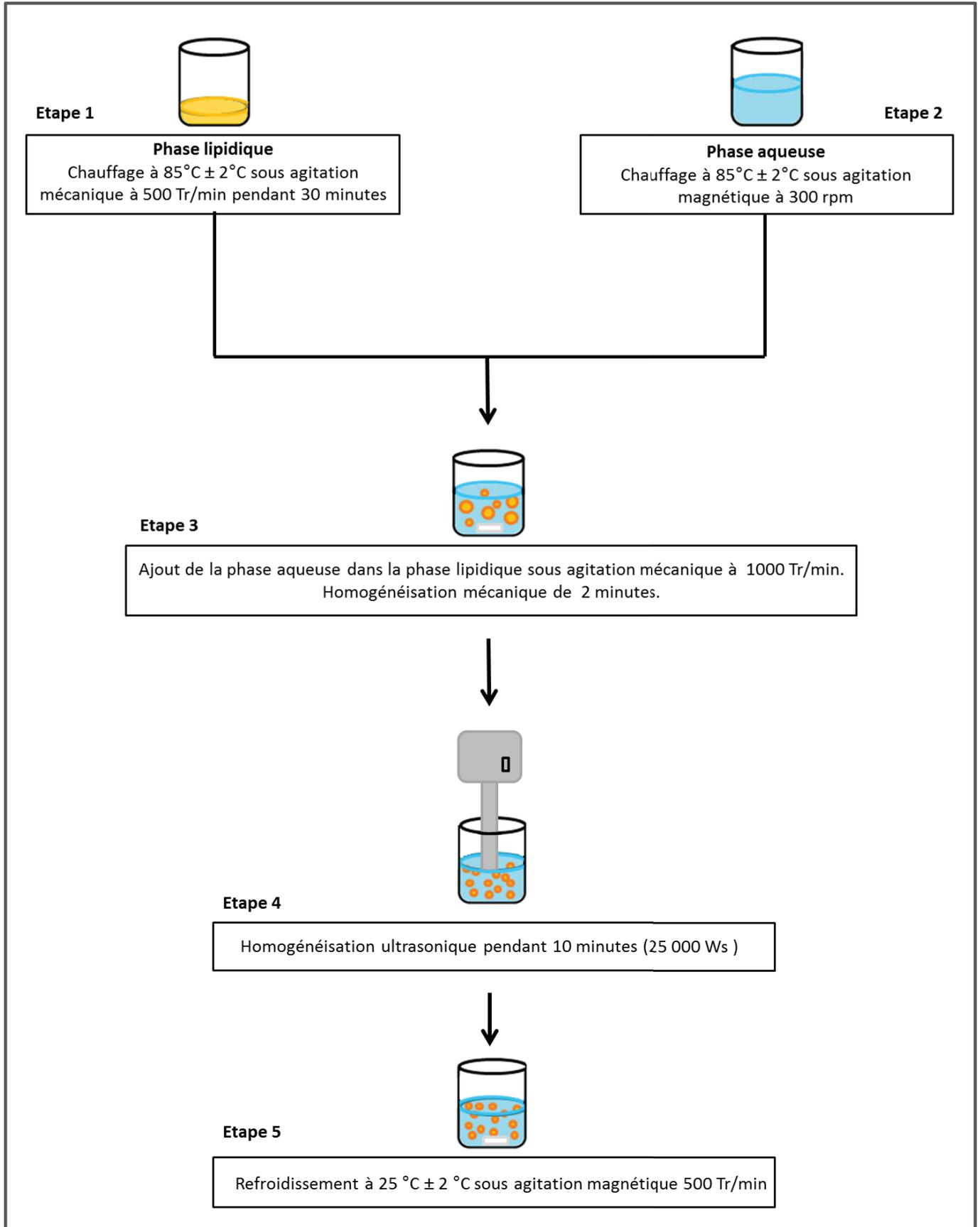


Figure 20 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de NLC.

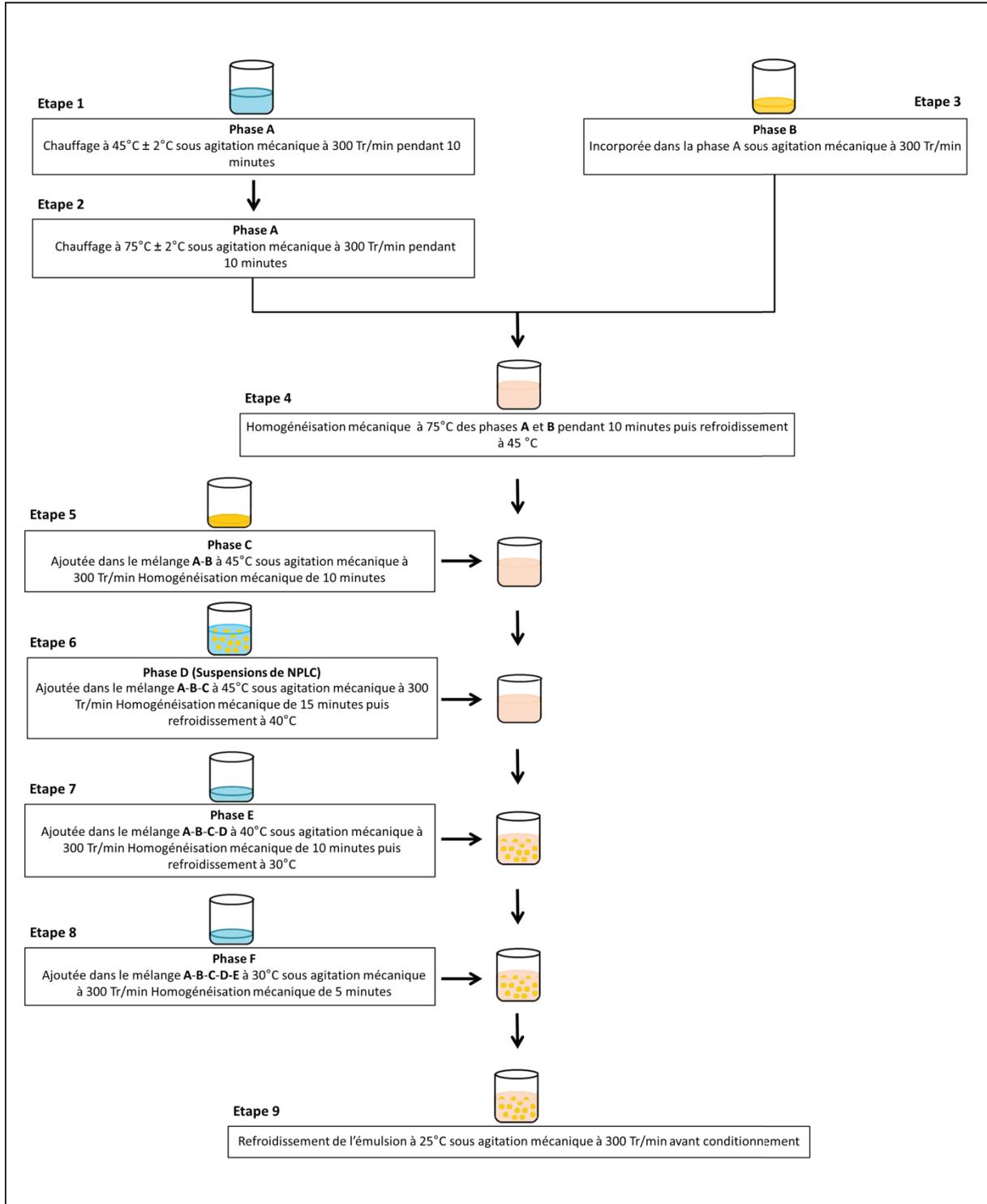


Figure 21 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des émulsions solaires intégrant des nanoparticules lipidiques dans leur composition.

d) Evaluation du FPS, du FPUVA et de la λ_c des formulations étudiées:

Le pouvoir filtrant dans le domaine UV des suspensions de NLC et de NPLC ainsi que des émulsions a été caractérisé en mesurant la transmittance UV à travers des plaques en PMAM recouvertes de la formulation à caractériser. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre comprenant une sphère d'intégration : le Labsphere® UV 2000 S. Les plaques en PMAM de dimensions 5 x 5 x 0,3 cm, ont été recouvertes de formulation, appliquée en multiple gouttelettes, en respectant une quantité pesée de 1,3 mg.cm⁻². La formulation a ensuite été étalée sur la plaque de PMAM en un film uniforme. Les plaques ont ensuite été stockées à l'obscurité pendant au minimum 15 minutes avant mesure. La transmittance UV à travers les plaques de PMAM a été mesurée entre 290 et 400 nm selon un intervalle de mesure de 1 nm. Une plaque PMAM recouverte de glycérine a été utilisée comme blanc afin de calibrer le spectrophotomètre. Pour chaque formulation testée, trois plaques de PMAM ont été préparées et la transmittance UV à travers ces plaques a été mesurée sur six localisations différentes.

Le FPS des formulations testées a été déterminé selon l'équation (11). Le FPUVA ainsi que la λ_c des formulations ont été déterminés respectivement selon les équations (12) et (13). Les valeurs de FPS et de λ_c correspondent à la moyenne, plus ou moins l'écart-type, de 18 mesures expérimentales tandis que les valeurs de FPUVA correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type, de 6 mesures expérimentales.

$$\text{FPS} = \frac{\int_{290}^{400} E_{\lambda} \cdot S_{\lambda} \cdot d_{\lambda}}{\int_{290}^{400} E_{\lambda} \cdot S_{\lambda} \cdot T_{\lambda} \cdot d_{\lambda}} \quad (\text{Eq. 11})$$

$$\text{FPUVA} = \frac{\int_{320}^{400} E_{\lambda} \cdot S_{\lambda} \cdot d_{\lambda}}{\int_{320}^{400} E_{\lambda} \cdot S_{\lambda} \cdot T_{\lambda} \cdot d_{\lambda}} \quad (\text{Eq. 12})$$

Avec :

E_{λ} : spectre d'action érythémal de la longueur d'onde λ

S_{λ} : irradiance spectrale de la longueur d'onde λ

T_{λ} : transmittance spectrale de la longueur d'onde λ

d_{λ} : variable d'intégration.

$$\int_{290}^{\lambda_c} \lg \left[\frac{1}{T(\lambda)} \right] d\lambda = 0,9 \times \int_{290}^{400} \lg \left[\frac{1}{T(\lambda)} \right] d\lambda \quad (\text{Eq. 13})$$

Avec :

T_{λ} : transmittance spectrale de la longueur d'onde λ

d_{λ} : domaine d'intégration

Les propriétés filtrantes dans le domaine UV de l'huile de Karanja ont également été étudiées selon le même protocole mais en étalant une quantité de $0,72 \text{ mg.cm}^{-2}$ d'huile sur les plaques de PMAM.

e) Etude de la stabilité des suspensions de nanoparticules lipidiques:

Les émulsions ainsi que les suspensions de NLC et de NPLC #1, #2, #3, #4, #5, #7 formulées respectivement avec 0, 2, 4, 6, 8 et 10 % de nanoparticules de TiO_2 ont été placées dans une enceinte climatique à 50°C et 75 % d'humidité relative (HR) pendant un mois. Le FPS, le FPUVA ainsi que la λ_c de ces émulsions et suspensions ont été déterminés le jour de leur formulation puis quatre semaines après avoir été stockées en enceinte climatique.

Dans une autre étude, les variations du Z-Ave, du potentiel ζ ainsi que du FPS de deux suspensions de NPLC formulées avec du TiO_2 et du CeO_2 (Suspensions #9 et #10) ont été suivies à température ambiante pendant dix-huits mois. Les mesures concernant le Z-Ave des NLC et des NPLC ainsi que leur potentiel ζ ont été réalisées le jour de la formulation des deux suspensions puis après 2, 4, 7, 9, 11, 21, 28, 70, 101 jours et après 6 et 18 mois passés à température ambiante (i.e. $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$). Le FPS des deux suspensions a été évalué le jour de leur formulation puis après 18 mois passés à température ambiante.

f) Evaluation du facteur de protection solaire in vivo des formulations:

Le FPS de deux suspensions de NLC et de NPLC (Suspensions #8) et d'une émulsion solaire à base de NPLC (Emulsion #9) a été évalué *in vivo* sur dix individus par la société Idéa et comparé aux valeurs obtenues *in vitro*. La valeur de la DEM de chaque individu a été déterminée en irradiant plusieurs zones délimitées sur le dos de chaque volontaire avec des doses croissantes de rayonnement UVB. 2 mg.cm^{-2} de chacune des formulations testées ont été étalées sur des zones cutanées délimitées sur le dos des volontaires. La DEM de chaque individu a de nouveau été déterminée au niveau de ces zones. Le FPS obtenu correspond au rapport entre la DEM évaluée après application des formulations étudiées et la DEM évaluée sur peau dénuée de photo-protection. Les résultats correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 10 mesures expérimentales.

g) Comparaison de l'effet blanc à l'étalement d'une émulsion solaire formulée avec des suspensions de NPLC par rapport à trois écrans solaires minéraux commercialisés:

Une quantité identique de trois écrans solaires minéraux commercialisés, affichant un FPS de 50, a été appliquée sur la partie interne de l'avant bras d'un individu de phototype III. La même quantité d'émulsion solaire de FPS 50 formulée avec des suspensions de NLC et de NPLC (Emulsion #12) a été appliquée sur l'individu. Après étalement, l'effet blanc des formulations appliquées a pu être observé macroscopiquement.

h) Analyse statistique des résultats:

Les résultats obtenus expérimentalement ont été analysés en utilisant les logiciels Excel® et Kaleidagraph. Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney a été utilisé pour mettre en évidence les différences significatives entre les différentes données obtenues expérimentalement avec une probabilité $\leq 0,05$ fixée comme seuil de significativité.

2- Résultats et discussion:

Deux types de transporteurs lipidiques ont été étudiés pour formuler des nanoparticules de TiO_2 : les NLC et les NPLC. La composition de ces transporteurs lipidiques ne diffère que par la présence de PCL dans la matrice lipidique des NPLC (Figure 18). Une émulsion de type huile dans eau a été utilisée comme témoin afin de mettre en évidence l'intérêt des suspensions de NLC et de NPLC pour augmenter le pouvoir filtrant des nanoparticules de TiO_2 (potentiel booster sur le FPS). Des concentrations croissantes en TiO_2 (de 0 % à 12,3 %) ont été formulées dans des suspensions de NLC, des suspensions de NPLC et des émulsions (Tableaux 8 et 9).

Les résultats concernant l'analyse granulométrique (*Z-Ave* et *Pdl*) ainsi que la charge électrostatique (potentiel ζ) des NLC et NPLC sont regroupés dans le Tableau 11. Le *Z-Ave* des NLC et des NPLC est inférieur à 500 nm quelle que soit la concentration en TiO_2 incorporée. Les *Pdl* mesurés sont tous compris entre 0,07 et 0,7 ce qui indique une polydispersion. Les NLC et NPLC ont un potentiel ζ négatif supérieur à $|30 \text{ mV}|$ indicatif d'une bonne stabilité des suspensions dans le temps puisqu'avec une telle charge, les particules en suspension sont moins susceptibles de s'agréger entre elles [165].

Les FPS obtenus avec les suspensions de NLC et de NPLC sont tous significativement supérieurs à ceux obtenus avec les émulsions témoins H/E et ce pour une même concentration en TiO_2 (Tableau 12). Les émulsions témoins montrent des FPS corrélés avec les données du fournisseur de la dispersion lipidique de TiO_2 [166]. En effet, d'après ces données, l'incorporation de 1 % de nanoparticules de TiO_2 de 15 nm, dispersées dans leur mélange lipidique, dans une émulsion H/E donne un FPS entre 2,5 et 3. Le FPS théorique des formulations a donc été calculé en considérant qu'1 % de nanoparticules de TiO_2 donne 2,75 points FPS correspondant à la valeur moyenne se situant entre 2,5 et 3. Les suspensions de NLC et de NPLC semblent donc augmenter le pouvoir filtrant dans le domaine UVB du TiO_2 . En effet, le FPS des suspensions de NLC et de NPLC est supérieur au FPS théorique et ce pour chacune des concentrations en TiO_2 étudiées. Les suspensions de NLC et de NPLC montrent des FPUVA significativement supérieurs à ceux obtenus avec les émulsions H/E.

Tableau 11 : Z-Ave, Pdl et potentiel ζ des NLC et des NPLC formulés avec différentes concentrations en TiO₂. Les valeurs de Z-Ave, de Pdl et de potentiel ζ correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 10 mesures expérimentales.

Suspensions	Concentration en TiO ₂ (% m/m)	Z-Ave (nm)	Pdl	Potentiel ζ (mV)
Suspensions de NLC				
NLC #1	0,0	163 ± 1 [§]	0,194 ± 0,013 [§]	- 33,4 ± 1,70 [§]
NLC #2	2,0	265 ± 33 [§]	0,441 ± 0,074 [§]	- 33,8 ± 3,30 [§]
NLC #3	4,0	150 ± 4	0,503 ± 0,051	- 30,4 ± 1,20 [§]
NLC #4	6,0	158 ± 20 [§]	0,409 ± 0,046 [§]	- 36,1 ± 1,10 [§]
NLC #5	8,0	130 ± 3	0,356 ± 0,026	- 31,4 ± 1,50 [§]
NLC #6	9,0	145 ± 2 [§]	0,226 ± 0,026 [§]	- 34,1 ± 1,20 [§]
NLC #7	10,0	170 ± 11 [§]	0,478 ± 0,064	- 40,6 ± 1,50 [§]
NLC #8	12,3	206 ± 12 [§]	0,539 ± 0,030 [§]	- 41,1 ± 2,10 [§]
Suspensions de NPLC				
NPLC #1	0,0	116 ± 1 [¶]	0,158 ± 0,012 [¶]	- 31,7 ± 2,00 [¶]
NPLC #2	2,0	181 ± 8 [¶]	0,483 ± 0,042 [¶]	- 38,5 ± 6,00 [¶]
NPLC #3	4,0	170 ± 52	0,496 ± 0,076	- 39,3 ± 2,10 [¶]
NPLC #4	6,0	201 ± 7 [¶]	0,565 ± 0,054 [¶]	- 41,0 ± 3,10 [¶]
NPLC #5	8,0	152 ± 3	0,502 ± 0,025	- 35,3 ± 0,90 [¶]
NPLC #6	9,0	154 ± 6 [¶]	0,320 ± 0,061 [¶]	- 37,5 ± 1,50 [¶]
NPLC #7	10,0	159 ± 4 [¶]	0,410 ± 0,046	- 37,6 ± 1,50 [¶]
NPLC #8	12,3	135 ± 1 [¶]	0,171 ± 0,018 [¶]	- 30,4 ± 1,20 [¶]

[¶] Significativement différent de la suspension de NLC formulée avec la même concentration en TiO₂ ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

[§] Significativement différent de la suspension de NPLC formulée avec la même concentration en TiO₂ ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

Tableau 12 : Comparaison des propriétés photo-protectrices dans le domaine UV des émulsions, des suspensions de NLC et des suspensions de NPLC formulées avec des concentrations croissantes en TiO₂. Les valeurs correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 mesures expérimentales pour le FPS et la λ_c et de 6 mesures expérimentales pour le FPUVA.

Formulations	Concentration en TiO ₂ (% m/m) [1]	FPS théorique [2]	FPS <i>in vitro</i> [3]	Taux d'augmentation moyen du FPS (%) [4]	FPUVA	λ_c (nm)
Emulsions						
Emulsion #1	0,0	0	1,0 ± 0,0 ^{ns}	0	1,0 ± 0,0 ^{ns}	388 ± 0 ^{ns}
Emulsion #2	2,0	6	4,0 ± 1,0 ^{ns}	0	2,0 ± 0,0 ^{ns}	370 ± 0 ^{ns}
Emulsion #3	4,0	11	11,0 ± 1,0	0	4,6 ± 0,4 ^{ns}	369 ± 0 ^{ns}
Emulsion #4	6,0	17	14,0 ± 1,0 ^{ns}	0	5,3 ± 0,2 ^{ns}	368 ± 1 ^{ns}
Emulsion #5	8,0	22	22,0 ± 4,0 ^{ns}	0	6,6 ± 0,8 ^{ns}	367 ± 1 ^{ns}
Emulsion #6	9,0	25	23,7 ± 3,1 ^{ns}	0	8,4 ± 1,1 ^s	370 ± 1 ^{ns}
Emulsion #7	10,0	28	28,0 ± 2,0 ^{ns}	0	7,6 ± 0,4 ^{ns}	369 ± 0 ^s
Emulsion #8	12,3	34	32,0 ± 1,5 ^{ns}	0	5,6 ± 0,3 ^{ns}	369 ± 0 ^{ns}
Suspensions de NLC						
NLC #1	0,0	0	3,0 ± 0,0 ⁺	-	1,89 ± 0,0 ^{+s}	354 ± 4 ^{+s}
NLC #2	2,0	6	11,0 ± 1,0 ⁺	83	4,05 ± 0,1 ^{+s}	363 ± 1 ⁺
NLC #3	4,0	11	21,0 ± 2,0 ⁺	91	6,15 ± 0,2 ⁺	366 ± 1 ⁺
NLC #4	6,0	17	31,0 ± 3,0 ⁺	82	7,59 ± 0,4 ⁺	366 ± 1 ⁺
NLC #5	8,0	22	44,0 ± 3,0 ⁺	100	9,02 ± 0,1 ^{+s}	365 ± 0 ^{+s}
NLC #6	9,0	25	49,4 ± 2,4 ⁺	71	8,90 ± 0,7 ^s	367 ± 1 ^{+s}
NLC #7	10,0	28	48,0 ± 3,0 ^{+s}	143	9,94 ± 0,4 ⁺	366 ± 1 ^s

NLC #8	12,3	34	51,9 ± 3,3 [§]	53	12,6 ± 1,1 [§]	367 ± 1 [§]
Suspensions de NPLC						
NPLC #1	0,0	0	3,0 ± 0,0 ⁺	-	2,1 ± 0,1 ^{+‡}	372 ± 6 ^{+‡}
NPLC #2	2,0	6	11,0 ± 2,0 ⁺	83	4,0 ± 0,3 ^{+‡}	363 ± 0 ⁺
NPLC #3	4,0	11	21,0 ± 2,0 ⁺	91	6,0 ± 0,2 ⁺	365 ± 1 ⁺
NPLC #4	6,0	17	30,0 ± 2,0 ⁺	76	7,7 ± 0,7 ⁺	367 ± 1 ⁺
NPLC #5	8,0	22	43,0 ± 2,0 ⁺	96	9,3 ± 0,3 ^{+‡}	366 ± 1 ^{+‡}
NPLC #6	9,0	25	48,5 ± 3,3 ⁺	94	11,4 ± 0,4 ^{+‡}	368 ± 0 ^{+‡}
NPLC #7	10,0	28	51,0 ± 3,0 ^{+‡}	82	9,9 ± 0,2 ⁺	365 ± 0 ^{+‡}
NPLC #8	12,3	34	59,5 ± 3,8 ^{+‡}	75	14,5 ± 0,4 ^{+‡}	369 ± 0 ^{+‡}

$$[2] = [1] \times 2,75$$

$$[4] (\%) = \{ ([3] - [2]) / [2] \} \times 100$$

⁺ Significativement différent de l'émulsion formulée avec la même concentration en TiO₂ (p ≤ 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

[‡] Significativement différent de la suspension de NLC formulée avec la même concentration en TiO₂ (p ≤ 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

[§] Significativement différent de la suspension de NPLC formulée avec la même concentration en TiO₂ (p ≤ 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney).

Les suspensions de NLC et de NPLC ne contenant pas de TiO_2 (Suspensions #1) ont un FPS de 3 contrairement à celui de l'émulsion formulée sans TiO_2 (Emulsion #1) qui est de 1. Une formulation montrant un FPS de 1 n'apporte aucune photo-protection cutanée. La structure physique des NLC et des NPLC ainsi que les constituants de leur matrice lipidique pourraient leur conférer des propriétés filtrantes dans le domaine UV [152, 154, 156]. La cire de carnauba, qui contient des cinnamates et la PCL qui a une structure cristalline sont les deux constituants susceptibles de filtrer le rayonnement UV.

Jusqu'à une concentration en TiO_2 de 9 %, le FPS des suspensions de NLC et de NPLC ne diffère pas significativement et elles présentent donc la même capacité à augmenter le FPS (Suspensions #1 à #6). A partir de 10 % de TiO_2 , les suspensions de NPLC ont un FPS significativement supérieur à celui des suspensions de NLC (Suspensions #7). Les NPLC présentent donc un potentiel booster sur le FPS qui est plus important que celui des NLC (Figure 22). Avec une concentration en nanoparticules de TiO_2 de 10 % (Suspensions #7), un FPS de $51,0 \pm 3$ est obtenu avec la suspension de NPLC alors qu'à concentration égale en TiO_2 , la suspension de NLC a un FPS de 48 ± 3 . La différence entre le FPS des suspensions de NLC et de NPLC est encore plus nette avec une concentration en TiO_2 de 12,3 % (Suspensions #8). En effet, le FPS de la suspension de NLC est de $51,9 \pm 3,3$ tandis que celui de la suspension de NPLC est de $59,5 \pm 3,8$. Les suspensions de NPLC semblent donc plus intéressantes pour atteindre de hauts FPS avec de faibles concentrations en TiO_2 . De plus, le FPUVA des suspensions de NPLC a tendance à être supérieur à celui des NLC.

Selon la réglementation européenne, un écran solaire doit avoir un FPUVA d'au moins le tiers du FPS ainsi qu'une λ_c d'au moins 370 nm pour garantir une photo-protection large spectre étendue dans le domaine UVA. [33]. Les émulsions et les suspensions ont toutes des FPUVA ainsi que des λ_c inférieurs aux valeurs minimales requises pour revendiquer la valeur du FPS qui a été évaluée.

La stabilité du FPS des émulsions témoins, des suspensions de NLC et des suspensions de NPLC formulées avec 0, 2, 4, 6, 8 et 10 % de TiO_2 (formulations #1, #2, #3, #4, #5 et #7) dans le temps a été étudiée en conditions de vieillissement accéléré en plaçant les formulations dans une enceinte climatique à 50°C sous une HR de 75 % pendant 1 mois. Le FPS des émulsions et des suspensions de NPLC ne varie pas significativement au cours du temps passé dans l'enceinte climatique (Figures 23 et 25). Cependant, le FPS obtenu avec les suspensions de NLC formulées avec 4, 6, 8 et 10 % de TiO_2 (Suspensions #1, #2, #3, #4, #5 et #7) chute significativement au cours du temps passé à 50°C et 75 % d'HR (Figure 24). Après quatre semaines de vieillissement accéléré, le FPS de ces suspensions de NLC chute de plus de 5 % de sa valeur initiale et jusqu'à 32 % pour la suspension de NLC formulée avec 8 % de TiO_2 . Il se pourrait que les NLC subissent des modifications au sein de leur structure modifiant les interactions entre elles et les nanoparticules de TiO_2 ce qui conduit à la perte du pouvoir booster des NLC sur le FPS. Les NPLC ne semblent pas subir ces mêmes modifications structurales qui pourraient expliquer la chute du FPS au cours du temps. Des études mentionnent que les particules de TiO_2 ont la capacité de s'associer à la PCL via des interactions de Van der Waals [167]. L'interaction PCL- TiO_2 pourrait expliquer la plus grande

stabilité des suspensions de NPLC contrairement à celle des suspensions de NLC exemptes de PCL. De plus, une étude a révélé que la PCL permettait une meilleure dispersion des particules de TiO_2 [167]. La bonne dispersion des nanoparticules de TiO_2 dans la membrane de PCL pourrait leur permettre de mieux refléter le rayonnement UV incident.

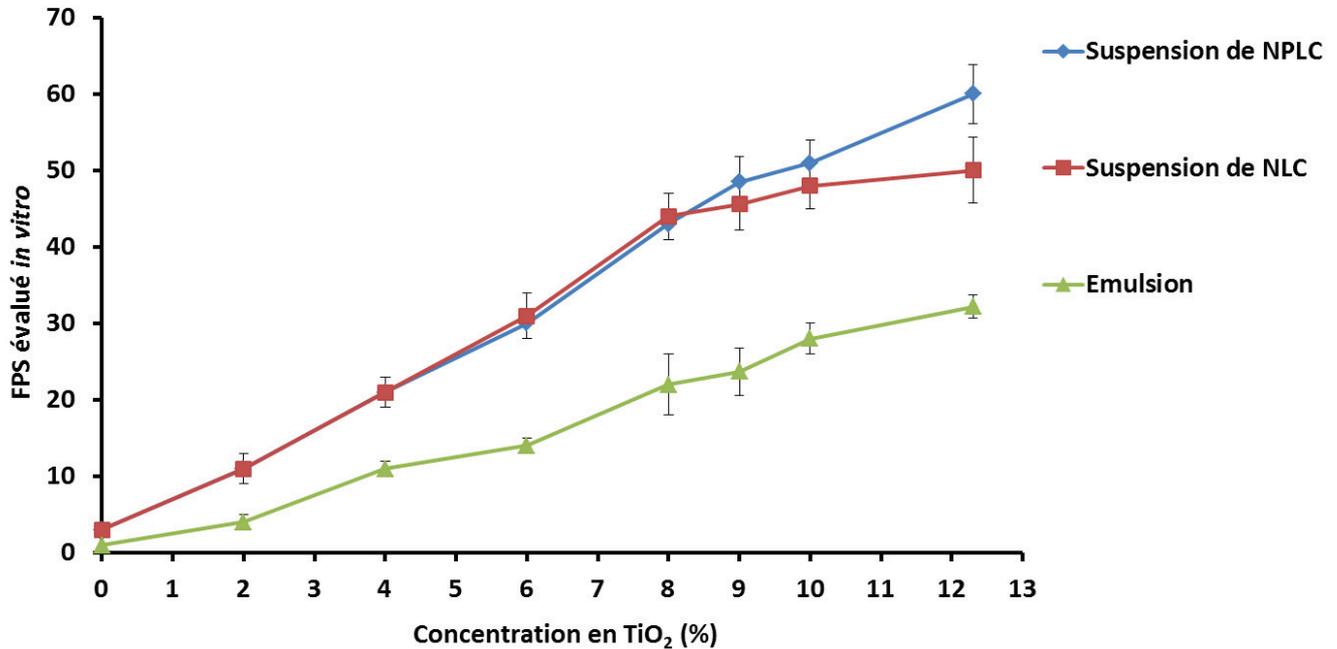


Figure 22 : Evolution du FPS en fonction de la concentration en TiO_2 formulée dans une émulsion, une suspension de NLC et une suspension de NPLC. Chaque point correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 mesures expérimentales.

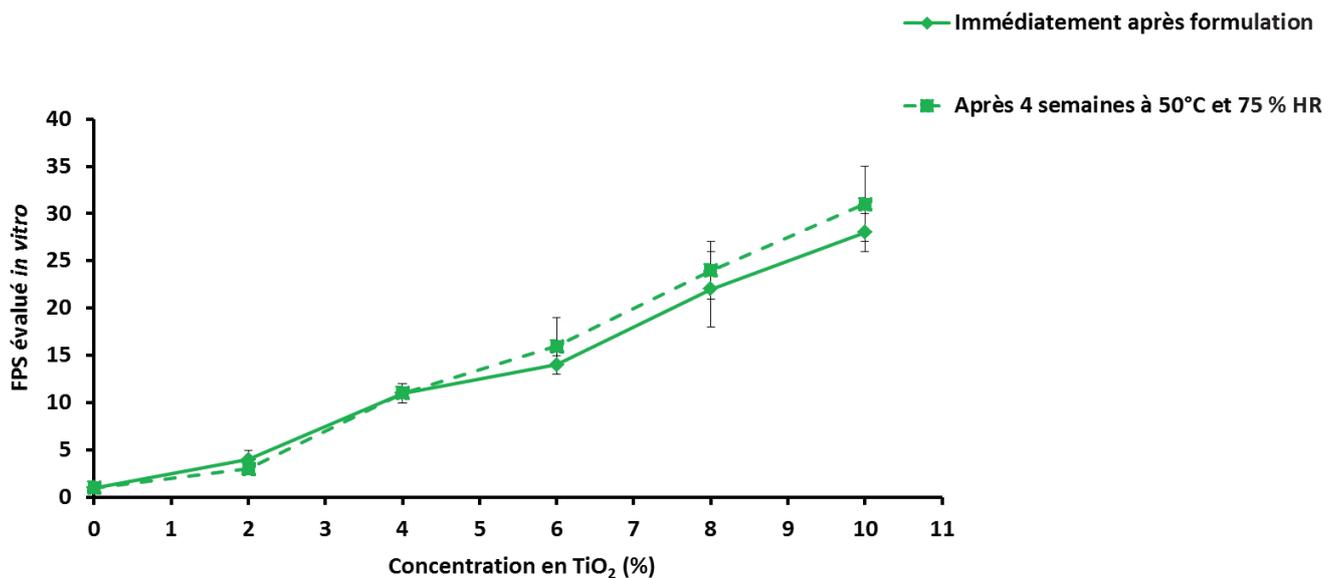


Figure 23 : Evolution du FPS en conditions de vieillissement accéléré d'une émulsion formulée avec différentes concentrations en nanoparticules de TiO_2 . Chaque point correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 mesures expérimentales.

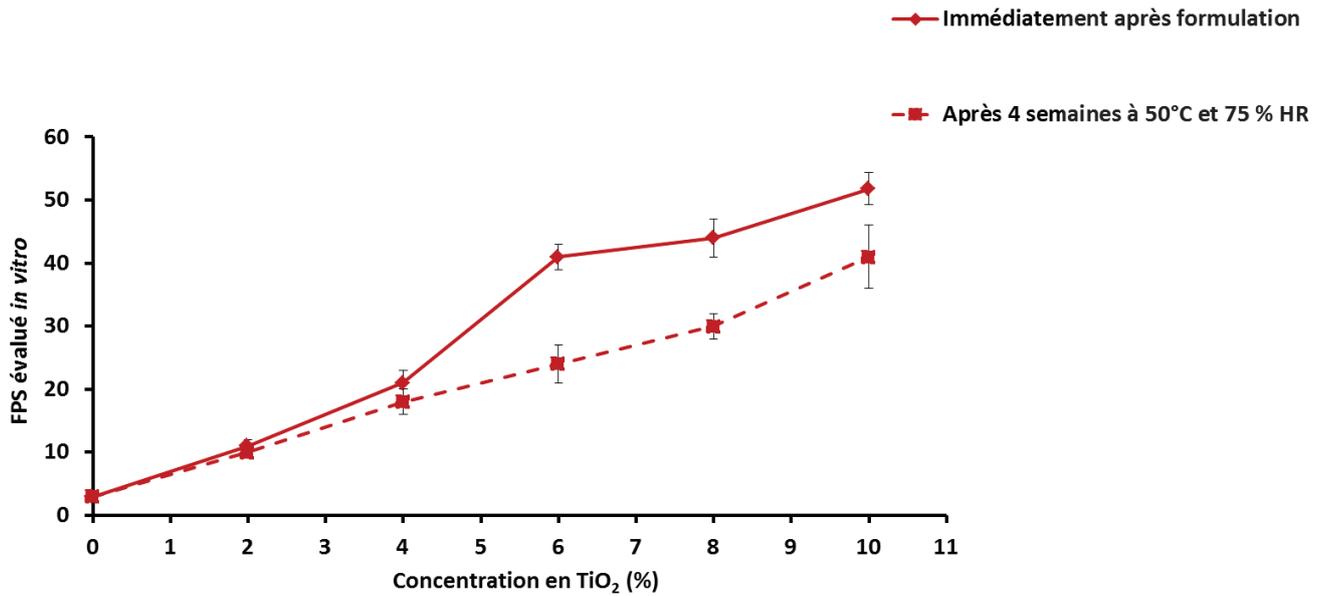


Figure 24 : Evolution du FPS en conditions de vieillissement accéléré d'une suspension de NLC formulée avec différentes concentrations en nanoparticules de TiO₂. Chaque point correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 mesures expérimentales.

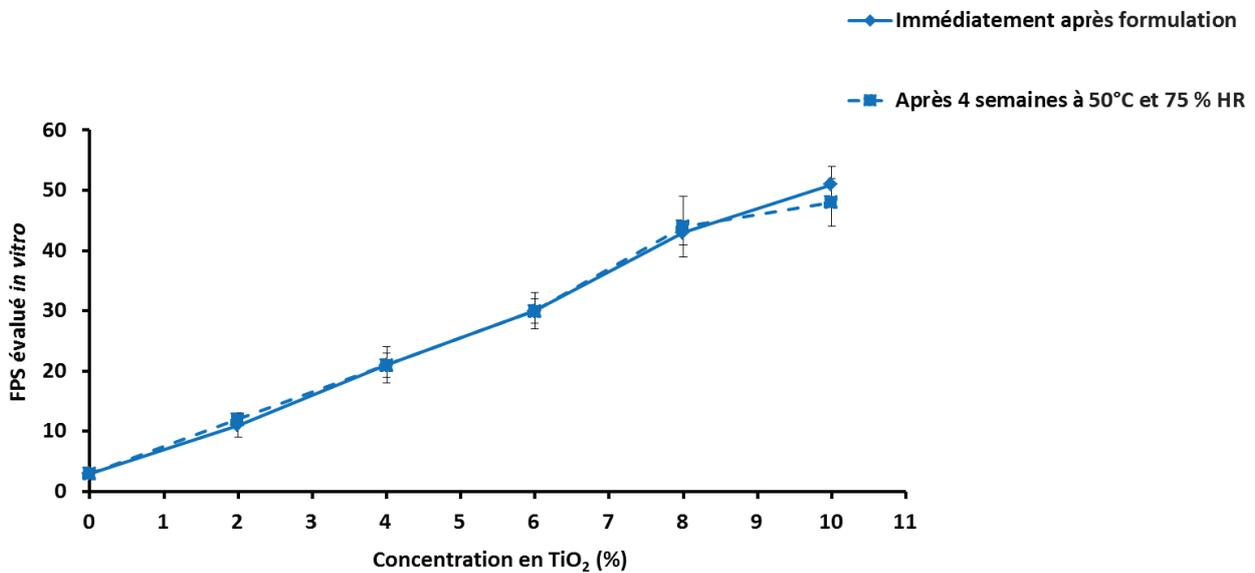


Figure 25 : Evolution du FPSe en conditions de vieillissement accéléré d'une suspension de NPLC formulée avec différentes concentrations en nanoparticules de TiO₂. Chaque point correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 mesures expérimentales.

Le FPS des suspensions de NLC et de NPLC contenant 12,3 % de TiO₂ (Suspensions #8) a été évalué *in vivo*. Les résultats sont reportés sur la Figure 26. Le FPS de la suspension de NLC évalué *in vitro* est de $51,9 \pm 3,3$ tandis qu'*in vivo*, la même suspension montre un FPS de

35,9 ± 6,9 différant significativement de la valeur du FPS évalué *in vitro*. Le FPS de la suspension de NPLC évalué *in vitro* est de 59,5 ± 3,8 tandis qu'*in vivo*, il est évalué à 50,8 ± 8,7 ce qui ne diffère pas significativement de la valeur obtenue *in vitro*. Ces résultats semblent montrer que les suspensions de NLC ne se comportent pas de la même façon lorsqu'elles sont étalées sur un support inerte (i.e. plaques de PMMA) ou sur de la peau.

Cette première étude visant à comparer l'efficacité des suspensions de NLC et de NPLC à augmenter le pouvoir filtrant des nanoparticules de TiO₂ a permis de montrer que les suspensions de NLC étaient moins adaptées pour formuler un écran solaire que les suspensions de NPLC. La matrice lipidique des NPLC comporte de la PCL qui est un polymère hydrophobe plutôt rigide puisqu'elle possède un point de fusion de 56°C. La matrice lipidique des NLC ne comprend pas de PCL. La stabilité du FPS dans le temps des suspensions de NPLC laisse supposer que les nanoparticules de TiO₂ s'associent de façon stable à la structure des NPLC contrairement à celle des NLC. La présence de PCL semble donc influencer la stabilité du FPS des suspensions de nanoparticules lipidiques dans le temps. De même, le FPS obtenu *in vivo* avec la suspension de NPLC ne diffère pas significativement de celui qui a été évalué *in vitro* contrairement à la suspension de NLC. Les suspensions de NLC ne semblent donc pas conférer une photo-protection cutanée se maintenant *in vivo*. De plus, le mode opératoire de formulation des NPLC est plus simple que celui des suspensions de NLC puisqu'il ne nécessite pas d'étape d'homogénéisation ultrasonique ce qui est très intéressant pour le passage à l'échelle industrielle (Figures 19 et 20). Ce sont donc les suspensions de NPLC qui ont été étudiées par la suite pour formuler les émulsions solaires à base de nanoparticules lipidiques.

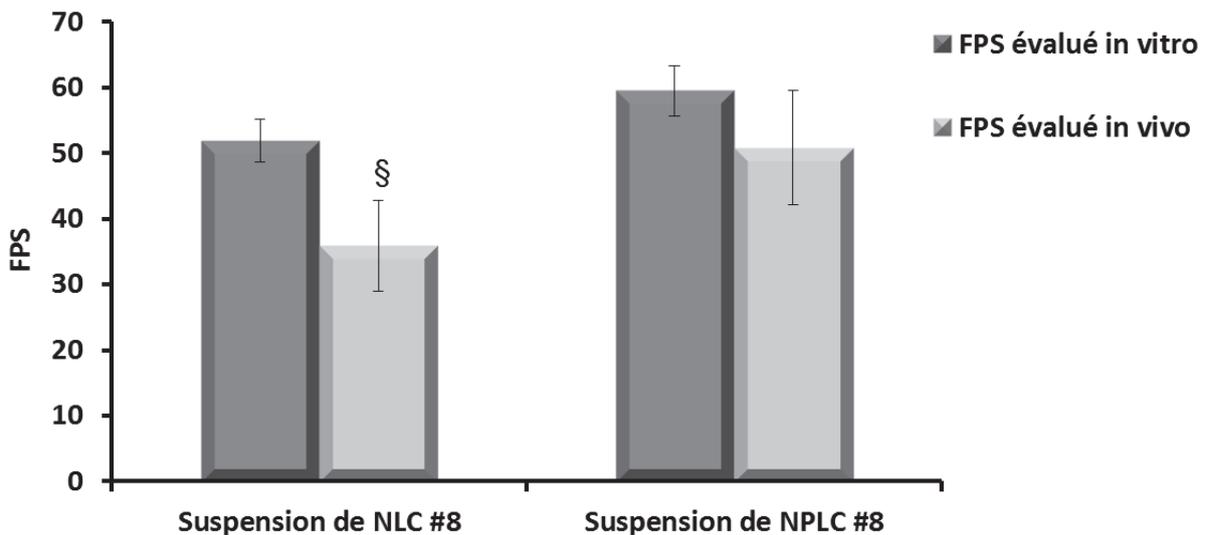


Figure 26 : Comparaison des FPS évalués *in vitro* et *in vivo* des suspensions de NLC et de NPLC formulées avec 12,3 % de TiO₂ (Suspensions #8). Chaque barre correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 (pour le FPS évalué *in vitro*) et 10 (pour le FPS évalué *in vivo*) mesures expérimentales.

§ Significativement différent du FPS évalué *in vitro* ($p \leq 0,05$, Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

Les suspensions de NPLC ne peuvent pas être utilisées en l'état pour formuler un écran solaire. En effet, ces suspensions ne laissent pas un fini suffisamment agréable sur la peau à l'étalement pour que les utilisateurs d'écrans solaires aient envie d'appliquer et de réappliquer la formulation sur leur peau. Les suspensions de NPLC ont donc été intégrées dans des émulsions. Différentes suspensions de NPLC comprenant différentes concentrations en filtres UV inorganiques ont été formulées en vue d'être intégrées à des émulsions solaires. Le Tableau 13 présente les propriétés de granulométrie (*Z-Ave*, et *Pdl*) ainsi que la charge électrostatique (potentiel ζ) de ces différentes suspensions. Le *Z-Ave* des NPLC des suspensions #9 à #14 est inférieur à 200 nm. Les *Pdl* sont tous compris entre 0,07 et 0,7 ce qui indique la polydispersité de ces suspensions. Les potentiels ζ sont tous négatifs et supérieurs à $| 30 \text{ mV} |$ indiquant un potentiel de stabilité satisfaisant.

La suspension de NPLC #9 comprenant 9 % de nanoparticules de TiO_2 présente un FPS de $51,8 \pm 5,8$ qui est potentiellement intéressant pour formuler une émulsion solaire à haut FPS (i.e. de FPS 30 ou 50) (Tableau 14). Cependant, cette suspension ne montre pas un FPUVA et une λ_c suffisamment importants pour garantir des propriétés anti-UV efficaces à l'émulsion solaire finale. En effet, le FPUVA de la suspension NPLC #9 est de $11,6 \pm 0,5$ et sa λ_c de $370,6 \pm 0,6$ nm. Malgré son FPS de $51,5 \pm 5,8$, cette suspension ne pourrait revendiquer qu'un FPS de 30 si elle venait à être commercialisée en l'état.

Une suspension de NPLC comprenant un mélange de TiO_2 et de CeO_2 a donc été formulée (Suspension #10). Le CeO_2 est un minéral aux propriétés filtrantes dans le domaine UV connues mais qui n'est cependant pas listé comme filtre UV [14]. Ce minéral possède un pouvoir filtrant qui s'étend dans le domaine UVA et qui peut donc être complémentaire à celui des nanoparticules de TiO_2 qui filtrent principalement dans le domaine UVB. Certaines études montrent même que l'association $\text{TiO}_2 / \text{CeO}_2$ est plus intéressante en termes d'efficacité que l'association $\text{TiO}_2 / \text{ZnO}$ qui est l'association de filtres UV inorganiques la plus utilisée dans les écrans solaires [164]. Les données publiées par le fournisseur des particules de CeO_2 montrent que l'incorporation d'1 % de particules de CeO_2 dans une émulsion H/E permet d'obtenir un FPS de 0,85 [168]. La suspension NPLC #10 comprenant 3,075 % de TiO_2 et 8 % de CeO_2 montre un FPS inférieur à celui de la suspension de NPLC #9 ne comprenant que du TiO_2 mais un FPUVA et une λ_c supérieurs. Ces deux suspensions de NPLC pourraient donc être associées et agir de manière complémentaire afin de garantir des propriétés photo-protectrices optimales dans le domaine UV.

La stabilité dans le temps de ces deux suspensions de NPLC a été suivi pendant dix-huit mois à température ambiante. En effet, ces suspensions doivent être stables pour être incorporées dans les émulsions solaires afin de garantir la stabilité des propriétés filtrantes de ces émulsions dans le temps. Les résultats concernant la stabilité du *Z-Ave* des NPLC dans le temps sont présentés sur la Figure 27. La figure 28 montre le suivi de la valeur du potentiel ζ de ces mêmes suspensions au cours du temps. Les valeurs de potentiel ζ montrent des variations significatives au cours du temps mais elles ne descendent jamais en dessous de $| 25 \text{ mV} |$ ce qui montre qu'elles conservent une charge électrostatique

suffisamment élevée pour éviter l'agrégation des particules en suspension. Le Z-Ave des NPLC contenus dans les deux suspensions varie légèrement mais n'influence pas leur pouvoir photo-protecteur. En effet, sur la Figure 29, on peut voir que le FPS des deux suspensions, après dix-huits mois passés à température ambiante, ne varie pas significativement de celui évalué au début de l'étude. La combinaison des suspensions de NPLC #9 et #10 dans une émulsion solaire pourrait permettre de formuler un écran solaire filtrant suffisamment dans les domaines UVB et UVA.

Les émulsions solaires comportent d'autres constituants que les suspensions de NPLC pour garantir de bonnes propriétés d'étalement de la formulation sur la peau. Afin de pouvoir agrémente l'émulsion solaire finale avec ces composés sans diminuer la concentration en NPLC incorporée, des suspensions de NPLC concentrées en nanocapsules ont été formulées en diminuant le pourcentage de leur phase aqueuse (Suspensions #11 et #12). Le Z-Ave des NPLC de ces suspensions concentrées en nanocapsules diffère légèrement de celle des suspensions de NPLC non concentrées en nanocapsules (Tableau 13). En effet, les suspensions #9 et #11 montrent un Z-Ave respectivement de 129 ± 2 nm et de 137 ± 2 nm tandis que les suspensions #10 et #12 montrent des Z-Ave respectifs de 192 ± 17 nm et 164 ± 3 nm. Ces différences significatives n'influencent pas le pouvoir photo-protecteur des deux suspensions de NPLC (Tableau 14). En effet, le FPS des suspensions de NPLC concentrées en nanocapsules est significativement augmenté par rapport à celui des suspensions de NPLC classiques ($51,5 \pm 5,8$ pour la suspension #9 contre $71,4 \pm 7,1$ pour la suspension #11 et $30,2 \pm 5,4$ pour la suspension #10 contre $45,8 \pm 3,7$ pour la suspension #12).

Le potentiel ζ des suspensions de NPLC concentrées en nanocapsules est supérieur à $|40 \text{ mV}|$ et leur *Pdl* est inférieur à 0,7 ce qui indique qu'elles sont peu susceptibles de subir des phénomènes d'agrégation au cours du temps et ce malgré une plus forte concentration en NPLC en suspension. Les valeurs plus élevées de potentiel ζ relevées pour les suspensions de NPLC concentrées en nanoparticules lipidiques par rapport aux suspensions de NPLC non concentrées pourraient être dues à l'augmentation de la concentration en PCL. En effet, une étude a montré que les polymères tels que la PCL associés à des tensio-actifs non-ioniques, confèrent une charge négative aux particules en suspension [136]. Toutes les suspensions de NPLC étudiées présentent une augmentation du FPS d'au minimum 91 % par rapport au FPS théorique calculé en fonction des concentrations en TiO_2 et en CeO_2 incorporées.

Tableau 13 : Composition et propriétés physiques des suspensions de nanocapsules utilisées pour formuler les émulsions solaires. Chacune des valeurs correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 10 mesures expérimentales.

Suspensions	Z-Ave (nm)	Pdl	Potentiel ζ (mV)
Suspensions de NPLC formulées avec du TiO₂			
NPLC #9	129 ± 2 ^{bcdef}	0,172 ± 0,021 ^{bdef}	- 32,8 ± 0,8 ^{bcdef}
Suspensions de NPLC formulées avec du TiO₂ et du CeO₂			
NPLC #10	192 ± 17 ^{acdef}	0,253 ± 0,041 ^{acde}	- 30,1 ± 0,7 ^{acdef}
Suspensions de NPLC concentrées en nanocapsules			
NPLC #11	137 ± 2 ^{abdef}	0,159 ± 0,011 ^{bdef}	- 42,6 ± 1,3 ^{abdef}
NPLC #12	164 ± 3 ^{abcef}	0,224 ± 0,007 ^{abce}	- 54,5 ± 2,7 ^{abcef}
Suspensions de NPLC produites en lot pilote de 12 kg			
NPLC #13	132 ± 1 ^{abcdf}	0,137 ± 0,020 ^{abcdf}	- 54,5 ± 2,7 ^{abcdf}
NPLC #14	193 ± 2 ^{abcde}	0,233 ± 0,014 ^{ace}	- 46,9 ± 2,3 ^{abcde}

^a Significativement différent de NPLC #9 (p < 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

^b Significativement différent de NPLC #10 (p < 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

^c Significativement différent de NPLC #11 (p < 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

^d Significativement différent de NPLC #12 (p < 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

^e Significativement différent de NPLC #13 (p < 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

^f Significativement différent de NPLC #14 (p < 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

Tableau 14 : Propriétés photo-protectrices dans le domaine UV des suspensions de NPLC utilisées pour formuler les émulsions solaires. Les suspensions sont classées dans deux catégories : suspensions de NPLC formulées avec du TiO₂ et suspensions de NPLC formulées avec du TiO₂ et du CeO₂. Les valeurs correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 (pour le FPS et la λ_c) et de 6 (pour le FPUVA) mesures expérimentales.

Suspensions	Concentration en TiO ₂ (%) [1]	Concentration en CeO ₂ (%) [2]	FPS théorique moyen [3]	FPS <i>in vitro</i> [4]	Taux d'augmentation moyen du FPS (%) [5]	FPUVA	λ _c (nm)
Suspension de NPLC formulées avec du TiO₂							
NPLC #9	9	0	25	51,5 ± 5,8 ^{bc}	106	11,6 ± 0,5 ^{bc}	370,6 ± 0,6 ^{bc}
NPLC #11	11,71	0	32	71,4 ± 7,1 ^{ac}	123	14,1 ± 0,7 ^a	370,1 ± 0,3 ^{ac}
NPLC #13	11,71	0	32	85,1 ± 6,2 ^{ab}	166	14,7 ± 1 ^a	369,2 ± 0,8 ^{ab}
Suspension de NPLC formulées avec du TiO₂ et du CeO							
NPLC #10	3,075	8	15	30,2 ± 5,4 ^{ef}	101	12,2 ± 1,2 ^{ef}	376,9 ± 0,4
NPLC #12	5,68	10,26	24	45,8 ± 3,7 ^{df}	91	16,2 ± 0,5 ^{df}	376,9 ± 0,4
NPLC #14	5,68	10,26	24	61,4 ± 11,1 ^{de}	156	18,8 ± 1,2 ^{de}	376,3 ± 1,3

$$[3] = ([1] \times 2,75) + ([2] \times 0,85)$$

$$[5] = \{ ([4] - [3]) / [3] \} \times 100$$

Pour les suspensions de NPLC formulées avec du TiO₂:

^a Significativement différent de NPLC #9

^b Significativement différent de NPLC #11

^c Significativement différent NPLC #13

Pour les suspensions de NPLC formulées avec du TiO₂ et du CeO₂:

^d Significativement différent de NPLC #10

^e Significativement différent de NPLC #12

^f Significativement différent de NPLC #14

(p ≤ 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

(p ≤ 0,05; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

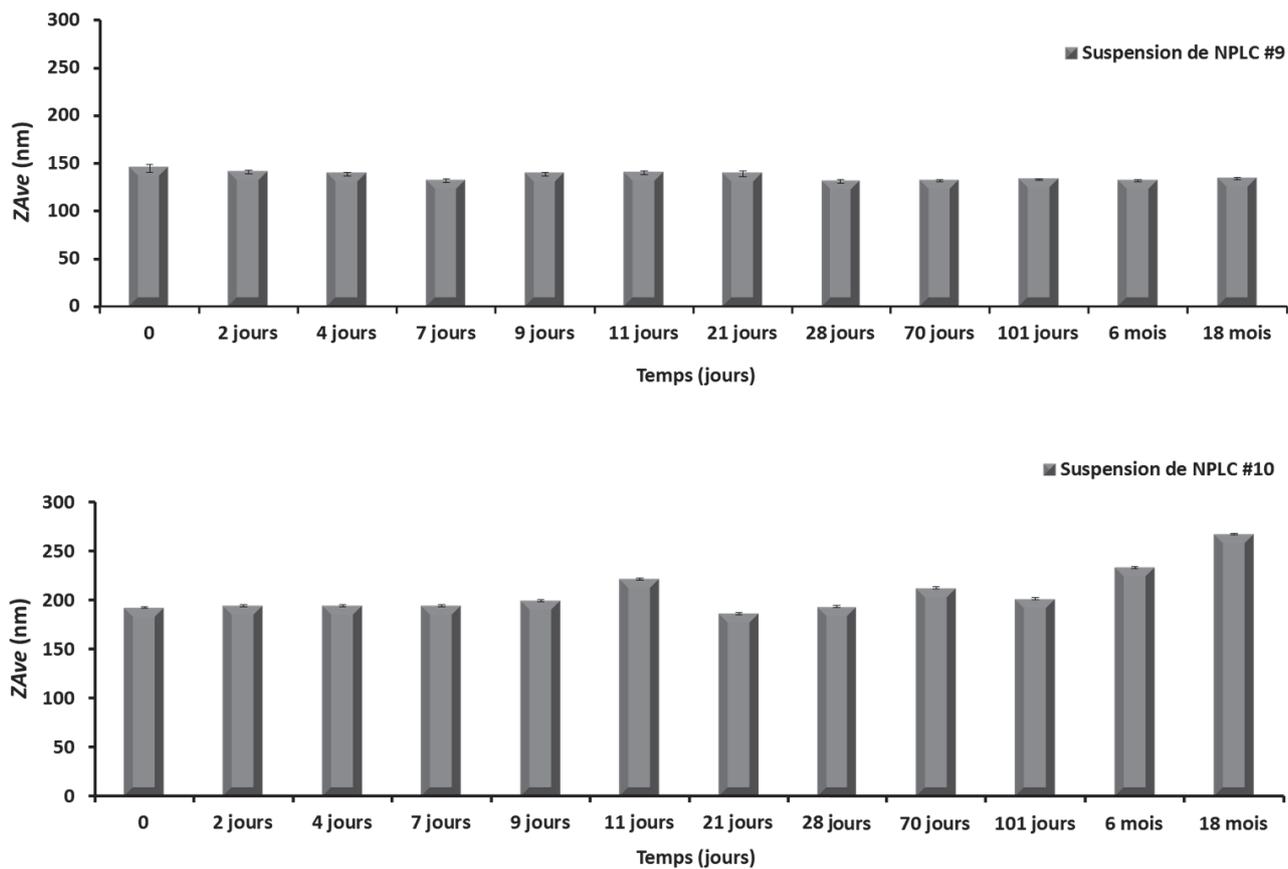


Figure 27: Suivi du ZAve des suspensions de NPLC #9 et #10 pendant 18 mois à température ambiante. Chaque barre correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 10 mesures expérimentales.

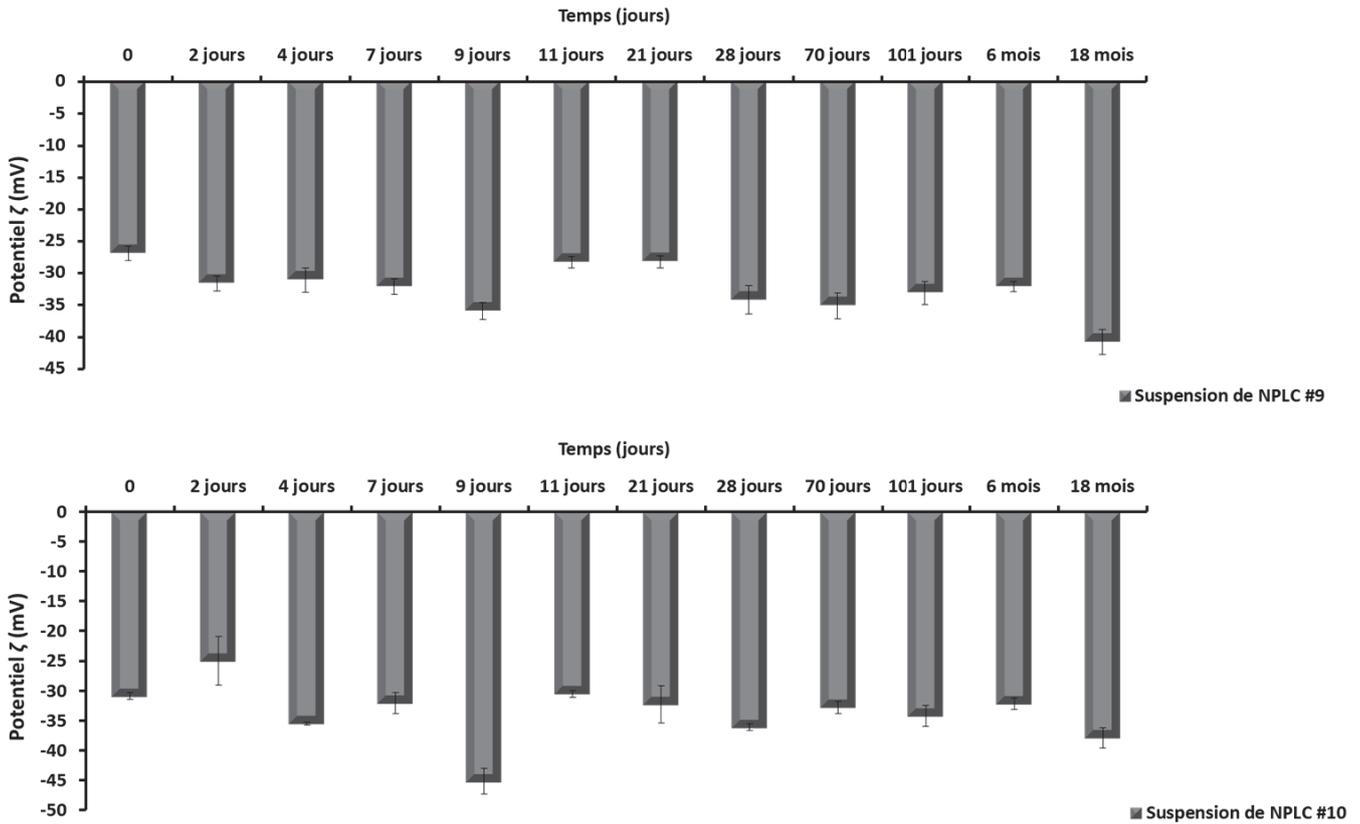


Figure 28: Suivi du potentiel ζ des suspensions de NPLC #9 et #10 pendant 18 mois à température ambiante. Chaque barre correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 10 mesures expérimentales.

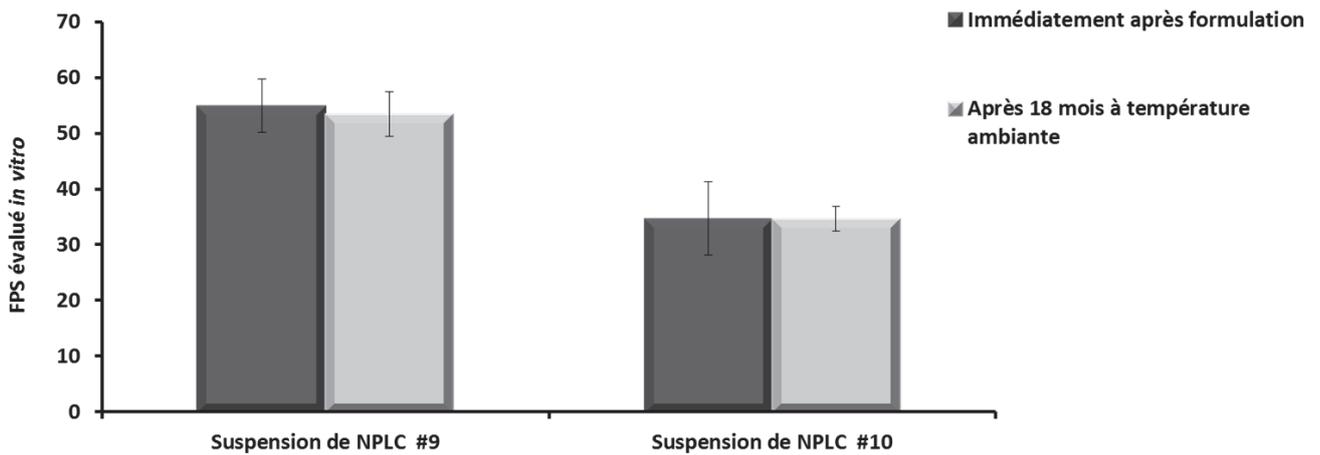


Figure 29 : Suivi du FPS des suspensions de NPLC #9 et #10 pendant dix-huit mois à température ambiante. Chaque barre correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 mesures expérimentales.

Le Tableau 15 présente cinq émulsions solaires parmi lesquelles quatre contiennent des suspensions de NPLC dans leur composition. Les émulsions solaires #9 et #10 ainsi que les émulsions #11, #12 et #13 comportent respectivement un même noyau de composés, non filtrants dans le domaine UV qui n'est pas décrit pour des raisons de confidentialité. Ce noyau de composés comprend un émulsionnant, des agents de texture, une fragrance et un conservateur. En parallèle de ce noyau de composés, il y a les composés filtrants représentés par les suspensions de NPLC, le CeO₂ et l'huile de Karanja.

L'huile de Karanja est extraite des graines d'un arbre : le *Millettia pinnata*. Cette huile comprend un mélange d'acides gras (palmitique, stéarique, oléique, linoléique, linoléique et béhénique) et également 2 à 3 % de karanjin et entre 0,4 et 0,7 % de pongamol qui lui procurent des propriétés filtrantes intéressantes dans les domaines UVB et UVA. La Figure 30 montre le spectre d'absorption dans le domaine UV de l'huile de Karanja. Cette huile montre un FPS de 21 ± 2 , un FPUVA de $8,38 \pm 0,32$ et une λ_c de $370 \pm 0,4$ nm ce qui la rend particulièrement intéressante pour formuler une émulsion solaire et améliorer son pouvoir filtrant dans le domaine UVA. Cette huile a donc été intégrée à la composition des émulsions solaires afin d'augmenter leur pouvoir photo-protecteur dans le domaine UVA.

L'émulsion solaire #9, formulée avec les suspensions de NPLC #9 et #10 montre un FPS de $51,6 \pm 6,9$, un FPUVA de $17 \pm 1,6$ et une λ_c supérieure à $376,3 \pm 0,5$ nm. Cette émulsion pourrait donc être commercialisée comme écran solaire affichant un indice de photoprotection de 50 puisque la valeur de son FPUVA est plus du tiers de celle du FPS et que sa λ_c est supérieure à 370 nm. Le FPS de cette émulsion a donc également été évalué *in vivo* sur 10 individus. Les FPS évalués *in vitro* et *in vivo* ne diffèrent pas significativement l'un de l'autre (Figure 31). Cette émulsion pourrait donc être commercialisée comme écran solaire affichant un FPS de 50.

Afin de caractériser le rôle filtrant dans le domaine UV des suspensions de NPLC incorporées dans les émulsions solaires, l'émulsion #10 qui comprend exactement les mêmes constituants que l'émulsion #9, avec les mêmes concentrations en filtres UV, mais sans suspensions de NPLC a été formulée en parallèle (Tableau 15). Le FPS ainsi que le FPUVA de cette émulsion sont significativement plus bas que ceux de l'émulsion #9. En effet, le FPS de l'émulsion #10 est inférieur de 21 point FPS par rapport à l'émulsion #9 formulée avec des suspensions de NPLC, ce qui correspond à une perte de 41 % de la valeur du FPS. Le FPUVA chute de 3,5 points FPUVA ce qui correspond à une perte de 21 % de la valeur de la protection UVA. Seule la λ_c est un peu plus élevée pour l'émulsion #10 ce qui est dû au fait que l'absorbance dans les domaines UVB et UVA a chuté de manière homogène. Le FPS mesuré de l'émulsion #9 est plus élevé de 135 % par rapport au FPS théorique contre 39 % pour l'émulsion #10. Ces résultats montrent que les suspensions de NPLC jouent un rôle majeur dans l'efficacité de l'émulsion solaire.

L'utilisation de suspensions de NPLC concentrées en nanocapsules a permis de formuler des émulsions solaires avec des concentrations en suspensions de NPLC plus faibles tout en conservant de hautes propriétés anti-UV. Une émulsion solaire de FPS $36,2 \pm 2,3$ (émulsion

#11) et une autre de FPS 66,5 ± 6,1 (émulsion #12) pouvant respectivement revendiquer des FPS de 30 et 50 ont pu être développées. L'augmentation de la valeur de leur FPS comparée à celle théoriquement calculée est respectivement de 126 % et 202 % pour l'émulsion de FPS 36,2 et pour celle de FPS 66,5.

Tableau 15 : Composition et propriétés photo-protectrices des émulsions solaires formulées à partir des suspensions de NPLC. Les valeurs correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 (pour le FPS et le λ_c) et de 6 (pour le FPUVA) mesures expérimentales.

Emulsions	Concentration en TiO ₂ (%) [1]	Concentration en CeO ₂ (%) [2]	FPS théorique moyen [3]	FPS <i>in vitro</i> [4]	Taux d'augmentation moyen du FPS (%) [5]	FPUVA	λ_c (nm)
Emulsion #9	6,40	6,44	23	51,6 ± 6,9	124	17,0 ± 1,6	376,3 ± 0,5
Emulsion #10	6,40	6,44	23	30,6 ± 4,7	33	13,5 ± 1,1	378,9 ± 0,5
Emulsion #11	5,54	1,54	17	36,2 ± 2,3	113	10,1 ± 0,2	371,3 ± 0,5
Emulsion #12	6,30	6,23	23	66,5 ± 6,1	189	17,6 ± 1,0	374,7 ± 0,5
Emulsion #13	6,30	6,23	23	55,3 ± 3,3	140	16,8 ± 0,7	375,5 ± 0,5

$$[3] = ([1] \times 2,75) + ([2] \times 0,85)$$

$$[5] = \{ ([4] - [3]) / [3] \} \times 100$$

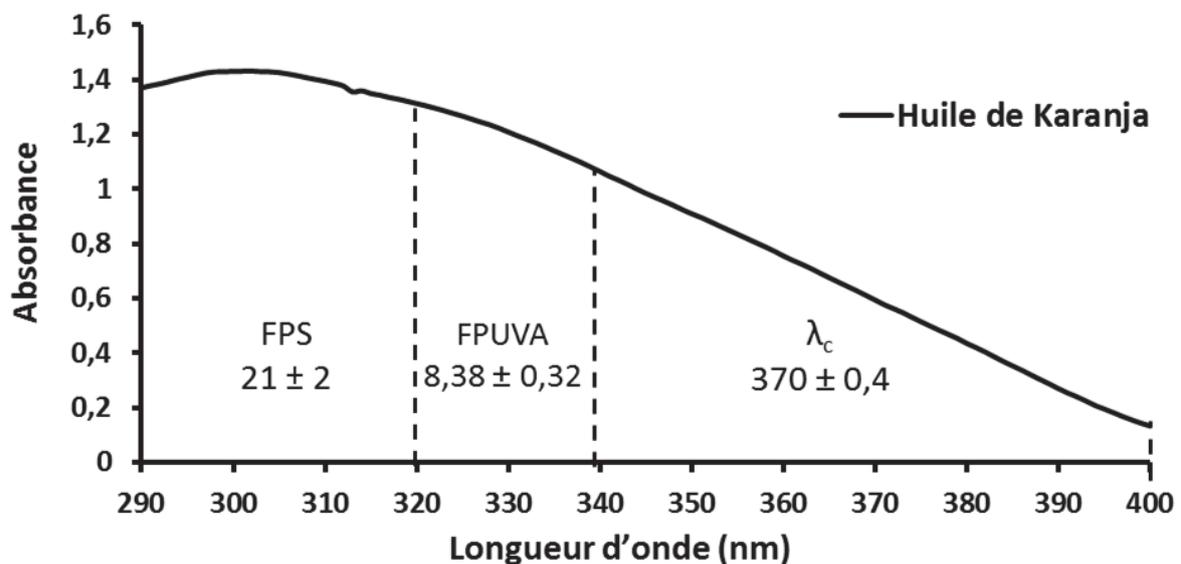


Figure 30 : Spectre d'absorption dans le domaine UV de l'huile de Karanja.

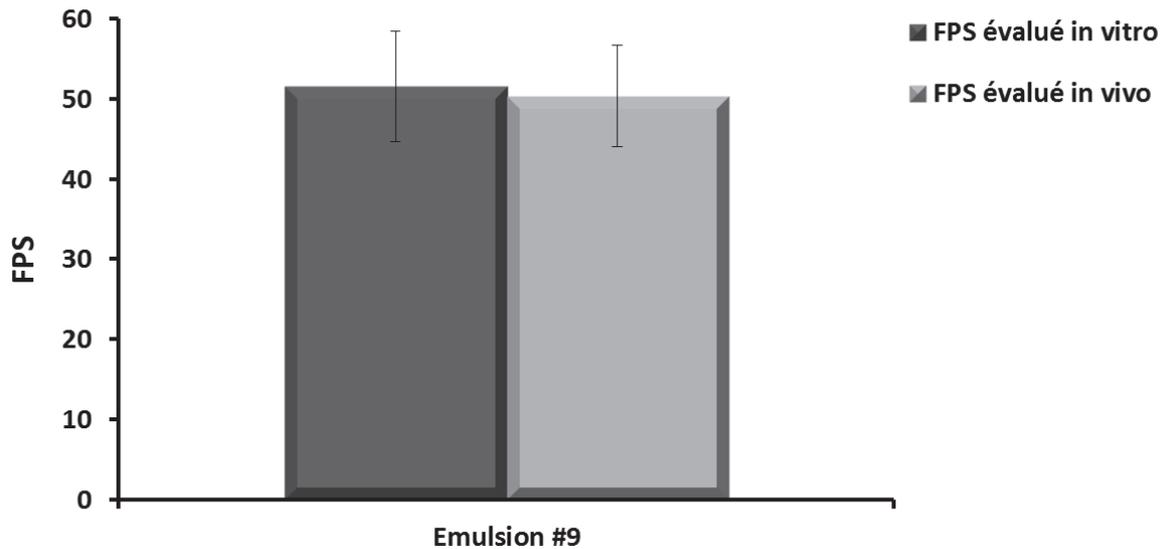


Figure 31: Comparaison des FPS évalués *in vitro* et *in vivo* de l'émulsion solaire #9. Chaque barre correspond à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 18 (pour le FPS évalué *in vitro*) et 10 (pour le FPS évalué *in vivo*) mesures expérimentales.

Afin de mettre au point le mode opératoire de production industrielle des suspensions de NPLC et de l'émulsion solaire FPS 50, un lot Pilote de 25 kg d'émulsion solaire a été réalisé par une entreprise spécialisée. En comparant les propriétés physiques des suspensions concentrées en NPLC formulées au laboratoire (Suspensions #11 et #12) et des lots pilotes de 12 kg formulés en industrie (Suspensions #13 et #14), on remarque que les suspensions de NPLC formulées en conditions industrielles ont un *Z-Ave* avec un écart-type plus restreint que celui des suspensions de NPLC formulées au laboratoire (Tableau 12). Leur *Pdl* est significativement plus bas que celui des suspensions formulées au laboratoire ce qui montre que les tailles sont plus homogènes et qu'il y a moins de polydispersion. La valeur de leur potentiel ζ , supérieure à $| 50 \text{ mV} |$, indique que les suspensions sont peu susceptibles de subir des phénomènes d'agrégation. Le FPS des suspensions #13 et #14 formulées en conditions industrielles est significativement supérieur à celui des suspensions #11 et #12 formulées au laboratoire (Tableau 14). De plus, le FPUVA de la suspension #14 est significativement supérieur à celui de la suspension #12. La formulation des suspensions de NPLC en conditions industrielles semble donc améliorer leurs propriétés physiques ainsi que leurs propriétés filtrantes dans les domaines UVB et UVA. Ceci pourrait être dû au fait qu'en conditions industrielles, les paramètres concernant la température et la vitesse d'agitation sont plus efficacement contrôlés qu'en conditions laboratoire. Ainsi, la dispersion des particules minérales dans la suspension pourrait être optimale. Ces suspensions ont été utilisées pour formuler 25 kg d'émulsion solaire (émulsion #13). Cette émulsion montre un FPS significativement plus bas que l'émulsion #12 formulée au laboratoire (Tableau 15). Ceci peut s'expliquer par les pertes de matières observées au cours de la production industrielle des suspensions de NPLC et de l'émulsion solaire. En effet, le procédé industriel ne permet pas de contrôler les quantités exactes de matières premières incorporées dans la cuve de

production comme c'est le cas sur les petites quantités formulées au laboratoire. Cependant, les propriétés filtrantes de l'émulsion #13 permettent de la commercialiser sous un indice de photoprotection de 50. En effet, elle a un FPS de $55,3 \pm 3,3$, un FPUVA de $16,8 \pm 0,7$ qui correspond bien à au moins le tiers de son FPS et une λ_c de $375,5 \pm 0,5$ nm qui est supérieure aux 370 nm requis par la réglementation européenne.

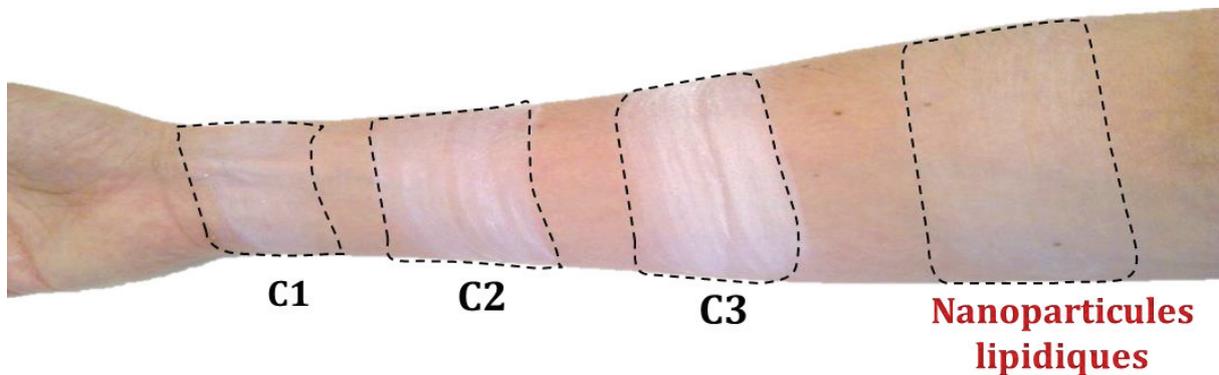


Figure 32 : Comparaison de l'effet blanc sur la peau après étalement de trois écrans solaires ne contenant que des filtres UV inorganiques et affichant un FPS de 50 avec une suspension de nanoparticules lipidiques formulée avec du TiO_2 et montrant un FPS 50.

Cette émulsion est formulée avec de faibles concentrations en filtres UV comparée aux émulsions solaires formulées avec des filtres UV inorganiques qui sont actuellement commercialisées. La diminution de la concentration en filtres UV inorganiques permet à l'émulsion solaire d'apparaître moins blanche sur la peau à l'application. La Figure 32 compare le fini après application cutanée de trois formulations d'écrans solaires de FPS 50 formulées avec des filtres UV inorganiques et commercialisées avec l'émulsion #13 qui peut également revendiquer un FPS de 50. Après étalement, l'émulsion solaire formulée avec des suspensions de NPLC apparaît nettement moins blanche par rapport aux autres formulations.

C- Conclusion :

Cette étude a montré que les nanoparticules lipidiques de type NLC et NPLC sont intéressantes pour formuler le TiO_2 et augmenter son efficacité anti-UV. Ces nanostructures lipidiques ont un FPS intrinsèque. L'incorporation de nanoparticules de TiO_2 dans la matrice lipidique des NLC et des NPLC a permis d'augmenter considérablement les propriétés filtrantes du TiO_2 dans le domaine UV. Les NPLC montrent une meilleure stabilité dans le temps par rapport au NLC notamment en conservant leur FPS initial. Les émulsions solaires formulées avec des suspensions de NPLC contenant du TiO_2 et du CeO_2 montrent un haut pouvoir photoprotecteur qui s'étend dans le domaine UVA. Les suspensions de NPLC utilisées comme filtres UV permettent de réduire de manière significative les concentrations en filtres UV incorporés dans l'émulsion solaire. Ces travaux ont permis de formuler des

émulsions solaires avec de hauts indices de photoprotection (i.e. FPS 30 et 50) aux textures agréables, qui apparaissent moins blanches à l'application. Cependant, les émulsions solaires formulées avec des suspensions de NPLC n'avaient pas un FPUVA suffisamment élevé pour revendiquer un FPS de 50+ constituant la photoprotection la plus haute qu'un écran solaire puisse revendiquer. D'autres composés naturels, telles que des huiles végétales, pourrait permettre d'augmenter suffisamment le pouvoir photo-protecteur de ces émulsions au niveau du domaine UVA pour développer un écran solaire de FPS 50+.

Le chapitre suivant porte sur l'intérêt des nanoparticules et nanocapsules lipidiques pour formuler un filtre UV organique.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/022471 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61Q 17/04 (2006.01) A61K 8/11 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/052086
- (22) Date de dépôt international :
13 août 2014 (13.08.2014)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
13/57987 13 août 2013 (13.08.2013) FR
- (71) Déposants : POLAAR [FR/FR]; 53 rue du Rocher, F-75008 Paris (FR). UNIVERSITE CLAUDE BERNARD [FR/FR]; 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69100 Villeurbanne (FR).
- (72) Inventeurs : DE LARMINAT, Aurélie; 65 boulevard du Maréchal Joffre, Bât. 3, F-92340 Bourg la Reine (FR). KURBIEL, Daniel; 9, rue Edouard Rougeaux, F-92370 Chaville (FR). PIROT, Fabrice; 9, rue Crillon, F-69006 Lyon (FR). GILBERT, Elodie; 122, avenue Roger Salengro, F-69100 Villeurbanne (FR).
- (74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU; B.P. 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises (règle 48.2.h)

(54) Title : AQUEOUS SUSPENSION OF NANOCAPSULES ENCAPSULATING SUNSCREEN AGENTS

(54) Titre : SUSPENSION AQUEUSE DE NANOCAPSULES ENCAPSULANT DES FILTRES SOLAIRES

(57) Abstract : The invention relates to an aqueous suspension of nanocapsules encapsulating at least one UV-screening agent which is capable of being obtained by means of a preparation process in which the following are mixed together: a) a first phase, termed oily phase, which comprises: -at least one hydrophobic polymer, -at least one oil, -at least one UV-screening agent, and -at least one first surfactant, and b) a second phase, termed aqueous phase, which comprises water and/or at least one polar solvent, and optionally at least one second surfactant. The subject matter of the invention is also a sunscreen composition comprising this suspension.

(57) Abrégé : Suspension aqueuse de nanocapsules encapsulant des filtres solaires L'invention concerne une suspension aqueuse de nanocapsules encapsulant au moins un filtre UV qui est susceptible d'être obtenue par un procédé de préparation dans lequel on mélange : a) une première phase, dite phase huileuse, qui comporte : -au moins un polymère hydrophobe, -au moins une huile, -au moins un filtre UV, et -au moins un premier agent tensio-actif. b) une deuxième phase, dite phase aqueuse, qui comprend de l'eau et/ou au moins un solvant polaire, et optionnellement au moins un deuxième agent tensio-actif. L'invention a aussi pour objet une composition d'écran solaire comprenant cette suspension.



WO 2015/022471 A1

Suspension aqueuse de nanocapsules encapsulant des filtres solaires

La présente invention concerne le domaine de la formulation d'écrans solaires.

5 Les écrans solaires comprennent des molécules spécifiques que sont les filtres ultra-violet (ci-après abrégé UV). Les filtres UV les plus efficaces protègent contre :

- les rayons UV-A qui sont des rayons de longueur d'onde comprise entre 320 et 400 nm,
- 10 - les rayons UV-B qui sont des rayons de longueur d'onde comprise entre 280 et 320 nm.

En effet, ces rayons UV sont nocifs pour la peau. Les rayons aux longueurs d'onde les plus courtes sont les plus agressifs et ceux aux longueurs d'onde plus longues pénètrent plus profondément dans la peau. Les rayons UV-A sont à l'origine d'une pigmentation immédiate de la peau, mais aussi de son vieillissement prématuré, d'une immunosuppression et de cancers cutanés. Les rayons UV-B sont à l'origine de la synthèse de la vitamine D et du bronzage (pigmentation retardée), mais aussi des érythèmes solaires, de l'immunosuppression et de cancers cutanés.

15 Les écrans solaires se caractérisent par leur facteur de protection solaire (ci-après abrégé FPS).

Le FPS se définit selon la formule (I) suivante :

$$25 \quad \text{FPS} = \frac{\text{DEM sur peau protégée}}{\text{DEM sur peau non protégée}} \quad (I)$$

DEM étant l'abréviation de « Dose Erythémateuse Minimale ».

30 Pour qu'un écran solaire ait une efficacité optimale, il doit remplir les critères suivants :

- maintien des filtres UV à la surface de la peau ;
- protection dans les spectres UVB et UVA ;
- photo-stable.

35 La formulation d'un écran solaire est dépendante des propriétés physico-chimiques des filtres UV incorporés.

Les filtres UV sont classés dans deux catégories: les filtres UV organiques et les filtres UV minéraux.

Les filtres UV organiques (aussi appelés filtres UV chimiques) sont des molécules organiques absorbant et dissipant les rayons UV par des réactions chimiques. La majorité de ces filtres UV organiques sont lipophiles. Leurs concentrations maximales et leurs combinaisons entre eux dans des formulations d'écran solaire sont parfaitement réglementées.

A titre d'exemple de filtres UV organiques, on peut citer l'oxybenzone, l'octocrylène, l'avobenzone, l'octyl-methoxycinnamate.

Les filtres UV organiques présentent les avantages d'être facilement incorporés dans des formulations d'écran solaire non pâteuses et agréables pour l'utilisateur.

Cependant, les filtres UV organiques sont aussi connus pour leur photostabilité (par exemple l'avobenzone), leur caractère allergénique et polluant, leur tendance à traverser la barrière cutanée (c'est-à-dire le *stratum corneum*) et enfin pour certains, leurs propriétés perturbatrices endocriniennes (par exemple l'oxybenzone).

Il existe aussi les filtres UV minéraux qui sont des particules inorganiques réfléchissant et absorbant les UVA et les UVB. Ces particules inorganiques sont habituellement recouvertes d'un revêtement hydrophile ou hydrophobe (par exemple à base de méthoxysilane, de diméthicone, de silice ou d'alumine) qui inhibe leur photo-réactivité et facilite leur incorporation dans les formulations d'écran solaire.

A titre d'exemple de filtres UV minéraux, on peut citer le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc, le kaolin et le talc.

Les filtres UV minéraux présentent les avantages d'être hypoallergéniques et de ne pas traverser la barrière cutanée.

En revanche, ils s'avèrent plus difficiles à formuler que les filtres UV organiques, car les formulations d'écran solaire dans lesquelles sont incorporés ces filtres UV sont souvent plus épaisses et ont tendance à laisser des traces blanches inesthétiques sur la peau.

Afin de surmonter le problème de ces traces blanches, il pourrait être envisagé de réduire la concentration de ces filtres UV minéraux. Cependant, cette solution ne serait pas satisfaisante, car elle diminuerait la protection solaire. Mais cela irait à l'encontre d'un des objectifs que doivent atteindre les formulations d'écran solaire qui est d'assurer une protection solaire maximale.

Enfin, il existe des molécules naturelles qui possèdent intrinsèquement la propriété de filtrer les UV. Elles peuvent donc être utilisées comme filtres UV, seules ou en complément de filtres UV organiques ou minéraux. On peut citer par exemple la cire de carnauba, l'huile d'olive, l'huile de karanja, l'acide usnique, la propolis, l'extrait de concombre, les polyphénols.

Les écrans solaires peuvent se présenter sous différents types de formulation, parmi lesquels on peut citer les émulsions fluides (laits) ou épaisses (crèmes) ; les formulations en gels ou en huiles ; les formulations en sticks ; les lotions.

Lorsque l'écran solaire est une émulsion, elle comprend une phase lipidique, une phase aqueuse et un ou plusieurs tensioactifs.

Les filtres UV sont dispersés :

- dans la phase lipidique s'ils sont lipophiles
- dans la phase aqueuse s'ils sont hydrophiles.

Lorsque l'écran solaire se présente sous la forme d'une huile, il s'agit d'une phase lipidique dans laquelle ont été dispersés des filtres UV lipophiles.

Les gels solaires hydrophobes résultent de la dispersion de filtres UV lipophiles dans une phase lipidique qui a ensuite été gélifiée grâce à l'ajout d'un agent gélifiant. Les gels solaires hydrophiles résultent de la dispersion de filtres UV hydrophiles dans une phase aqueuse qui a ensuite été gélifiée grâce à l'ajout d'un agent gélifiant.

Enfin, les sticks solaires sont fabriqués à partir d'une phase lipidique comprenant une cire dans laquelle ont été dispersés des filtres UV lipophiles. Le mélange ainsi obtenu est refroidi dans des moules donnant à cette formulation d'écran solaire une forme en stick.

Aussi, il est connu d'ajouter des excipients aux formulations d'écran solaire afin de garantir une répartition optimale des filtres UV à la surface de la peau par la formation d'un film protecteur homogène à l'application.

A ce propos, le passage des filtres UV à travers la peau peut être favorisé par les facteurs suivants :

- un mauvais état général de la peau ;
- la désorganisation des lipides et des jonctions serrées de la barrière cutanée sous l'action des rayons UV;
- certains solvants tels que l'éthanol, le propylène glycol, les terpènes ;
- certains agents émoullissants ;

- leur poids moléculaire (les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 500 Da sont plus susceptibles de traverser la barrière cutanée que les molécules de plus haut poids moléculaire).

5 Les filtres UV organiques sont pour la majorité des molécules lipophiles de bas poids moléculaire. Ils sont donc susceptibles de passer la barrière cutanée et ainsi d'atteindre les cellules nucléées de la peau, puis la circulation systémique ce qui peut être très préjudiciable pour l'utilisateur de l'écran solaire.

10 C'est pourquoi des développements scientifiques sur les formulations d'écran solaire ont été réalisés pour « emprisonner » le filtre UV dans une particule, afin qu'il soit maintenu à la surface de la peau, et ainsi empêcher son passage transcutané, surmonter les problèmes de photo-instabilité, d'irritations, de réactions photo-allergiques et photo-toxiques, et améliorer son pouvoir filtrant.

15 Ces travaux de recherche ont abouti à la conception de nouveaux véhicules (ou autrement dit de transporteurs) de filtres UV, afin d'améliorer les performances des formulations d'écran solaire.

20 L'utilisation de systèmes multi-particulaires emprisonnant des filtres UV a suscité un intérêt important. En effet, outre l'avantage d'être aisément incorporés dans les formulations habituelles d'écran solaire qui ont été détaillées ci-dessus, ces systèmes multi-particulaires peuvent avoir la capacité d'absorber et/ou de refléter les radiations UV agissant ainsi à eux seuls comme des filtres solaires physiques.

25 Parmi ces systèmes multi-particulaires, il y a tout d'abord les nanoparticules lipidiques solides (ci-après abrégé « SLN » car de l'anglais Solid Lipid Nanoparticles). Il s'agit de gouttelettes huileuses de lipides solides à température corporelle qui sont stabilisées par des tensio-actifs. Autrement dit, les SLN sont des nanoparticules constituées par un cœur lipidique solide enveloppé d'un ou plusieurs agent(s) tensioactif(s) en suspension dans une phase aqueuse.

30 Les SLN possèdent des propriétés occlusives idéales pour les produits cosmétiques de protection solaire. Des études ont montré que des formulations contenant des SLN dans lesquelles avaient été encapsulés des filtres UV présentaient un pouvoir filtrant amélioré dans le spectre UV.

35 A cet égard, on connaît la demande US 2003/0235540 A1 qui décrit des compositions de SLN contenant des filtres UV liposolubles. Il est précisé que grâce à ces compositions, la pénétration dans la peau des filtres UV encapsulés est réduite, ce qui a un impact positif sur les problèmes de toxicité que posent certains filtres UV.

Cependant, les SLN présentent les inconvénients suivants :

- les quantités de filtres UV encapsulables sont limitées ;
- les filtres UV ont tendance à être expulsés hors de la nanoparticule durant le stockage de la formulation d'écran solaire.

5 Ces problèmes d'instabilité sont inhérents aux lipides solides constituant la matrice des SLN qui ont tendance à former un réseau cristallin parfait dont les interstices rendent possible l'éjection des filtres UV hors de la nanoparticule. Les SLN peuvent être plus ou moins sensibles à la chaleur selon le point de fusion de la matrice lipidique solide utilisée. Si la matrice lipidique solide vient à fondre, cela peut
10 désorganiser le système ; ce qui risque d'entraîner une diminution du pouvoir filtrant des SLN dans l'UV mais également le déphasage total de la suspension de SLN.

Enfin, la présence importante de lipides solides dont le point de fusion est supérieur à la température cutanée (c'est-à-dire supérieur à 32 °C) rend les formulations d'écran solaire à base de SLN difficiles à étaler ; ce qui n'est pas
15 approprié pour un produit de protection solaire qui doit pouvoir être aisément et uniformément réparti sur la peau.

Ainsi, en l'état actuel des connaissances sur les propriétés des SLN, les formulations d'écran solaire comprenant des filtres UV encapsulés avec ce système ne s'avèrent pas pleinement satisfaisantes.

20 Afin de surmonter les inconvénients inhérents aux SLN, un autre système d'emprisonnement de filtres UV a été mis au point qui consiste en des particules lipidiques résultant du mélange de lipides solides avec des lipides liquides. Ces particules sont connues sous le nom de transporteurs lipidiques nanostructurés (ci-après abrégé « NLC » car de l'anglais « Nanostructured Lipid Carriers »). Autrement
25 dit, les NLC sont des nanoparticules constituées par un cœur lipidique solide et liquide enveloppé d'un ou plusieurs agent(s) tensioactif(s) en suspension dans une phase aqueuse.

Comparées aux SLN, les NLC ont une structure hétérogène qui donne à leur matrice une structure imparfaite présentant des espaces dans lesquels peuvent
30 se loger les filtres UV. Cela permet de surmonter les problèmes d'éjection des filtres UV rencontrés avec les SLN. Mais, les NLC, du fait de la présence de lipides solides, présentent le même type de défaut d'étalement et de sensibilité à la chaleur que les SLN.

Bien que leur plus importante capacité d'encapsulation de filtres UV et
35 leur meilleure stabilité rendent les NLC plus appropriés que les SLN dans le domaine de la formulation d'écran solaire, il pourrait être tout à fait avantageux de mettre en

œuvre d'autres systèmes d'encapsulation de filtre UV exhibant des performances de protection solaire améliorées, et ce notamment en cherchant à optimiser les quantités de filtres UV encapsulés.

5 Ainsi, comme expliqué ci-dessus, on est toujours à la recherche de formulations d'écran solaire exhibant les meilleures performances possibles de protection solaire, et ce en conciliant les paramètres suivants que sont :

- la bonne répartition des filtres UV sur la peau,
- la prévention du passage transcutané des filtres UV,
- des propriétés esthétiques améliorées comme
10 l'atténuation des traces blanches laissées sur la peau notamment par les filtres UV minéraux après application.

En outre, on connaît la demande WO 2010/040194 A2 qui décrit des nanocapsules de polymère contenant de l'huile et un filtre UV, ainsi que leur procédé de fabrication.

15 Le procédé de fabrication décrit dans cette demande internationale utilise systématiquement des solvants organiques et met en œuvre une technique choisie parmi de multiples techniques que sont la polymérisation *in situ* de monomères dispersés, l'émulsion, la polymérisation interfaciale, la précipitation de polymères préformés, la nanoprécipitation, la déposition interfaciale, l'émulsification-
20 évaporation ou encore l'émulsification-diffusion. A cet égard, le seul exemple de fabrication de nanocapsules décrit dans cette demande internationale utilise la technique de déposition interfaciale. Le solvant est de l'acétone et est évaporé à l'issue du procédé.

Cependant, l'utilisation d'un solvant organique dans la phase huileuse au
25 cours du procédé de fabrication de nanocapsules décrit dans cette demande internationale WO 2010/040194 A2 présente l'inconvénient que le produit final peut comprendre des traces de ce solvant organique, ce qu'il convient absolument d'éviter. De plus, l'étape d'évaporation du solvant organique est contraignante, difficile à mettre en œuvre et rallonge le temps de fabrication desdites nanocapsules. Cela
30 amoindrit ainsi considérablement l'intérêt industriel de ces nanocapsules comportant un filtre UV.

C'est pourquoi, par opposition à la demande WO 2010/040194 A2, il serait avantageux de mettre au point un procédé de fabrication de nanocapsules avec un cœur huileux encapsulant un filtre UV et qui soit exempt de tout solvant organique
35 tel que l'éthyl actétate et l'acétone qui sont des solvants classiquement utilisés comme adjuvant de préparation pour dissoudre des polymères hydrophobes dans une

phase huileuse, et ce tout en obtenant des nanocapsules présentant d'excellentes performances de protection solaire.

Par ailleurs, on connaît la demande de brevet français FR 2 930 176 A1 décrivant des nanocapsules utilisées comme agents transporteurs de principes actifs
5 qui assurent une bonne protection du principe actif encapsulé, ainsi qu'une libération prolongée et/ou contrôlée de celui-ci *in vivo*. Ces nanocapsules sont utilisées pour véhiculer des principes actifs pharmaceutiques, tels que par exemple la chlorhexidine base, le minoxidil, l'albendazole et le ketoconazole.

Or, les inventeurs de la présente invention, qui sont aussi les inventeurs
10 de cette demande de brevet français FR 2 930 176 A1, ont découvert de manière tout à fait surprenante que l'encapsulation de filtres UV dans des nanocapsules comprenant un coeur huileux entouré par une enveloppe polymérique préparées selon un procédé se rapprochant par certains aspects techniques de celui décrit dans cette demande de brevet français permettait d'obtenir des formulations d'écran
15 solaire présentant d'excellentes performances de protection solaire *in vitro*, et en particulier nettement meilleures que celles obtenues avec des formulations d'écran solaire dans lesquelles ces mêmes filtres UV n'étaient pas encapsulés.

La présente invention a pour premier objet une suspension aqueuse de nanocapsules qui comprennent un coeur huileux dans lequel au moins un filtre UV est
20 dispersé de façon homogène et une enveloppe polymérique contenant au moins un polymère hydrophobe, ladite suspension aqueuse de nanocapsules est susceptible d'être obtenue par un procédé de préparation dans lequel on mélange :

a) une première phase, dite phase huileuse, qui comporte :

- au moins un polymère hydrophobe,
- 25 - au moins une huile,
- au moins un filtre UV, et
- au moins un premier agent tensio-actif,

cette première phase étant portée à une température T1 supérieure à la température de fusion du polymère hydrophobe,

30 à cette température T1, le polymère hydrophobe étant miscible au mélange du premier agent tensio-actif et de l'huile, et le filtre UV étant miscible, soluble ou solubilisé, dans le mélange du premier agent tensio-actif et de l'huile ;

b) une deuxième phase, dite phase aqueuse, qui comprend de l'eau et/ou au moins un solvant polaire, et optionnellement au moins un deuxième agent
35 tensio-actif,

de manière à obtenir la formation de nanocapsules en suspension aqueuse.

La suspension aqueuse ainsi obtenue se présente sous la forme d'un mélange homogène laiteux.

Les nanocapsules ainsi formées comprennent un coeur huileux dans lequel au moins un filtre UV est dispersé de façon homogène et une enveloppe polymérique contenant au moins un polymère hydrophobe.

Le filtre UV peut être encapsulé dans le coeur huileux des nanocapsules, ou bien être adsorbé au sein de l'enveloppe polymérique. Plus précisément, le filtre UV peut être en majorité emprisonné dans le coeur huileux des nanocapsules et la partie restante du filtre UV est adsorbée sur l'enveloppe polymérique contenant le polymère hydrophobe ou bien le filtre UV peut être partiellement emprisonné dans le coeur huileux et partiellement adsorbé sur ladite enveloppe polymérique ou bien encore le filtre UV peut être majoritairement adsorbé sur l'enveloppe polymérique et la partie restante du filtre UV est emprisonnée dans le coeur huileux. Ainsi, la suspension aqueuse de nanocapsules selon l'invention comprend toujours au moins une partie du filtre UV qui est dispersé de façon homogène dans le coeur huileux desdites nanocapsules.

Les nanocapsules présentent un diamètre inférieur à 1000 nm, de préférence compris entre 100 et 700 nm.

La suspension aqueuse de nanocapsules ainsi obtenue peut être diluée dans l'eau, sans modification notable de la stabilité de la suspension.

La stabilité de ces nanocapsules est avérée. Elles permettent de protéger le ou les filtre(s) UV encapsulé(s) dans leur coeur ou adsorbé(s) au sein de l'enveloppe polymérique des phénomènes de dégradation.

La suspension aqueuse ainsi obtenue peut alors être soit utilisée en tant que telle comme un ingrédient dans une formulation d'écran solaire, soit lyophilisée avant d'être incorporée en tant qu'actif dans une formulation. Cette dernière possibilité sera préférée pour des formulations lipophiles de types huiles et stick dans lesquelles l'incorporation d'eau est difficile, voire impossible.

Plus précisément, les suspensions aqueuses de nanocapsules obtenues selon l'invention peuvent être utilement lyophilisées comme il est connu de l'état de l'art et donc parfaitement à la portée de l'homme du métier. Classiquement, les suspensions sont précongelées à une température de - 80°C et sont placées dans un lyophilisateur dans lequel la température est voisine de - 55°C avec une mise sous vide importante. Le lyophilisat ainsi obtenu est tamisable et redispersible dans une solution aqueuse.

La présente invention a pour autre objet une composition d'écran solaire comprenant au moins une suspension aqueuse de nanocapsules selon l'invention telle que décrite ci-dessus.

5 De manière préférée, ladite composition d'écran solaire comprend en outre au moins un excipient physiologiquement acceptable.

Cet excipient est avantageusement choisi parmi les excipients habituellement utilisés dans les formulations d'écran solaire, parmi lesquels on peut citer : les agents de texture épaississants (par exemples les gommages de xanthane, la gomme guar, les alginates) ; les agents de texture émulsifiants formant un film
10 uniforme et ininterrompu sur la peau ; les agents filmogène procurant un film protecteur uniforme et augmentant la résistance à l'eau ; les agents hydratants (par exemple la glycérine) qui retiennent l'eau dans la peau ; les agents apaisants (par exemple l'allantoïne) pour leurs effets cicatrisant et régénérant ; les parfums ; les pigments ; les conservateurs pour leur pouvoir inhibiteur de la prolifération
15 microbienne (par exemple le benzoate de sodium, le sorbate de potassium, les parabènes).

De préférence, les excipients seront choisis pour empêcher le passage des filtres UV à travers la barrière cutanée.

20 La composition d'écran solaire selon l'invention peut être formulée sous la forme d'une émulsion fluide telle qu'un lait ou d'une émulsion épaisse telle qu'une crème, d'un gel, d'une huile, ou encore d'un stick ou d'une lotion.

De manière préférée, la composition d'écran solaire est formulée sous la forme d'une émulsion, lorsqu'elle est destinée à être utilisée pour une application cosmétique.

25 Ainsi, la suspension aqueuse de nanocapsules selon l'invention peut être utilisée en tant que produit de protection solaire entre autres pour :

- des applications cosmétiques : protection de la peau et des cheveux contre les méfaits des UV (y compris les colorants capillaires, protection de la couleur) ;
- 30 - des applications industrielles : protections des peintures, vernis, teintures et huiles pour des applications dans les domaines techniques du bâtiment, des textiles, ou encore de l'emballage (par exemple, lorsque les emballages sont transparents, il peut être nécessaire de protéger les ingrédients qu'ils contiennent du soleil pour ne pas dénaturer leur formulation).
- 35

Certaines définitions de termes utilisés dans le cadre de la description de l'invention sont données ci-après.

Les notions de solubilité, miscibilité et solubilisation sont bien connues de l'homme du métier. Sauf indications contraires, dans le cadre de l'invention, la solubilité, miscibilité ou solubilité est obtenue à température ambiante, à savoir à environ 20°C.

En particulier, dans le cadre de l'invention, par « miscible », on entend complètement miscible. Deux composés liquides seront considérés comme complètement miscibles lorsqu'ils se mélangent en toute proportion. Par conséquent, le terme de miscibilité se réfère à la solubilité mutuelle des composés dans les systèmes liquides.

Au sens de l'invention, un composé solide sera considéré comme soluble dans un liquide ou mélange de liquides lorsque ce composé se disperse de manière homogène à l'état moléculaire sous l'effet d'interactions solide/liquide spontanées.

Concernant la solubilisation, un composé solide ou liquide (minéral ou organique) sera considéré comme solubilisé dans un liquide ou un mélange de liquides, notamment lorsqu'une association de colloïdes formant des micelles augmente la solubilité du composé initialement insoluble dans le milieu de dispersion.

Par polymère « hydrophobe », on entend un polymère insoluble dans l'eau.

Par filtre UV on entend toute molécule ayant comme propriété principale ou secondaire d'absorber les UV dans une plage de longueur d'onde comprise entre 290 et 400 nm (UVB et UVA) ; ce qui inclut les filtres UV chimiques, les écrans minéraux, ainsi que d'autres molécules naturelles ou des huiles qui ont des propriétés filtrantes dans l'UV (comme par exemple la cire de carnauba, l'huile d'olive, l'huile de karanja, l'acide usnique, la propolis, l'extrait de concombre, les polyphénols).

Par « huile », on entend un corps gras, lipophile qui est non-miscible ou faiblement miscible dans l'eau. Dans le cadre de la présente invention, il peut s'agir d'une huile prise seule ou en mélange. Autrement dit, dans la suite de la description, on entendra par « huile » une huile ou un mélange d'huiles liquides ou solides.

Par « huile hydrodispersible », on entend une huile qui se disperse dans l'eau à l'état moléculaire, colloïdal ou micrométrique.

Le HLB (de l'anglais hydrophilic lipophilic balance) sera déterminé par la méthode de Griffin. (Griffin WC: Classification of Surface-Active Agents by 'HLB,' Journal of the Society of Cosmetic Chemists 1 (1949): 311. Griffin WC: Calculation of

HLB Values of Non-Ionic Surfactants, Journal of the Society of Cosmetic Chemists 5 (1954): 259).

Le diamètre des nanocapsules qui correspond à la plus grande dimension des nanocapsules sera déterminé par granulométrie.

5 Dans le cadre de l'invention, les première et deuxième phases dites respectivement phase huileuse et phase aqueuse, sont mélangées pour conduire à la formation spontanée de nanocapsules. Les pourcentages donnés ci-dessous correspondent :

- 10 - en ce qui concerne la phase huileuse, au pourcentage en masse de chaque composant sur la masse totale de la phase huileuse,
- en ce qui concerne la phase aqueuse, au pourcentage en masse de chaque composant sur la masse totale de la phase aqueuse.

15 La phase huileuse est homogène.

L'huile ou les huiles que comporte cette phase huileuse sont par nature hydrophobes, et peuvent dans certains cas être hydrodispersibles. Cette huile ou ce mélange d'huiles est destinée à former le coeur des nanocapsules. En particulier, l'huile ou le mélange d'huiles peut présenter un HLB de 5 compris dans la gamme allant de 3 à 6.

20 A titre d'exemple d'huile pouvant être utilisée dans le cadre de l'invention, on peut citer les triglycérides, notamment à chaîne moyenne, les propylène glycol dicaprylocaprates, les macrogolglycérides oléoyles, lauroyles et linoléoyles, les cires végétales et animales et les huiles végétales. Par exemple en ce
25 qui concerne les cires, il peut s'agir de cire de riz, de carnauba.

De manière tout à fait préférée, l'huile de la phase huileuse est la cire de carnauba.

30 La phase huileuse peut comprendre de 5 % à 85% en masse d'huile. De préférence, la phase huileuse comprend de 10 % à 40 % en masse d'huile, encore plus préférentiellement de 10 % à 20 % en masse d'huile.

Selon une variante de l'invention, la phase huileuse comprend de 45 % à 55 % en masse d'huile.

35 Bien entendu, ce pourcentage ne concerne que l'huile (ou le cas échéant le mélange d'huiles) et ne comprend notamment pas le filtre UV et/ou le premier agent tensio-actif, même quand ces derniers se trouvent également sous une forme huileuse.

La phase huileuse contient au moins un polymère hydrophobe à l'état fondu, la phase huileuse étant maintenue à une température T1 supérieure à la température de fusion du polymère.

La température T1 est choisie de manière appropriée pour que la phase
5 huileuse décrite ci-dessus soit homogène, c'est-à-dire qu'il n'y ait pas de particule solide au sein de la phase huileuse.

En d'autres termes, la température T1 est choisie de manière appropriée pour qu'il ait fusion complète des composants de la phase huileuse, et ainsi qu'ils se mélangent entre eux de manière homogène. En particulier, la température T1 étant
10 supérieure à la température de fusion du polymère hydrophobe, lors du mélange des composants de la phase huileuse, le polymère hydrophobe sera fondu et se mélangera parfaitement aux autres composants de la phase huileuse.

Il est essentiel que la température T1 soit choisie de manière appropriée pour ne pas dégrader les composants de la phase huileuse. L'homme du métier
15 connaissant les températures de fusion des composants de la phase huileuse, saura parfaitement choisir la température T1 en fonction desdits composants de la phase huileuse pour ne pas les dégrader lorsqu'il préparera ladite phase huileuse.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la température T1 est supérieure entre environ 5°C et 10°C à la température de fusion du composant de la
20 phase huileuse ayant la température de fusion la plus basse, de manière à ce que les composants de la phase huileuse ne se dégradent pas.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la température T1 est supérieure d'environ 10°C, de préférence d'environ 5°C, à la température de fusion du polymère hydrophobe. Ainsi, le mélange de la phase huileuse est homogène.

Le polymère hydrophobe sera choisi de façon à ce que sa température de fusion soit compatible avec la stabilité physicochimique de l'huile, du filtre UV et du premier agent tensio-actif.

Par exemple, le polymère hydrophobe pourra présenter une température de fusion inférieure ou égale à 120°C.

Le polymère hydrophobe peut être choisi parmi les polymères vinyliques, les polyesters, les polyamides, les polyuréthanes, les polycarbonates, présentant de préférence une température de fusion inférieure à 120°C, tels que les polycaprolactones (comme par exemple les poly-ε-caprolactones).

La phase huileuse peut comprendre de 0,1 % à 4% en masse, de
35 préférence de 0,1 % à 0,5 % en masse de polymère hydrophobe.

Selon une variante de l'invention, la phase huileuse comprend de 0,4 % à 1 % en masse de polymère hydrophobe.

La phase huileuse contient également au moins un filtre UV qui est dispersé, sous une forme miscible, soluble ou solubilisée, dans cette dernière.

5 Le filtre UV est miscible, soluble ou solubilisé dans le mélange composé du premier agent tensio-actif et de l'huile à la température T1.

Selon une variante de réalisation, le filtre UV est également miscible, soluble ou solubilisé dans le mélange composé du premier agent tensio-actif et de l'huile ou du mélange d'huiles, à température ambiante, notamment à 20°C.

10 Lorsque le filtre UV est solubilisé, sa solubilisation est réalisée par l'action du premier agent tensio-actif, jouant le rôle d'agent solubilisant.

Le filtre UV peut être choisi parmi les filtres UV organiques, les filtres UV minéraux ou tout composé possédant un pouvoir de filtration dans les UVB et/ou UVA.

15 De manière avantageuse, le filtre UV est choisi dans le groupe constitué par :

- les filtres UV organiques absorbants les UV-A tels que l'oxybenzone, le sulisobenzone, le dioxybenzone, l'ethyl anthranilate, l'avobenzone, le terphatylidene, le dicamphre acide sulfonique et la bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine;

20 - les filtres UV organiques absorbants les UV-B tels que le para-amino acide benzoïque, le p-amyl dimethyl para-amino acide benzoïque, le 2-ethoxyethyl-p-methoxycinnamate, le digalloyl trioleate, l'ethyl 4-bishydroxypropylaminobenzone, le 2-ethoxyethyl 2-cyano-3,3,diphenylacrylate, le 25 2-ethylhexyl-p-methoxy cinnamate, le 2-ethylhexylsalicylate, le glyceryl para-amino acide benzoïque, l'homo-methyl salicylate, le dihydroxyacetone, l'octyl dimethyl para-amino acide benzoïque, le 2-phenylbenzimidazole-acide sulfonique, le triethanolamine salicylate ;

30 - les filtres UV minéraux tels que le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc, l'oxyde de cérium, le kaolin et le talc ;

- les molécules naturelles ou les huiles ayant des propriétés de filtration des UVB et/ou UVA, telles que la cire de carnauba, l'huile d'olive, l'huile de karanja, l'acide usnique, la propolis et l'extrait de concombre.

35 Lorsque le filtre UV est un filtre UV minéral, se présentant sous la forme de particules, lesdites particules sont avantageusement recouvertes d'un revêtement hydrophobe, de préférence à base de méthoxysilane, de diméthicone, de silice ou

d'alumine, de manière à ce que ces filtres UV soient solubilisés dans la phase huileuse, autrement dit qu'ils soient dispersés de manière homogène dans la phase huileuse. Ce revêtement hydrophobe est connu de l'homme du métier pour augmenter la solubilité dans une phase huileuse de filtres UV sous forme minérale.

5 De plus, ces particules de filtres UV minérales recouvertes d'un revêtement sont avantageusement dispersées dans un mélange de solvants tels que des silicones, des alcanes ou des huiles végétales pour faciliter leur incorporation dans la phase huileuse. Ces mélanges sont parfaitement connus de l'homme du métier pour disperser des filtres UV minéraux, avantageusement recouverts d'un revêtement
10 hydrophobe, dans une phase huileuse.

De manière préférée, le filtre UV que comprennent les nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention est le dioxyde de titane sous forme nanométrique. De préférence, il s'agit de nanoparticules de dioxyde de titane dont le diamètre des particules est compris entre 10 et 124 nm, et plus préférentiellement
15 compris entre 10 et 110 nm. Selon une variante de l'invention, le diamètre des particules est compris entre 15 et 124 nm.

Par exemple, la phase huileuse comprendra de 0,1 % à 70% en masse de filtre UV, de préférence de 0,1 % à 20 % de filtre UV.

La phase huileuse comprend également au moins un premier tensio-actif, qui pourra notamment agir en tant qu'agent solubilisant du filtre UV. Ce premier agent tensio-actif peut être du type anionique, cationique, amphotère ou non-
20 ionique.

Le premier agent tensio-actif peut se présenter sous la forme d'une huile.

Le premier agent tensio-actif peut présenter un HLB compris dans la
25 gamme allant de 3 à 6.

A titre d'exemple de premier agent tensio-actif, on peut citer les propylène glycol laurates, les propylène glycol caprylates, les polyglycéryl oléates, les macroglycérides caprylocaproyles et les esters de sorbitan.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la phase huileuse comprend
30 de 2 % à 50 %, de préférence de 2 % à 6 %, en masse de premier agent tensio-actif.

Selon une variante de l'invention, la phase huileuse comprend de 4 % à 50 % en masse de premier agent tensio-actif.

Selon une autre variante de l'invention, la phase huileuse comprend de 10 % à 20 % en masse de premier agent tensio-actif.

Bien entendu, la phase huileuse pourra contenir un seul ou plusieurs filtres UV et/ou un seul ou plusieurs polymères hydrophobes et/ou un seul ou plusieurs premiers agents tensio-actifs, répondant aux critères ci-dessus.

5 La phase huileuse peut, par exemple, être préparée en chauffant le polymère hydrophobe, à une température T1 supérieure à sa température de fusion, puis en ajoutant l'huile, puis le filtre UV. Le premier agent tensio-actif peut être introduit à n'importe quel stade de la préparation. Le mélange peut se faire, dans un tout autre ordre ou l'ensemble des composants peuvent tous être mélangés simultanément.

10 Il est également possible de chauffer l'huile à la température T1, puis d'ajouter le polymère hydrophobe à l'état liquide, puis les autres composants de la phase huileuse.

La phase huileuse obtenue devra être homogène et, si nécessaire sera homogénéisée, par exemple sous agitation mécanique.

15 La phase aqueuse peut en outre contenir au moins un deuxième agent tensio-actif.

Le deuxième agent tensio-actif peut être du type anionique, cationique, amphotère ou non-ionique.

20 Selon une variante de réalisation, le deuxième agent tensio-actif présente un HLB supérieur ou égal à 15, et est de préférence choisi parmi les tensio-actifs neutres (par exemple les polysorbates 20, 60 et 80 ; les macrogol stéarates ; les macrogol cetostearyl éthers ; les macrogol lauryl éthers ; les macrogol oleyl éthers ; les macrogol oléates ; l'huile de ricin polyoxyl ; l'huile de ricin polyoxyl hydrogénée).

25 Selon un mode de réalisation, la phase aqueuse comprend de 0,1 % à 12%, de préférence de 5 % à 10 %, en masse de deuxième agent tensio-actif.

Selon une variante de l'invention, la phase aqueuse comprend de 0,1 % à 10 % en masse de deuxième agent tensio-actif.

Selon une autre variante de l'invention, la phase aqueuse comprend de 0,1 % à 5 % en masse de deuxième agent tensio-actif.

30 La phase aqueuse pourra contenir un ou plusieurs deuxièmes agents tensio-actifs répondant aux critères ci-dessus.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la phase aqueuse comporte en outre au moins un polymère hydrophile sous la forme d'un hydrogel.

35 Par polymère « hydrophile », on entend un polymère soluble dans en solution aqueuse. Par polymère soluble en solution aqueuse, on entend un polymère qui, introduit dans de l'eau à environ 20 °C, à une concentration en poids égale à 1%,

permet l'obtention d'une solution qui présente une valeur de transmittance maximale de la lumière, à une longueur d'onde à laquelle le polymère d'absorbe pas, à travers un échantillon de 1 cm d'épaisseur, d'au moins 70%, de préférence d'au moins 80%.

Par « hydrogel », on entend un mélange homogène gélatineux formant
5 une seule phase contenant de l'eau, et de préférence comportant au moins 0,1 à 5% en masse d'eau, de préférence 0,15 à 2% en masse d'eau.

A titre d'exemple, le polymère hydrophile peut être choisi parmi les
10 dérivés cellulosiques synthétiques, de préférence parmi les éthers de cellulose tels que la méthylcellulose, l'éthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, l'hydroxypropylcellulose, l'hydroxyéthyl-méthylcellulose, l'hydroxypropylméthylcellulose, la méthyléthylcellulose et la carboxyméthylcellulose sodique et parmi les poloxamères et les alcool polyvinyliques.

Selon un mode de réalisation, la phase aqueuse comprend de 10 % à
15 40%, de préférence de 25 % à 35%, en masse de polymère hydrophile. La phase aqueuse pourra contenir un ou plusieurs polymères hydrophiles répondant aux critères ci-dessus.

Vraisemblablement dans ce mode de réalisation de l'invention, le
20 polymère hydrophile forme un colloïde protecteur autour des nanocapsules, assurant une plus grande stabilité de la suspension colloïdale obtenue et une amélioration du processus d'émulsification.

La phase aqueuse comprend, le plus souvent, de 60 % à 90%, de
préférence de 65 % à 75%, en masse d'eau ou d'un mélange d'eau avec un ou plusieurs solvants polaires. A titre d'exemple de solvant polaire, on peut citer l'éthanol, le 1-propanol et le 2-propanol.

25 La proportion de phase aqueuse par rapport à la phase huileuse est variable.

Lorsque la phase aqueuse comporte un polymère hydrophile, on pourra
utiliser un rapport en masse de polymère hydrophobe/polymère hydrophile inférieur ou égal à 0,4.

30 Le mélange entre la phase huileuse et la phase aqueuse peut être réalisé de diverses manières. Il est possible de verser la phase huileuse dans la phase aqueuse ou de mélanger les deux phases au moyen d'un circuit mélangeur en forme de « Y », chacune des deux phases étant amenée dans un des deux bras du « Y ». Mais, de façon préférée, le mélange des deux phases est réalisé en ajoutant la phase aqueuse
35 dans la phase huileuse, sous agitation. La phase huileuse est alors maintenue, lors du

mélange, à une température T1 souhaitée qui est une température supérieure à la température de fusion du polymère hydrophobe.

Au moment du mélange, la phase huileuse se trouve à une température T1 supérieure à la température de fusion du polymère hydrophobe. Dans un mode de réalisation, on pourra utiliser une température de 10°C à 30°C supérieure à la température de fusion du polymère hydrophobe.

Comme mentionné ci-dessus, il est essentiel cette température T1 ne soit pas trop élevée pour éviter toute dégradation des autres composants utilisés pour préparer les nanocapsules selon l'invention. Bien entendu, l'homme du métier connaît parfaitement les températures de fusion des composants de la phase huileuse et saura précisément choisir la température T1 pour obtenir un mélange homogène sans la dégradation des composants de ladite phase huileuse. A cet égard, les températures de fusion des composants sont détaillées dans des ouvrages de chimie de référence ou encore dans les descriptions techniques des fournisseurs des composants de la phase huileuse.

S'il le juge nécessaire pour obtenir un mélange parfaitement homogène, l'homme du métier mettra en œuvre une agitation mécanique du mélange. Les paramètres de la réalisation de l'agitation mécanique sont aussi parfaitement à la portée de l'homme du métier.

A cette température T1, le mélange composé de l'huile et du premier agent tensio-actif est miscible au polymère hydrophobe, et le filtre UV est également miscible, soluble ou solubilisé, éventuellement grâce au premier agent tensio-actif, dans le mélange composé de l'huile et du premier agent tensio-actif.

Au moment du mélange ou juste avant le mélange, la phase aqueuse peut être à température ambiante, notamment à 20°C ou, selon une variante de réalisation, la phase aqueuse peut être également chauffée.

Dans un mode de réalisation, la phase aqueuse est portée à une température T2 inférieure de 2°C à 5°C à la température de fusion du polymère hydrophobe. Lorsque la phase aqueuse comporte un polymère hydrophile, il est important de conserver, dans les conditions de mélange, le caractère d'hydrogel du polymère hydrophile.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le mélange de la phase huileuse et de la phase aqueuse est réalisé sous agitation modérée, de préférence à l'aide de moyens mécaniques fonctionnant à un régime compris dans la gamme allant de 4 000 à 16 000 tr/min et, selon une variante de l'invention dans la gamme allant de 6 000 et 8 000 tr/min. A titre d'exemple de dispositif de dispersion

convenable pour obtenir une suspension aqueuse de nanocapsules selon l'invention, on peut citer un agitateur mécanique à hélice, à pales ou encore à ancre.

Description de l'unique figure :

5 La figure 1 est un diagramme des valeurs FPS *in vitro* mesurées et théoriques de 5 formulations selon l'invention.

Partie expérimentale :

10 Différentes formulations ont été mises en œuvre pour fabriquer des suspensions aqueuses de nanocapsules selon l'invention.

Ces formulations sont détaillées ci-dessous avec les pourcentages en masse (m/m) de chacun de leurs composants.

15 Les formulations 1 à 8 ci-dessous sont des compositions de suspensions aqueuses de nanocapsules selon la présente invention.

Les formulations 1 à 8 ont été obtenues selon le procédé de préparation qui a été décrit ci-dessus.

20

Formulation 1 :

- Dispersion lipidique de filtre UV à base de dioxyde de titane : 25 % ;
- Cire de Carnauba : 5 % ;
- Acide Oléique : 5 % ;

25

- Polycaprolactone : 0,2 % ;
- Sorbitan Oleate : 4,96 %
- Polysorbate 20 : 7,04 %
- Eau distillée : qsp 100%.

30 Formulation 2 :

- Dispersion lipidique de filtre UV à base de dioxyde de titane : 25 % ;
- Cire de Carnauba : 5 % ;
- Acide Oléique : 5 % ;
- Polycaprolactone : 0,1 % ;

35

- Sorbitan Oleate : 4,96 %
- Polysorbate 20 : 7,04 % ;
- Polysorbate 80 à 0,15% dans l'eau distillée : qsp 100%.

Formulation 3 :

- Dispersion lipidique de filtre UV à base de dioxyde de titane : 25 % ;
- Mélange huileux d'oleoyl macrogol-6 glycerides, d'oleoyl polyoxyl-6 glycerides, d'huile de noyau d'abricot et d'esters de polyéthylène glycol et d'acide stearique (ci-après abrégé PEG-6) : 8 % ;
- 5 - Mélange de polyglyceryl-3-dioleate et de polyglyceryl-3-oleate: 5 % ;
- Polycaprolactone : 0,4 % ;
- Gel de Poloxamère 188 à 25 % dans une solution de Polysorbate 80 à 0,15 % dans de l'eau distillée : qsp 100%.

10

Formulation 4 :

- Dispersion lipidique de filtre UV à base de dioxyde de titane : 27 % ;
- Mélange huileux d'oleoyl macrogol-6 glycerides, d'oleoyl polyoxyl-6 glycerides, d'huile de noyau d'abricot et d'esters de PEG-6 : 8 % ;
- 15 - Mélange de polyglyceryl-3-dioleate et de polyglyceryl-3-oleate: 5 % ;
- Polycaprolactone : 0,4 % ;
- Parfum : 1 % ;
- Phenoxyethanol et ethylhexylglycerine : 1 % ;
- Gel de Poloxamère 188 à 27 % dans une solution de Polysorbate 80 à 0,15 % dans de l'eau distillée : qsp 100%.

20

Formulation 5 :

- Dispersion lipidique de filtre UV à base de dioxyde de titane : 27 % ;
- Oxyde de cérium : 1%
- 25 - Mélange huileux d'oleoyl macrogol-6 glycerides, d'oleoyl polyoxyl-6 glycerides, d'huile de noyau d'abricot et d'esters de PEG-6 : 8 % ;
- Mélange de polyglyceryl-3-dioleate et de polyglyceryl-3-oleate : 5 % ;
- Polycaprolactone : 0,4 % ;
- Polysorbate 20 : 2% ;
- 30 - Gel d'alcool polyvinylique à 6% dans le polysorbate 80 à 0,15% dans de l'eau distillée qsp 100%.

Formulation 6 :

- Dispersion lipidique de filtre UV à base de dioxyde de titane : 18,29 % ;
- 35 - Cire de Carnauba : 5 % ;
- Acide Oléique : 5 % ;
- Polycaprolactone : 0,2 % ;

- Polysorbate 20 : 8,22 % ;
- Sorbitan oléate : 3,78% ;
- Eau distillée : 59,51%.

5 Formulation 7 :

- Dispersion lipidique de filtre UV à base de dioxyde de titane : 6,25 % ;
- Oxyde de cérium : 8%
- Cire de Carnauba : 5 % ;
- Acide Oléique : 5 % ;
- 10 - Polycaprolactone : 0,2 % ;
- Polysorbate 20 : 9,72 % ;
- Sorbitan oléate : 2,28%
- Eau distillée : 63,55%.

15 Formulation 8 :

- Cire de carnauba : 5 % ;
- Acide oléique : 5 % ;
- Oxybenzone : 10 % ;
- Polycaprolactone : 0,2 % ;
- 20 - Sorbitan oléate : 0,93 % ;
- Polysorbate 20 : 11,07 % ;
- Eau distillée : qsp 100 %.

En ce qui concerne la composition de la phase huileuse :

25 La dispersion lipidique de filtres UV minéraux de dioxyde de titane était une formulation de filtre UV dite « prête à l'emploi ». Elle comprenait des nanoparticules de dioxyde de titane dispersées. Cette dispersion lipidique contenait en masse 49,8% de particules de dioxyde de titane, dont le diamètre des particules était compris entre 15 et 124 nm, avec un diamètre moyen de 50 nm. Le fournisseur
30 de cette dispersion de filtre UV minéraux de dioxyde de titane indiquait un FPS de 2,5 à 3 par pourcentage de dioxyde de titane incorporé dans une formulation d'écran solaire.

L'oxyde de cérium (CeO) est un filtre UV minéral qui filtre principalement les UVA.

35 Le mélange huileux d'oleoyl macrogol-6 glycerides, d'oleoyl polyoxyl-6 glycerides, d'huile de noyau d'abricot et d'esters de PEG-6 est un mélange d'huiles solubilisantes. Dans les formulations 3 à 5, il s'agit de l'huile de la phase huileuse.

Le polyglyceryl-3 dioleate et le polyglyceryl-3 oleate sont des tensio-actifs non solubles dans l'eau dont le HLB sont respectivement de 6 et 5. Dans les formulations 3 à 5, ils ont été utilisés en tant que tensio-actifs solubles dans la phase huileuse.

5 La cire de carnauba est une cire issue des feuilles d'un palmier. Elle est solide à température ambiante. Elle est utilisée dans les formulations 1, 2, 6 à 8 comme huile de la phase huileuse (en association avec l'acide oléique).

L'acide oléique est une huile riche en acides gras. Il est utilisé dans les formulations 1, 2, 6 à 8 comme huile de la phase huileuse (et donc en association avec la cire de carnauba).

Le sorbitan oleate est un émulsionnant lipophile d'origine végétale. Dans les formulations 1, 2, 6 à 8, il a été utilisé en tant que premier agent tensio-actif.

En ce qui concerne la composition de la phase aqueuse :

15 Le poloxamère 188 est un polymère hydrophile, dont la structure comprend des blocs d'oxyde d'éthylène (EO) et d'oxyde de propylène (PO) arrangés selon la structure tri-blocs suivante : EOx – POy – EOx, et qui se présente sous la forme d'un hydrogel. Il est utilisé dans les formulations 3 et 4 pour épaissir et améliorer la texture finale, ainsi que la stabilité de la suspension aqueuse de nanocapsules selon l'invention.

Le gel d'alcool polyvinylique présent dans la formulation 5 est un polymère hydrophile sous forme d'hydrogel. Il est utilisé pour épaissir et améliorer la texture finale, ainsi que la stabilité de la suspension aqueuse de nanocapsules selon l'invention.

25 Les polysorbate 80 et 20 sont des agents tensio-actifs solubles dans l'eau de HLB respectifs 15 et 17. Dans le cadre de l'invention, il s'agit des agents tensioactifs solubles dans la phase aqueuse.

Le mélange phenoxyéthanol et ethylhexylglycérine est un excipient soluble dans l'eau qui a été ajouté comme agent conservateur dans la phase aqueuse de la formulation 4.

La formulation 4 contient aussi un parfum qui a été ajouté dans la phase aqueuse.

Les suspensions aqueuses de nanocapsules des formulations 1, 2, 6, 7 et 8 ont été réalisées de la manière suivante :

35 Du polycaprolactone qui est un polymère hydrophobe a été fondu à environ 95°C dans un bécher.

La cire de carnauba, l'acide oléique et le sorbitan oleate ont été mélangés avec le polycaprolactone fondu, sous agitation mécanique modérée entre 11 000 et 13000 tr/min (tr/min étant l'abréviation de « tour par minute ») à l'aide d'un agitateur à pales.

5 Les filtres UV minéraux ou organique (à savoir l'oxybenzone pour la formulation 8) détaillés ci-dessus ont été dispersés avec le mélange de polycaprolactone fondu avec la cire de carnauba, l'acide oléique et le sorbitan oleate jusqu'à obtention d'un mélange limpide.

10 La phase aqueuse a été préparée en dispersant le polysorbate 20 dans de l'eau distillée avec, le cas échéant pour la formulation 2 l'ajout de polysorbate 80.

La solution aqueuse ainsi obtenue a alors été chauffée à 90°C, afin d'être dispersée, sous agitation mécanique modérée entre 13 000 et 16 000 tr/min à l'aide d'un agitateur à pales, dans le mélange comprenant la polycaprolactone fondue, les filtres UV minéraux (ou le cas échéant le filtre UV organique), la cire de carnauba, 15 l'acide oléique et le sorbitan oléate.

La formation de nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention a été spontanée sous l'effet de l'agrégation de la polycaprolactone au contact de la phase aqueuse.

20 Les suspensions aqueuses des nanocapsules des formulations 3, 4 et 5 ont été réalisées de la manière suivante :

De la polycaprolactone a été fondue à environ 95°C dans un bécher.

25 Le mélange huileux d'oleoyl macrogol-6 glycerides, d'oleoyl polyoxyl-6 glycerides, d'huile de noyau d'abricot et d'esters de PEG-6 et le mélange huileux de polyglyceryl-3-dioleate et de polyglyceryl-3-oleate ont été mélangés ensemble avec la polycaprolactone fondue, sous agitation mécanique modérée, à savoir entre 11 000 et 13000 tr/min, à l'aide d'un agitateur à pales.

30 Les filtres UV minéraux détaillés ci-dessus ont été dispersés avec la polycaprolactone fondue et le mélange huileux d'oleoyl macrogol-6 glycerides, d'oleoyl polyoxyl-6 glycerides, d'huile de noyau d'abricot, d'esters de PEG-6, de polyglyceryl-3-dioleate et de polyglyceryl-3-oleate jusqu'à obtention d'un mélange limpide.

35 La phase aqueuse a été préparée en dispersant le gel de poloxamère dans le cas des fomulations 3 et 4, et le gel d'alcool polyvinylique dans le cas de la formulation 5, dans une solution de polysorbate 80 sous agitation mécanique lente, à savoir entre 500 et 1000 tr/min avec, le cas échéant pour la formulation 4 du parfum

et le mélange phenoxyethanol et ethylhexylglycerine et, pour la formulation 5 du polysorbate 20.

La solution aqueuse ainsi obtenue a été chauffée à 90°C afin d'être dispersée, sous agitation mécanique comprise entre 11 000 et 13 000 tr/min, à l'aide d'un agitateur à pales, dans le mélange comprenant la polycaprolactone fondue, le mélange huileux d'oleoyl macrogol-6 glycerides, d'oleoyl polyoxyl-6 glycerides, d'huile de noyau d'abricot, d'esters de PEG-6, de polyglyceryl-3-dioleate et de polyglyceryl-3-oleate et les filtres UV minéraux.

La formation de nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention a été spontanée sous l'effet de l'agrégation de la polycaprolactone au contact de la phase aqueuse.

Pour les formulations 1 à 8, il a été déterminé :

- 1) la taille des nanocapsules (en nm) ;
- 2) le potentiel zêta (en mV) ;
- 3) l'indice de polydispersion ;
- 4) la longueur d'onde critique (en nm).

Plus précisément, la taille et le potentiel zêta des nanocapsules ont été déterminés à l'aide d'un granulomètre et d'un zétamètre (zeta nanosizer ZS, Malvern Instrument) respectivement selon les principes de diffusion dynamique de la lumière et d'électrophorèse par effet Doppler.

Le tableau 1 ci-dessous détaille les valeurs obtenues de ces quatre paramètres pour chacune des formulations 1 à 8.

N° de formulation	Taille (nm)	Indice de polydispersion	Potentiel Zêta (mV)	Longueur d'onde critique (nm)
1	148 ±1	0,206 ± 0,007	-39,0 ± 1,0	369,4 ± 1,0
2	175 ± 21	0,454 ± 0,047	-38,4 ± 1,2	372,0 ± 0,0
3	637 ± 18	0,390 ± 0,052	-27,6 ± 0,6	379,4 ± 0,9
4	440 ± 9	0,291 ± 0,022	-34,2 ± 1,0	378,7 ± 0,4
5	323 ± 92	0,559 ± 0,038	-30,2 ± 2,0	368,8 ± 0,8
6	128 ±1	0,137 ± 0,016	-28,6 ± 0,685	369,2 ± 0,4
7	194 ±5	0,268 ± 0,027	-25,5 ± 0,453	376,0 ± 0,0
8	768±20	0,670 ± 0,01	-32,7 ± 2,02	359,8 ± 0,8

Tableau 1 : Valeurs de la taille, de l'indice de polydispersion, du potentiel zêta et de la longueur d'onde critique des formulations 1 à 8

D'après les valeurs de taille détaillées dans le tableau 1 ci-dessus, on relève que la taille des nanocapsules peut être comprise entre environ 100 nm et environ 770 nm.

5 L'indice de polydispersion des suspensions de nanocapsules permet d'évaluer si les nanocapsules sont plus ou moins dispersées dans des populations de tailles différentes.

Lorsque l'indice de polydispersion est :

- 10 - inférieur à 0,05 : la suspension est dite monomodale. Il y a une seule population de taille.
- compris entre 0,05 et 0,08 : la suspension est presque monomodale.
- compris entre 0,08 et 0,7 : la suspension est de polydispersité moyenne. Autrement dit, il existe différentes populations de taille de particules en suspension.
- 15 - supérieur à 0,7 : la suspension est très polydispersée. Autrement dit, il existe de nombreuses classes de populations de tailles dans la suspension.

20 Au vu des valeurs de l'indice de polydispersion détaillées dans le tableau 1, les suspensions de nanocapsules des formulations 1 à 8 sont toutes de polydispersité moyenne.

La mesure du potentiel zêta permet d'évaluer la charge des nanocapsules en suspension dans un solvant et ainsi de déterminer la stabilité de la suspension aqueuse de nanocapsules.

25 On estime qu'une suspension de nanocapsules est stable si son potentiel zêta est supérieur à 30 mV en valeur absolue.

Il y a deux mécanismes qui affectent fortement la stabilité d'une suspension : la répulsion stérique et la répulsion électrostatique.

30 Les suspensions de nanocapsules selon la présente invention comprennent un ou deux polymères et des tensio-actifs. Ces tensio-actifs vont largement influencer la stabilité de ces suspensions, puisque les nanocapsules vont se repousser stériquement et donc cela va inhiber les phénomènes d'instabilité comme la floculation ou la coalescence des nanocapsules en suspension.

35 Les suspensions de nanocapsules selon la présente invention présentant déjà un encombrement stérique, on estime qu'un potentiel zêta autour de 28 mV en valeur absolue indique une stabilité acceptable.

Au vu des valeurs du potentiel zêta détaillées dans le tableau 1, les suspensions de nanocapsules des formulations 1 à 8 sont toutes de stabilité acceptable.

5 La longueur d'onde critique correspond à la longueur d'onde en dessous de laquelle l'intégrale de la courbe du spectre d'absorption commençant à 290 nm atteint 90% de l'intégrale de 290 à 400 nm. Il est connu que pour les écrans solaires aient une efficacité optimale, il faut qu'ils aient une longueur d'onde critique d'au minimum environ 370 nm. Au vu des valeurs des longueurs d'ondes critiques détaillées dans le tableau 1, on relève que les formulations 1 à 7 valident toutes ce critère requis quant à la longueur d'onde critique. En effet, les valeurs de la longueur d'onde critique de ces formulations 1 à 7 sont comprises entre environ 369 nm et 380 nm.

15 En ce qui concerne la formulation 8 qui est la seule formulation qui comprend un filtre UV organique (l'oxybenzone), la valeur de la longueur d'onde critique de 359,8 nm est inférieure à la longueur d'onde critique des formulations 1 à 7 qui comprennent toutes des filtres UV minéraux. Cela s'explique par le fait que l'oxybenzone est un filtre UV qui est connu pour filtrer essentiellement les UVB. Il n'en demeure pas moins que la suspension aqueuse de nanocapsules de la formulation 8 pourrait parfaitement être utilisée dans la formulation d'un écran solaire.

20

Le tableau 2 ci-dessous détaille pour chacune des formulations 1 à 8 :

- 25 - Le FPS *in vitro* « théorique » qui a été estimé à partir des données fournies par le fournisseur des filtres UV minéraux ou organique (pour le cas de la formulation 8) utilisés dans les formulations 1 à 8 qui se présentaient sous la forme de filtres UV minéraux ou organique « prêts à l'emploi » (autrement dit pouvant être directement incorporés dans une formulation d'écran solaire).
- Le FPS *in vitro* « mesuré » qui a été déterminé selon les directives de 2011 de la fédération européenne des industries cosmétiques : la « Cosmetics Europe Association », anciennement appelée COLIPA.
- 30 - L'indice d'augmentation du FPS : l'indice d'augmentation du FPS obtenu du fait de l'encapsulation du filtre UV dans des nanocapsules selon l'invention par rapport au FPS de ce même filtre UV indiqué par le fournisseur, à savoir « sous forme libre », c'est-à-dire non-encapsulé.

35

L'indice d'augmentation du FPS est obtenu selon la formule suivante II :

Indice d'augmentation du FPS =

$$\frac{(\text{FPS } in \text{ vitro } \text{ mesuré}) - (\text{FPS } in \text{ vitro } \text{ théorique})}{(\text{FPS } in \text{ vitro } \text{ théorique})} \times 100 \text{ (II)}$$

5

N° de formulation	FPS <i>in vitro</i> théorique	FPS <i>in vitro</i> mesuré	Indice d'augmentation du FPS (%)
1	Entre 30,7 et 36,9	66,2	Entre 79,4 et 115,3
2	Entre 30,7 et 36,9	49,1	Entre 33,1 et 59,9
3	Entre 30,7 et 36,9	46,3	Entre 25,5 et 50,6
4	Entre 33,2 et 39,8	52,1	Entre 30,8 et 56,9
5	Entre 33,2 et 39,8	51,8	Entre 30,1 et 55,8
6	25	62,1	150,0
7	8,5	29,1	243,5
8	11	19	73

Tableau 2 : Valeurs des FPS théoriques et mesurés, ainsi que l'indice d'augmentation du FPS des formulations 1 à 8

La figure 1 est un histogramme réalisé à partir des valeurs des formulations 1 à 5 détaillées dans ce tableau 2. Plus précisément, sur cet histogramme figurent pour les formulations 1 à 5 :

10

- la valeur moyenne du FPS *in vitro* théorique, avec la barre d'écart-type ;
- la valeur du FPS *in vitro* mesuré, et
- la valeur moyenne de l'indice d'augmentation du FPS (exprimé en pourcentage).

15

Le tableau 2 et la figure 1 révèlent également que les formulations 1 à 8 selon la présente invention présentent un indice d'augmentation du FPS compris entre environ 25% et 244%. Cela est tout à fait remarquable et signifie que l'encapsulation des filtres UV de manière à obtenir des nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention a permis d'augmenter très significativement le FPS de ces filtres UV.

20

Du fait de cet indice d'augmentation du FPS très important, il convient de relever que ces nanocapsules en suspension aqueuse selon la présente invention sont très avantageuses pour leur utilisation dans la formulation d'écran solaire, en particulier d'écran solaire comprenant des filtres UV minéraux.

25

En effet, dans ces formulations d'écran solaire, la concentration en filtres UV, en particulier en filtres UV minéraux, pourra être inférieure à celle que contiennent les autres formulations d'écran solaire incorporant ces mêmes filtres UV minéraux, et ce tout en offrant une protection solaire parfaitement conforme à la réglementation en vigueur.

Ainsi, du fait de cette quantité réduite en filtres UV, en particulier en filtres UV minéraux (par exemple le dioxyde de titane), tout en garantissant une protection solaire tout à fait acceptable pour les réglementations, les formulations d'écran solaire comprenant des nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention limiteront, voire même supprimeront, le problème esthétique des traces blanches et/ou les difficultés d'étalement de l'écran solaire que pouvaient poser les formulations d'écran solaire connues contenant ces filtres UV minéraux.

On comprend aisément les avantages procurés par la présente invention en ce qui concerne la formulation d'écran solaire incorporant des nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention.

De plus, les formulations A et B ci-dessous d'écran solaire selon la présente invention ont été préparées.

Les compositions de ces formulations A et B sont détaillées ci-dessous. Parmi les composants de ces formulations A et B, il y a les suspensions aqueuses de nanocapsules des formulations 6 et 7 qui ont été décrites ci-dessus.

Formulation A :

- particules de CeO : 5 % ;
- dispersion lipidique de ZnO : 1 % ;
- 25 - huile de Karanja : 5 % ;
- formulation 6 : 67 % ;
- formulation 7 : 18 % ;
- di-glycérine : 1 % ;
- parfum : 1% ;
- 30 - Phénoxyéthanol : 1 % ;
- Sepineo P 600[®] : 1 %.

Formulation B :

- particules de CeO : 3 % ;
- 35 - dispersion lipidique de ZnO : 2 % ;
- huile de Karanja : 8 % ;

- formulation 6 : 65 % ;
- formulation 7 : 18 % ;
- di-glycérine : 1 % ;
- parfum : 1% ;
- 5 - Phénoxyéthanol : 1 % ;
- Sepineo P 600[®] : 1 %.

Dans les formulations A et B :

10 La dispersion d'oxyde de zinc (ZnO) était une dispersion lipidique de filtres UV dite « prête à l'emploi ». Elle comprenait 67 % en masse de microparticules d'oxyde de zinc dont la taille était supérieure à 100 nm. Le fournisseur de cette dispersion d'oxyde de zinc indiquait un FPS de 1 à 1,5 par pourcentage d'oxyde de zinc incorporé dans une formulation d'écran solaire.

15 La di-glycérine est un dimère de glycérine. Le nom commercial du produit utilisé est « diglycérine S ».

Le Sepineo P 600[®] est un polymère épaississant, émulsifiant et stabilisant. Plus précisément, il s'agit d'un mélange d'acrylamide, de copolymère de taurate-acryloyldiméthyl de sodium, d'isohexadécane et de Polysorbate 80.

20 Le tableau 3 ci-dessous détaille pour chacune des formulations A et B :

- Les pourcentages massiques des filtres UV minéraux que sont le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc et l'oxyde de cérium.
 - Le FPS *in vivo* « théorique » qui a été estimé à partir des données fournies par le fournisseur des filtres UV minéraux utilisés dans ces formulations A et B, à savoir la dispersion d'oxyde de zinc, la dispersion de dioxyde de titane (formulation 6 et 7) et l'oxyde de cerium (formulation 7) et qui se présentaient sous la forme de filtres UV minéraux « prêts à l'emploi » - autrement dit pouvant être directement incorporés dans une formulation d'écran solaire.
 - Le FPS *in vivo* « mesuré » qui a été déterminé selon les directives de 2011 de la 25 fédération européenne des industries cosmétiques : la « Cosmetics Europe Association », anciennement appelée COLIPA.
 - L'indice d'augmentation du FPS : l'indice d'augmentation du FPS obtenu du fait de l'encapsulation du filtre UV dans des nanocapsules selon l'invention par rapport au FPS de ce même filtre UV indiqué par le fournisseur, à savoir « sous 30 forme libre », c'est-à-dire non-encapsulé.
 - La longueur d'onde critique (nm).
- 35

N° de formulation	% de TiO ₂	% de ZnO	% de CeO	FPS <i>in vivo</i> théorique	FPS <i>in vivo</i> mesuré	Indice d'augmentation du FPS (%)	Longueur d'onde critique (nm)
A	6,58	0,68	6,44	19	37	95	376,3 ± 0,5
B	6,4	1,36	4,44	19	42	121	376,2 ± 0,4

Tableau 3 détaillant les pourcentages massiques des filtres UV minéraux (TiO₂, ZnO et CeO), le FPS in vivo théorique, le FPS in vivo mesuré, l'indice d'augmentation du FPS et la longueur d'onde critique des formulations A et B.

5 D'après, le tableau 3, on relève que les valeurs de longueur d'onde critique des formulations A et B sont supérieures à 370 nm. Cela témoigne d'une efficacité optimale de protection solaire de ces formulations d'écran solaire.

En outre, on relève que les formulations A et B présentent un indice d'augmentation du FPS de respectivement 95% et 121%. Cela témoigne que
10 l'incorporation de nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention dans des formulations d'écran solaire A et B a permis d'obtenir des formulations d'écran solaire dont le FPS a été augmenté très significativement par rapport au FPS de formulations d'écran solaire équivalentes mais dans lesquelles les filtres UV n'étaient pas encapsulés.

15 Les valeurs de FPS détaillées dans le tableau 3 témoignent de tout l'intérêt d'incorporer dans des formulations d'écran solaire des filtres UV encapsulés dans des nanocapsules en suspension aqueuse selon l'invention.

L'exemple détaillé ci-dessous est un exemple comparatif entre une suspension aqueuse de nanocapsules selon l'invention et une suspension de
20 nanocapsules obtenues selon le procédé décrit dans la demande WO 2010/040194 A2 précitée.

Plus précisément, on a comparé le FPS de deux suspensions aqueuses de nanocapsules chargées avec 10% de filtre UV chimique (l'oxybenzone) :

- la suspension 1 qui correspond exactement à la formulation 8 qui a été décrite
25 ci-dessus ;
- la suspension 2 qui a été obtenue à partir du procédé décrit dans la demande WO 2010/040194 A2.

La suspension 2 avait la composition suivante :

- 30 - Oxybenzone : 10 % ;
- Polycaprolactone : 0,19 % ;

- Sorbitan oléate : 2 % ;
 - Huile de Karanja : 1 % ;
 - Acétone : 27 mL ;
 - Polysorbate 80 : 2 % ;
- 5 - Eau distillée : qsp 100 %.

La suspension 2 a été obtenue à partir du procédé de préparation décrit dans l'unique exemple de préparation de nanocapsules de la demande WO 2010/040194 A2, à savoir à la page 17 de cette demande internationale.

10 La suspension 2 a été obtenue de la manière suivante :

On a préparé une phase aqueuse en dissolvant le polysorbate 80 dans de l'eau distillée.

15 On a préparé une phase organique en mélangeant le sorbitan oléate, la polycaprolactone, l'oxybenzone, l'huile de Karanja dans de l'acétone, et ce de manière à ce que tous les composants de la phase organique (ou autrement dit la phase huileuse) soient dissous pour obtenir un mélange homogène.

Ensuite, on a ajouté la phase organique à la phase aqueuse et soumis le mélange ainsi obtenu à une agitation pour bien l'homogénéiser.

20 L'acétone a été évaporée de manière à obtenir une suspension aqueuse de nanocapsules.

Le tableau 4 ci-dessous détaille le FPS *in vitro* théorique et mesuré, ainsi que l'indice moyen d'augmentation du FPS des suspensions 1 et 2.

Suspensions	FPS <i>in vitro</i> théorique moyen	FPS <i>in vitro</i> mesuré	Indice moyen d'augmentation du FPS (en %)
Suspension 1	11	19	73
Suspension 2	11	4	0

25 Tableau 4 détaillant le FPS *in vitro* théorique et mesuré, ainsi que l'indice moyen d'augmentation du FPS des suspensions 1 et 2

30 D'après le tableau 4, on relève que la suspension aqueuse 1 de nanocapsules selon l'invention présente un indice d'augmentation du FPS de 73%, et ce à la différence de la suspension 2 pour laquelle l'indice d'augmentation du FPS est nul.

Ainsi, par comparaison avec des suspensions aqueuses de nanocapsules obtenues selon un autre procédé de préparation mais avec des quantités équivalentes

de filtre UV encapsulé, cet exemple comparatif témoigne de tout l'intérêt des suspensions aqueuses de nanocapsules selon l'invention qui :

- a) présentent un indice d'augmentation du FPS, et
- b) ne nécessitent pas dans leur procédé de préparation la mise en œuvre de solvant organique dans la phase huileuse et dont les inconvénients ont été détaillés ci-dessus.

5
10 En d'autres termes, par comparaison avec des suspensions aqueuses de nanocapsules de l'état de l'art, en l'occurrence les suspensions décrites dans la demande WO 2010/040194 A2, les suspensions aqueuses de nanocapsules selon l'invention exhibent non seulement des propriétés de protection solaire plus performantes, mais aussi leur procédé de préparation est moins contraignant et plus rapide, car il ne nécessite pas une étape d'élimination d'un des composants de la phase huileuse, à savoir le solvant organique (par exemple l'acétone) à l'issue de leur préparation.

15 En outre, les suspensions aqueuses de nanocapsules selon l'invention, affranchies de tout solvant organique au cours de la préparation de la phase huileuse, ne présentent pas le risque de comprendre cette « impureté » consistant en ce solvant organique. Or, ce risque demeure pour les suspensions aqueuses de nanocapsules de l'état de l'art précitées, et ce malgré toutes les mesures prises au cours de l'étape d'élimination de ce solvant organique.

20

REVENDEICATIONS

1. Suspension aqueuse de nanocapsules qui comprennent un coeur
huileux dans lequel au moins un filtre UV est dispersé de façon homogène et une
5 enveloppe polymérique contenant au moins un polymère hydrophobe, ladite
suspension aqueuse de nanocapsules est susceptible d'être obtenue par un procédé
de préparation dans lequel on mélange :

- a) une première phase, dite phase huileuse, qui comporte :
- au moins un polymère hydrophobe,
 - 10 - au moins une huile,
 - au moins un filtre UV, et
 - au moins un premier agent tensio-actif,

cette première phase étant portée à une température T1 supérieure à la température
de fusion du polymère hydrophobe,

15 à cette température T1, le polymère hydrophobe étant miscible au mélange du
premier agent tensio-actif et de l'huile, et le filtre UV étant miscible, soluble ou
solubilisé, dans le mélange du premier agent tensio-actif et de l'huile ;

b) une deuxième phase, dite phase aqueuse, qui comprend de l'eau
et/ou au moins un solvant polaire, et optionnellement au moins un deuxième agent
20 tensio-actif,
de manière à obtenir la formation de nanocapsules en suspension aqueuse.

2. Suspension aqueuse de nanocapsules selon la revendication 1,
caractérisée en ce que le filtre UV est choisi parmi les filtres UV organiques, les filtres
25 UV minéraux ou tout composé possédant un pouvoir de filtration dans les UVB et/ou
les UVA.

3. Suspension aqueuse de nanocapsules selon la revendication 2,
caractérisée en ce que le filtre UV est choisi parmi l'oxylbenzone, le sulisobenzone, le
30 dioxybenzone, l'éthyl anthranilate, l'avobenzone, le terphatylidene, le dicamphre
acide sulfonique, le bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine, le bis-
ethylhexyloxyphenol, le methoxy phenyl triazoeno, le para-amino acide benzoïque, le
p-amyl dimethyl para-amino acide benzoïque, le 2-ethoxyethyl-p-methoxycinnamate,
le digalloyl trioleate, l'éthyl 4-bishydroxypropylaminobenzone, le 2-ethoxyethyl 2-
35 cyano-3,3,diphenylacrylate, le 2-ethylhexyl-p-methoxy cinnamate, le 2-
ethylhexylsalicylate, le glyceryl para-amino acide benzoïque, l'homo-methyl salicylate,

le dihydroxyacetone, l'octyl dimethyl para-amino acide benzoïque, le 2-phenylbenzimidazole-acide sulfonique et le triethanolamine salicylate.

4. Suspension aqueuse de nanocapsules selon la revendication 2,
5 caractérisée en ce que le filtre UV est choisi parmi le dioxyde de titane, l'oxyde de zinc, l'oxyde de cérium, le kaolin et le talc.

5. Suspension aqueuse de nanocapsules selon la revendication 2,
10 caractérisée en ce que le filtre UV est choisi parmi les molécules naturelles ou les huiles ayant des propriétés de filtration des UVB et/ou UVA telles que la cire de carnauba, l'huile d'olive, l'huile de karanja, l'acide usnique, la propolis et l'extrait de concombre.

6. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la phase huileuse comprend en masse de 0,1 % à 70 %, de préférence de 0,1 % à 20 % de filtre UV.

7. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des
20 revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'huile est choisie parmi les triglycérides, les propylène glycol dicaprylocaprates, les macrogolglycérides oléoyles, lauroyles et linoléoyles, les huiles végétales, les cires animales et les cires végétales.

8. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la phase huileuse comprend de 5 % à 85 %, de préférence de 10 % à 40 %, en masse d'huile.

9. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le polymère hydrophobe est choisi parmi les polymères vinyliques, les polyesters, les polyamides, les polyuréthanes et les polycarbonates.

10. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des
revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la phase huileuse comprend de 0,1 % à 4%, de préférence de 0,1 % à 0,5 %, en masse de polymère hydrophobe.

11. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le premier agent tensio-actif est choisi parmi les propylène glycol laurates, les propylène glycol caprylates, les polyglycéril oléates, les macrogolglycérides caprylocaproyles et les esters de sorbitan.

5

12. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la phase huileuse comprend de 2 % à 50 %, de préférence de 2 % à 6 %, en masse de premier agent tensio-actif.

10

13. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le deuxième agent tensio-actif est choisi parmi les polysorbates 20, 60, 80, les macrogol stéarates, les macrogol cetostéaryl éthers, les macrogol lauryl éthers, les macrogol oleyl éthers, les macrogol oléates, l'huile de ricin polyoxyl et l'huile de ricin polyoxyl hydrogénée.

15

14. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que la phase aqueuse comprend de 0,1 % à 12 %, de préférence de 5 % à 10 %, en masse de deuxième agent tensio-actif.

20

15. Suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que les nanocapsules ont un diamètre inférieur à 1000 nm.

16. Composition d'écran solaire solaire comprenant au moins une suspension aqueuse de nanocapsules selon l'une quelconque des revendications 1 à 15.

17. Composition d'écran solaire selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle est formulée sous la forme d'une émulsion fluide, d'une émulsion épaisse, d'un gel, d'une huile, d'un stick ou d'une lotion.

35

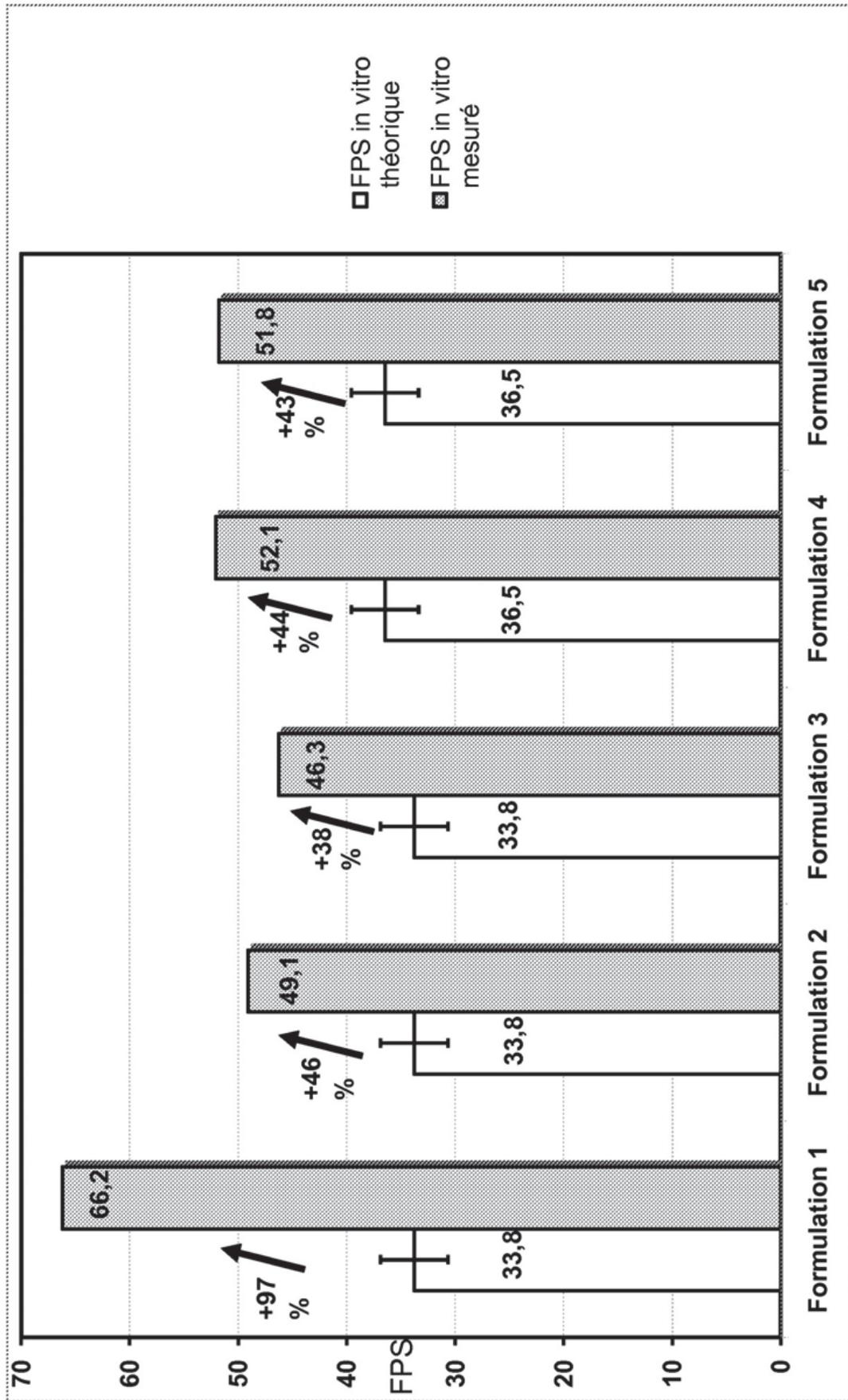


FIG.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/052086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61Q17/04 A61K8/11 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 736 544 A1 (OREAL [FR]) 17 January 1997 (1997-01-17) page 1, lines 6-11 Une émulsion eau dans huile (E/H); pages 9-10	1,2,4,7, 9,10,12, 15-17
X	----- WO 2010/040194 A2 (BIOLAB SANUS FARMACEUTICA LTDA [BR]; UNIV FED DO RIO GRANDE DO SUL [BR]) 15 April 2010 (2010-04-15) page 1, paragraph 1 Préparation de la base semi-solide; page 22, paragraph dernière; exemple 2.2 Préparation d'un FSP 45; pages 15-16; exemple 1.2 Préparation de nanocapsules; page 17; exemple 2.1 ----- -/--	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 November 2014		Date of mailing of the international search report 04/12/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Durand-Oral, Ilknur

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/052086

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2736544	A1	17-01-1997	NONE

WO 2010040194	A2	15-04-2010	AR 073816 A1 01-12-2010
			AU 2009301652 A1 15-04-2010
			BR PI0805854 A2 24-08-2010
			CA 2740080 A1 15-04-2010
			CO 6382104 A2 15-02-2012
			EP 2344119 A2 20-07-2011
			US 2011262531 A1 27-10-2011
			WO 2010040194 A2 15-04-2010

FR 2930176	A1	23-10-2009	EP 2265364 A1 29-12-2010
			FR 2930176 A1 23-10-2009
			US 2011111019 A1 12-05-2011
			US 2013207286 A1 15-08-2013
			WO 2009138606 A1 19-11-2009

FR 2937248	A1	23-04-2010	CN 102186462 A 14-09-2011
			EP 2349225 A1 03-08-2011
			FR 2937248 A1 23-04-2010
			JP 2012505742 A 08-03-2012
			US 2011200654 A1 18-08-2011
			US 2014227329 A1 14-08-2014
			WO 2010046583 A1 29-04-2010

WO 03011239	A2	13-02-2003	EP 1411888 A2 28-04-2004
			JP 2005504750 A 17-02-2005
			US 2004175335 A1 09-09-2004
			WO 03011239 A2 13-02-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/052086

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61Q17/04 A61K8/11 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61Q A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 736 544 A1 (OREAL [FR]) 17 janvier 1997 (1997-01-17) page 1, ligne 6-11 Une émulsion eau dans huile (E/H); pages 9-10	1,2,4,7, 9,10,12, 15-17
X	WO 2010/040194 A2 (BIOLAB SANUS FARMACEUTICA LTDA [BR]; UNIV FED DO RIO GRANDE DO SUL [BR]) 15 avril 2010 (2010-04-15) page 1, alinéa 1 Préparation de la base semi-solide; page 22, alinéa dernière; exemple 2.2 Préparation d'un FSP 45; pages 15-16; exemple 1.2 Préparation de nanocapsules; page 17; exemple 2.1	1-17
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
11 novembre 2014	04/12/2014	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Durand-Oral, Ilknur	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 930 176 A1 (UNIV CLAUDE BERNARD LYON I ETA [FR] UNIV CLAUDE BERNARD LYON [FR]) 23 octobre 2009 (2009-10-23) cité dans la demande le document en entier -----	1-12
A	FR 2 937 248 A1 (MICROCAPSULES TECHNOLOGIES [FR]) 23 avril 2010 (2010-04-23) le document en entier -----	1-12
A	WO 03/011239 A2 (MERCK PATENT GMBH [DE]; PFLUECKER FRANK [DE]; DRILLER HANS-JUERGEN [DE]) 13 février 2003 (2003-02-13) le document en entier -----	1-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/052086

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2736544	A1	17-01-1997	AUCUN	
WO 2010040194	A2	15-04-2010	AR 073816 A1	01-12-2010
			AU 2009301652 A1	15-04-2010
			BR PI0805854 A2	24-08-2010
			CA 2740080 A1	15-04-2010
			CO 6382104 A2	15-02-2012
			EP 2344119 A2	20-07-2011
			US 2011262531 A1	27-10-2011
			WO 2010040194 A2	15-04-2010
FR 2930176	A1	23-10-2009	EP 2265364 A1	29-12-2010
			FR 2930176 A1	23-10-2009
			US 2011111019 A1	12-05-2011
			US 2013207286 A1	15-08-2013
			WO 2009138606 A1	19-11-2009
FR 2937248	A1	23-04-2010	CN 102186462 A	14-09-2011
			EP 2349225 A1	03-08-2011
			FR 2937248 A1	23-04-2010
			JP 2012505742 A	08-03-2012
			US 2011200654 A1	18-08-2011
			US 2014227329 A1	14-08-2014
			WO 2010046583 A1	29-04-2010
WO 03011239	A2	13-02-2003	EP 1411888 A2	28-04-2004
			JP 2005504750 A	17-02-2005
			US 2004175335 A1	09-09-2004
			WO 03011239 A2	13-02-2003

Chapitre IV:

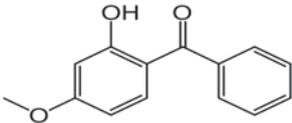
**Formulation d'un filtre UV chimique, la
benzophénone-3, dans des particules
lipidiques submicroniques**

A- Introduction :

L'utilisation d'écrans solaires est un moyen efficace pour protéger la peau des effets néfastes du rayonnement UV. Les filtres UV organiques sont les filtres UV préférentiellement incorporés dans les écrans solaires de par leur facilité à être formulés et leur fini esthétique satisfaisant sur la peau [13, 41, 169]. Pour exercer son effet protecteur sur la peau de manière optimale, un filtre UV doit rester au niveau des couches cutanées les plus superficielles. Le SC constitue une barrière efficace contre les agents physiques et chimiques exogènes pouvant entraîner des effets néfastes s'ils venaient à pénétrer l'organisme. Cependant, cette barrière peut être détériorée notamment par le rayonnement UV ce qui peut faciliter la pénétration de molécules telles que les filtres UV organiques contenus dans les écrans solaires [170]. Plusieurs études ont montré la capacité de plusieurs filtres UV organiques à pénétrer la peau en entraînant des effets indésirables [41, 170]. La BP-3 est un des filtres UV organique les plus controversé puisque, de par ses propriétés physico-chimiques (Tableau 16), elle a la capacité de pénétrer la peau. En effet, la BP-3 a pu être détectée dans le plasma sanguin, le lait maternel et les urines d'individus après application topique [91, 171, 172]. Plusieurs études ont montré que la BP-3 peut engendrer des réactions allergiques et photo-allergiques [173] et également agir comme perturbateur endocrinien [174]. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études montrant l'intérêt des micro-transporteurs (i.e. taille > 1 μm) et nano-transporteurs (i.e. taille < 1 μm) lipidiques pour formuler les filtres UV organiques ont été publiées. Ces transporteurs lipidiques permettraient de protéger les filtres UV organiques des phénomènes de photo-dégradation, qui sont couramment subis par ce type de molécules, et également de limiter leur pénétration cutanée [175-178]. Des études ont montré que la formulation de la BP-3 dans des SLN réduisait son absorption percutanée de 50 % par rapport à une émulsion H/E [152, 154, 179, 180]. Les nanocapsules lipidiques polymériques se sont aussi montrées efficaces pour réduire la perméation cutanée de la BP-3 tout en augmentant ses propriétés photo-protectrices dans le domaine UV [181]. Toutes ces études publiées confirment la nécessité de développer des formulations innovantes pour les filtres UV chimiques qui permettraient d'obtenir un haut pouvoir photo-protecteur tout en réduisant la perméation percutanée de ces molécules afin de prévenir les effets indésirables sur l'organisme qu'elles peuvent engendrer. Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques sont des transporteurs colloïdaux particulièrement intéressants pour véhiculer des molécules lipophiles [182, 183, 147]. Ces transporteurs lipidiques permettent de protéger les PA des phénomènes de photo-dégradation, d'améliorer leur biodisponibilité et également de contrôler leur libération [184-185]. Ces transporteurs lipidiques colloïdaux seraient efficaces pour permettre aux filtres UV organiques de s'accumuler au niveau des couches cutanées les plus superficielles pour garantir un effet photo-protecteur optimal [181, 185, 186]. La taille de ces transporteurs lipidiques (i.e. taille < 1 μm) facilite leur incorporation dans des formulations dermatologiques [187]. Les SLN possèdent un cœur lipidique solide à température ambiante composé par des lipides physiologiquement tolérés et biodégradables [150, 151, 188]. Les

NLC possèdent un cœur lipidique constitué par un mélange de lipides solides et liquides à température ambiante [181]. Cette seconde génération de SLN permet (i) d'améliorer la formulation des molécules dans la matrice lipidique, (ii) de moduler le profil de libération de la molécule formulée et (iii) de prolonger le maintien de la molécule dans le cœur lipidique durant le stockage de la formulation [189]. La matrice lipidique des NPLC et des NC est associée à un polymère hydrophobe. La membrane polymérique des NPLC et des NC permet la libération prolongée ainsi que la protection des molécules lipophiles encapsulées dans le cœur de ces transporteurs lipidiques polymériques [183, 147]. Le but de cette étude est de comparer la capacité des SLN, NLC, NPLC et NC à formuler la BP-3 en réduisant sa pénétration cutanée vers l'épiderme vivant. Les suspensions de SLN, NLC, NPLC et NC ont été caractérisées en termes de diamètre hydrodynamique moyen ($Z\text{-Ave}$), de polydispersité (Pdl) et de potentiel Zeta (ζ). De plus, le FPS des différentes suspensions a été évalué *in vitro*. Les résultats concernant l'absorption percutanée de la BP-3 sont discutés en parallèle des résultats de granulométrie, de taux d'encapsulation et de FPS.

Tableau 16 : Propriétés physico-chimiques et données toxicologiques publiées de la BP-3.

Propriétés physico-chimiques		Données toxicologiques publiées
Nom IUPAC	2-hydroxy-4-méthoxybenzophénone	Dermatites photo-allergiques de contact [173, 197]
Structure chimique		Pénétration cutanée chez l'Homme [89, 90]
Poids moléculaire	228,24 g.mol ⁻¹	Production de DRO dans le cytoplasme des kératinocytes humains [198]
Log (K _{Oct/Eau})	3,7	Détection dans le plasma, les urines et le lait maternel [87, 88, 199]
Solubilité dans l'eau à 20°C	3,7 mg.L ⁻¹	Activité œstrogénique [59, 61, 96]
Point de fusion	62°C – 65°C	Polluant écologique et environnemental [104, 200, 201]

A- Etude comparative de la perméation cutanée de la BP-3 formulée dans des nanoparticules et des nanocapsules lipidiques:

1- Matériels et méthodes:

a) Formulation des suspensions de nanoparticules et nanocapsules lipidiques contenant de la BP-3:

La composition et les modes opératoires de formulation des différentes suspensions sont présentés dans le Tableau 17 et les Figures 33 et 34. La phase lipidique des suspensions de SLN, NLC et NPLC a été chauffée à 85°C sous agitation magnétique pendant trente minutes. La phase aqueuse de ces suspensions a également été chauffée à 85°C avant d'être ajoutée dans la phase lipidique sous agitation magnétique. Les deux phases ont été homogénéisées magnétiquement pendant trois minutes avant d'être homogénéisées sous ultrasons pendant dix minutes. Les suspensions obtenues ont ensuite été refroidies sous agitation magnétique. Une fois la température des suspensions redescendue sous les 30°C, elles ont été conditionnées et étudiées.

Concernant la suspension de NC, la phase huileuse a été chauffée à 85°C sous agitation mécanique et laissée homogénéiser ainsi pendant trente minutes. La phase aqueuse a également été chauffée à 85°C sous agitation mécanique avant d'être ajoutée dans la phase lipidique sous agitation mécanique. La suspension est ensuite laissée à refroidir ainsi jusqu'à ce que sa température chute en dessous de 30°C. La suspension a alors été conditionnée et étudiée.

Pour cette étude, une solution aqueuse d'albumine a été préparée comme formulation témoin en mélangeant de l'albumine dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) pour y solubiliser la BP-3. La solution est laissée à homogénéiser pendant trente minutes avant d'être conditionnée. La Figure 35 montre la représentation schématique d'un SLN, d'un NLC, d'un NPLC et d'une NC.

b) Analyse de la granulométrie et du potentiel Zeta des NLC et des NPLC:

Le *Z-Ave*, le *Pdl* ainsi que le potentiel ζ des SLN, des NLC, des NPLC et des NC ont été déterminés selon les principes de diffusion dynamique de la lumière (DDL) et de l'électrophorèse laser Doppler (ELD) respectivement pour le *Z-Ave* et le *Pdl* et pour le potentiel ζ . Le Zetasizer nano ZS® (Malvern Instrument, France) permet d'analyser des solutions colloïdales de suspensions dont la taille des particules se situe entre 0,6 nm et 6 μm sous un angle de détection de 173° et une longueur d'onde de 633 nm. Le potentiel ζ des particules lipidiques en suspension a été mesuré sous une conductivité maximale de 200 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Les formulations ont préalablement été diluées dans de l'eau déminéralisée avant les mesures. Les mesures ont été réalisées à $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ dans des cuves en polystyrène adaptées. Les valeurs de *Z-Ave*, *Pdl* et de potentiel ζ correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 10 mesures expérimentales.

Tableau 17 : Composition des suspensions de SLN, NLC, NPLC et NC contenant de la BP-3 (% m/m).

Composés	Concentrations (% m / m)				Solution aqueuse d'albumine
	SLN	NLC	NPLC	NC	
Suppocire AIML [®]	10	10	10	-	-
Acide oléique	-	5	5	-	-
Labrafil M1944CS [®]	-	-	-	10	-
Plurol oléique CC497 [®]	-	-	-	10	-
Poly-ε-caprolactone	-	-	0,5	0,5	-
BP-3	5	5	5	5	5
Montane 80 [®]	6	4	4	-	-
Montanox 80 [®]	-	-	-	0,08	-
Montanox 20 [®]	4	6	6	-	-
Poloxamer 188 [®]	-	-	-	24	-
Albumine de blanc d'oeuf	-	-	-	-	2
Solution de PBS	-	-	-	-	Qsp 100
Eau déminéralisée	Qsp 100	Qsp 100	Qsp 100	Qsp 100	-

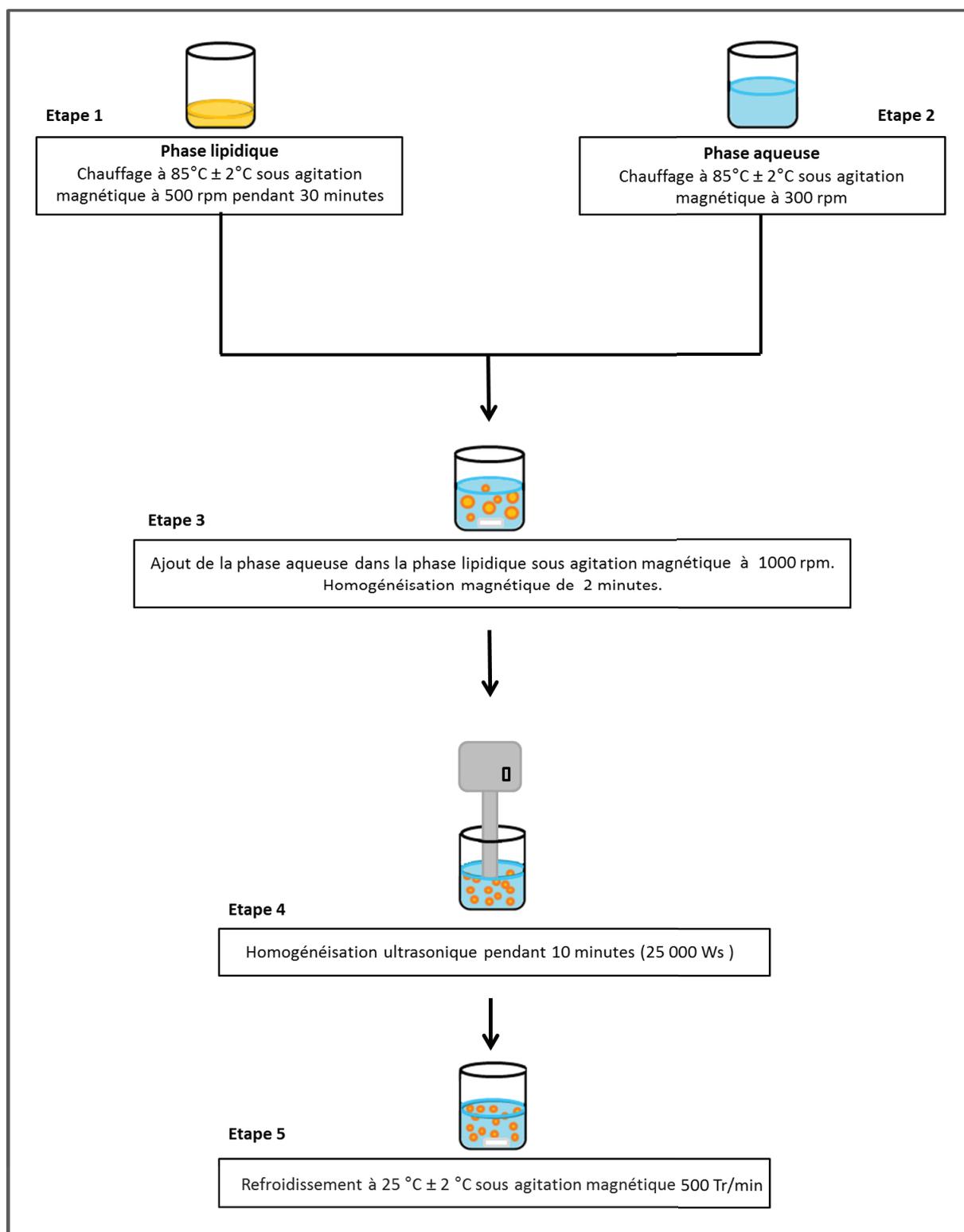


Figure 33: Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de SLN, NLC et NPLC.

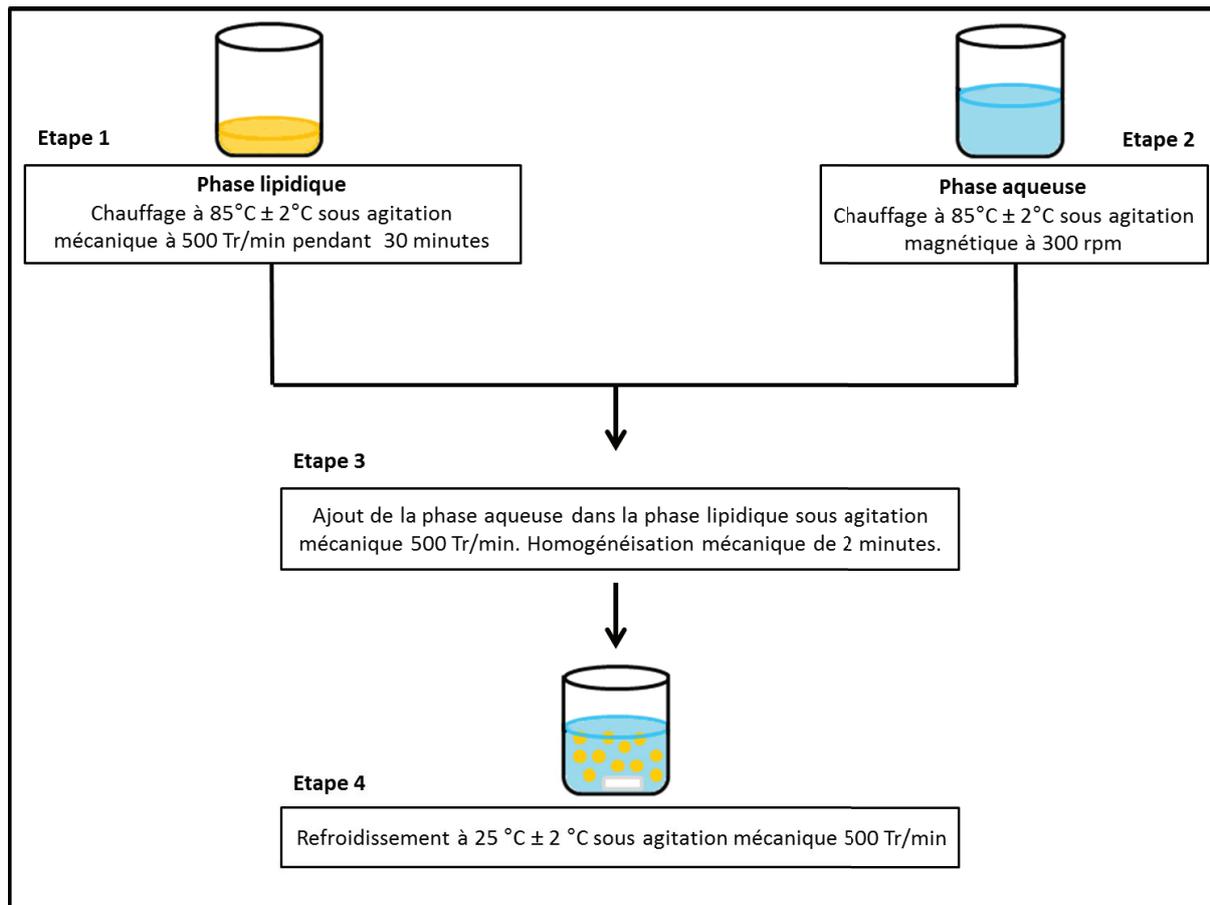


Figure 34 : Représentation schématique du mode opératoire de formulation des suspensions de NC.

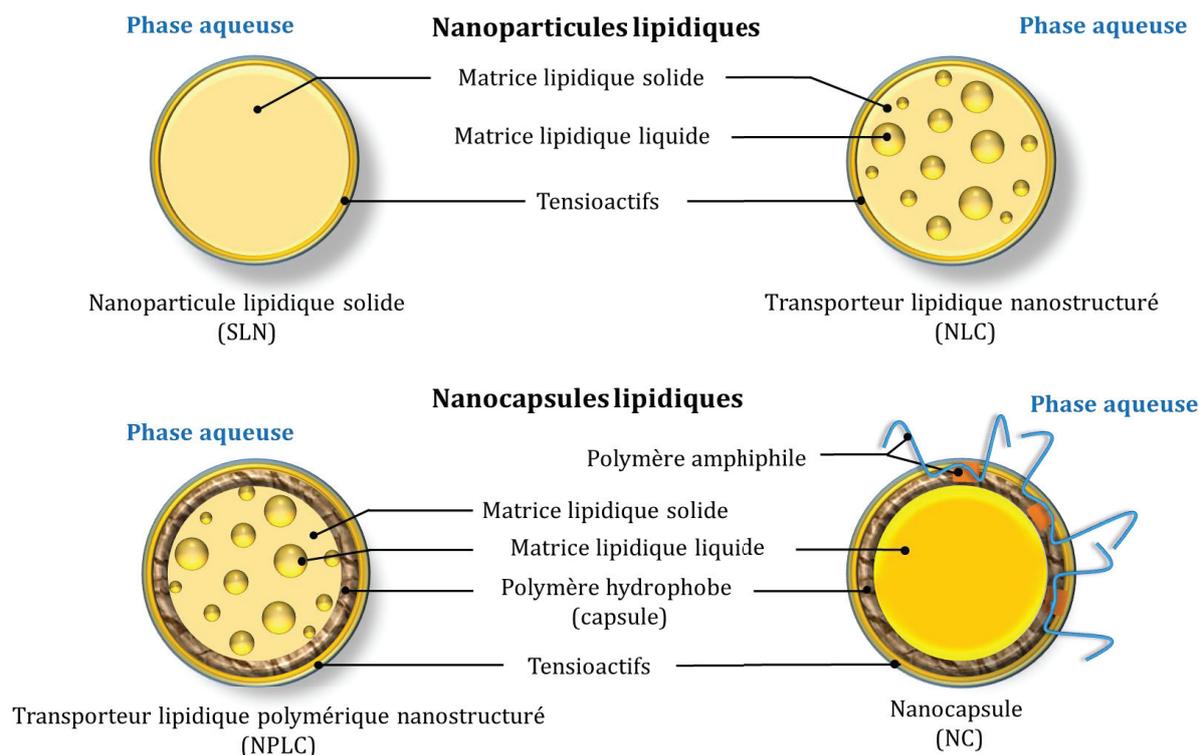


Figure 35 : Représentation schématique d'un SLN d'un NLC, d'un NPLC et d'une NC.

c) Etude des fractions de benzophénone-3 libres et encapsulées dans les différentes suspensions de nanoparticules et nanocapsules lipidiques :

La concentration totale en BP-3 dans les différentes suspensions a été déterminée en diluant les suspensions dans du méthanol en proportions 1 : 100 (m/m). Les dilutions ainsi obtenues ont été analysées par chromatographie liquide haute performance (CLHP) et la concentration en BP-3 a été déterminée. La méthode de dosage de la BP-3 est décrite dans le paragraphe suivant.

Les molécules lipophiles, comme la BP-3, ont tendance à former des cristaux qui précipitent lorsqu'elles sont sous forme libre dans une suspension aqueuse [190]. Ces cristaux correspondent à l'agglomération des molécules lipophiles entre elles et ils peuvent donc être de taille importante (i.e. > 1 µm). Chacune des formulations étudiées a été observée au microscope optique. Pour cela, une goutte de chacune des formulations étudiées a été placée sur une lame standard de microscopie optique avant d'être observée sous l'objectif X 10. Les cristaux de BP-3 qui ont pu être observés montraient une taille supérieure à 2 µm. La concentration en BP-3 contenue dans les nanoparticules et nanocapsules lipidiques a été déterminée selon le protocole suivant : chaque suspension a été diluée dans de l'eau déminéralisée en proportions 1 : 10 (m/m). La dilution de la suspension de SLN a été filtrée à travers une membrane en nitrocellulose dont le diamètre des pores est de 1,2 µm compte tenu de la taille plus importante des SLN par rapport aux autres nanoparticules

lipidiques étudiées. Les dilutions des suspensions de NLC, NPLC et NC ont été filtrées à travers une membrane en poly(fluorure de vinylidène) (PVDF) dont les pores ont un diamètre de 0,45 µm. Les filtrats obtenus ont directement été dilués dans du méthanol en proportions 1 : 100 (m/m) avant d'être analysés en CLHP.

La concentration en BP-3 non contenue dans les nanoparticules et nanocapsules lipidiques a été déterminée en extrayant la BP-3 contenue dans les membranes de filtration. Pour cela, les membranes ont été plongées dans 18 g de méthanol et laissées sous agitation magnétique toute la nuit de manière à ce que toute la BP-3 en soit extraite. Les solutions ont ensuite été diluées dans du méthanol en proportions 1 : 100 (m/m) avant d'être analysées par CLHP. Tous les résultats obtenus correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 3 mesures expérimentales.

d) Etude de l'absorption percutanée de la BP-3 à travers la peau porcine:

L'absorption percutanée de la BP-3 a été étudiée *ex vivo* sur de la peau d'oreille porcine selon le protocole décrit par l'OCDE [129].

Les oreilles porcines ont été décongelées à température ambiante vingt minutes avant l'expérience. Les oreilles ont été tondues avant d'être lavées et séchées avec du papier absorbant. La peau porcine a été dermatomée sur une épaisseur de 600 µm avant d'être montée sur cellule de Franz entre les compartiments donneur et receveur. L'intégrité de la peau a été vérifiée en mesurant la perte insensible en eau (PIE) au tewameter. Les morceaux de peau dont la PIE était supérieure à 14 g.m⁻².h⁻¹ ont été écartés de l'étude.

Le compartiment donneur des cellules de Franz a été rempli avec 1 mL de chaque formulation testée afin d'avoir une dose infinie de BP-3. La surface de diffusion était de 0,78 ± 0,10 cm². Durant l'étude d'absorption percutanée, les cellules de Franz ont été placées dans un bain thermostaté à 37°C afin de maintenir une température de 32°C à la surface de la peau.

Les milieux receveurs étaient constitués par une solution d'albumine à 2 % (m / V) dans du PBS afin de garantir la solubilité de la BP-3. Les cellules de Franz ont été placées sous agitation magnétique pendant toute la durée de l'étude. Toutes les heures durant les six premières heures puis à 22, 23 et 24 heures, un échantillon de 500 µL de milieu receveur a été prélevé et immédiatement remplacé par le même volume de milieu receveur frais.

La distribution de la BP-3 au sein des différentes couches cutanées a été étudiée 24 heures après le début de l'étude de perméation cutanée. Les échantillons de peau ont été retirés des cellules de Franz. La surface des échantillons de peau a été soigneusement lavée avec du papier absorbant humidifié dans de l'eau déminéralisée. Le SC a été entièrement retiré en appliquant vingt morceaux d'adhésifs (dimensions 5,1 × 1,9 cm) successifs à la surface des échantillons de peau. Les morceaux d'adhésifs ont ensuite été placés dans un mélange de méthanol et d'eau déminéralisée (90 : 10, V/V) pendant 24 heures afin d'extraire la totalité de la BP-3. L'épiderme et le derme des échantillons ont ensuite été séparés mécaniquement

avec un scalpel avant d'être pesés et broyés au bead beater dans un mélange de méthanol et d'eau déminéralisée (90 : 10, V/V).

Les échantillons prélevés dans les compartiments receveurs des cellules de Franz ont été dilués dans un mélange de méthanol et d'eau déminéralisée (90 : 10, V/V) avant d'être centrifugés pendant 20 minutes à 6000 g et filtrés à travers une membrane en PVDF dont le diamètre des pores est de 0,45 µm. Les résultats obtenus correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de la moyenne de 9 (pour les suspensions de SLN et de NLC), de 8 (pour les suspensions de NPLC et de NC) et de 6 (pour la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine) mesures expérimentales.

En considérant que le transport des molécules à travers le SC suit habituellement une diffusion Fickienne à travers une membrane homogène et étant donné que (i) la BP-3 est appliquée sur la peau en dose infinie avec une concentration constante dans le véhicule, (ii) que le SC ne contient pas de BP-3 avant le début de l'étude et que (iii) l'épiderme vivant respecte les conditions sink vis-à-vis de la BP-3, l'absorption percutanée de la BP-3 à travers la peau a été modélisée en intégrant les résultats expérimentaux de quantités cumulées de BP-3 dans le milieu receveur au cours du temps dans la solution mathématique de la seconde loi de Fick (Equation 14).

$$Q_t = Cd \cdot (KL) \left[\frac{D}{L^2} \cdot t - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \cdot \exp\left(-\frac{D}{L^2} \cdot n^2 \cdot \pi^2 \cdot t\right) \right] \quad (\text{Eq. 14})$$

Avec:

Q_t : quantités cumulées de BP-3 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) dans le milieu receveur

Cd : concentration en BP-3 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) appliquée dans le compartiment donneur

L : épaisseur de la peau (m)

t : temps (h)

K : coefficient de partition entre la peau et le véhicule

D : coefficient de diffusion ($\text{cm}^2\cdot\text{h}^{-1}$).

Les coefficients de corrélation (R^2) déterminés en appliquant l'équation 14 aux données expérimentales de perméation sont tous supérieurs ou égaux à 0,99. Les paramètres (D/L^2) et (KL) ont donc été déterminés ce qui a permis de calculer le coefficient de perméabilité (Kp) de la BP-3 à l'équilibre selon l'équation 15.

$$Kp = \frac{D}{L^2} \cdot KL \quad (\text{Eq. 15})$$

Le flux de BP-3 à l'équilibre a été déterminé selon l'équation 16.

$$\text{Flux (Jss)} = K_p \cdot C_d \quad (\text{Eq. 16})$$

La masse de SC (en g) retirée par tape stripping a été déterminée en prenant en compte l'épaisseur (x en cm) de SC attachée sur la surface (A) de chaque tape en considérant que la densité du SC (ρ) est d'environ $1\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ [191] en utilisant l'équation 17.

$$m (\text{g}) = x \cdot A \times \rho \quad (\text{Eq. 17})$$

En considérant que l'épaisseur du SC (x en cm) est proche de $10 \mu\text{m}$ [192].

e) Dosage de la BP-3 par chromatographie liquide haute performance (CLHP):

La concentration en BP-3 des échantillons a été dosée par CLHP. Les conditions chromatographiques sont détaillées dans le Tableau 18. Les gammes d'étalonnage comprennent des concentrations en BP-3 comprises entre $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $5,55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $6,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et entre $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivement pour les échantillons du milieu receveur, du *stratum corneum*, et de l'épiderme et du derme. Toutes les concentrations en BP-3 dosées entraînent dans ces gammes d'étalonnage. Le taux de recouvrement est de 90 à 110 %. Les équations de calibration sont $[y = 104,18 x - 0,894]$, $[y = 16,268 x - 0,0759]$ and $[y = 17,45 x - 6,32]$ respectivement pour les échantillons du milieu receveur, du *stratum corneum*, et de l'épiderme et du derme. Les limites de détection (LDD) sont de $0,07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $0,90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et les limites de quantification (LDQ) sont de $0,21 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0,03 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $2,71 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivement pour les échantillons du milieu receveur, du *stratum corneum*, et de l'épiderme et du derme. La méthode CLHP utilisée est répétable et reproductible.

Tableau 18 : Conditions chromatographiques pour la détermination des concentrations en BP-3 dans le milieu receveur, dans le *stratum corneum* (SC), dans l'épiderme (E) et le derme (D).

	Milieu receveur	<i>Stratum corneum</i>	Epiderme, Derme
Pré-colonne	C18, 4,6 × 2.5 mm, 5 µm	C18, 4,6 × 2.5 mm, 5 µm	C18, 4,6 × 2.5 mm, 5 µm
Colonne	C18 Hypersil Gold 150 mm × 4,6 mm, 5 µm	C18 Hypersil Gold 150 mm × 4,6 mm, 5 µm	C18 Hypersil Gold 150 mm × 4,6 mm, 5 µm
Phase mobile	Methanol : Eau (80 : 20) (V : V)	Methanol : Eau (70 : 30) (V : V)	Methanol : Eau (80 : 20) (V : V)
Débit	0,8 mL.min ⁻¹	0,8 mL.min ⁻¹	0,8 mL.min ⁻¹
Detection	287 nm	287 nm	287 nm
Volume d'injection (µL)	60	10	10
Temps de rétention (minute)	4,8	8,2	4,9

f) Evaluation du FPS, du FPUVA et de la λ_c des différentes formulations étudiées:

Le pouvoir filtrant dans le domaine UV des formulations a été caractérisé en mesurant la transmittance UV à travers une plaque en polyméthacrylate de méthyle (PMAM) recouverte de la formulation à caractériser.

Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre comprenant une sphère d'intégration : le Labsphere® UV 2000 S. Les plaques de PMAM dont les dimensions sont de 5 x 5 x 0,3 cm ont été recouvertes de formulation, appliquée en multiple gouttelettes, en respectant une quantité pesée de 1,3 mg.cm⁻². La formulation a ensuite été étalée sur la plaque PMAM en un film uniforme. Les plaques ont ensuite été stockées à l'obscurité pendant au minimum 15 minutes avant mesure.

La transmittance UV à travers les plaques de PMAM a été mesurée entre 290 et 400 nm selon un intervalle de mesure de 1 nm. Une plaque PMAM recouverte de glycérine a été utilisée comme blanc afin de calibrer le spectrophotomètre.

Pour chaque formulation testée, 3 plaques de PMAM ont été préparées et la transmittance UV à travers ces plaques a été mesurée sur six localisations différentes. Le FPS des formulations testées est calculé selon l'équation (18). Le FPUVA ainsi que la λ_c des formulations ont été déterminés respectivement selon les équations (19) et (20). Les valeurs de FPS et de λ_c correspondent à la moyenne, plus ou moins l'écart-type, de 18 mesures expérimentales tandis que les valeurs de FPUVA correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type, de 6 mesures expérimentales.

$$\text{FPS} = \frac{\int_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} d_{\lambda}}{\int_{290}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} d_{\lambda}} \quad (\text{Eq. 18}) \quad \text{FPUVA} = \frac{\int_{320}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} d_{\lambda}}{\int_{320}^{400} E_{\lambda} S_{\lambda} T_{\lambda} d_{\lambda}} \quad (\text{Eq. 19})$$

Avec :

E_{λ} : spectre d'action érythémale de la longueur d'onde λ donné par la commission internationale de l'éclairage

S_{λ} : irradiance spectrale de la longueur d'onde λ

T_{λ} : transmittance spectrale de la longueur d'onde λ

d_{λ} : domaine d'intégration

$$\int_{290}^{\lambda c} \lg \left[\frac{1}{T(\lambda)} \right] d\lambda = 0,9 \times \int_{290}^{400} \lg \left[\frac{1}{T(\lambda)} \right] d\lambda \quad (\text{Eq. 20})$$

Avec :

T_{λ} : transmittance spectrale de la longueur d'onde λ

d_{λ} : domaine d'intégration

g) Analyse statistique des résultats:

Les résultats obtenus expérimentalement ont été analysés en utilisant les logiciels Excel® et Kaleidagraph®. Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney a été utilisé pour mettre en évidence les différences significatives entre les différentes données obtenues expérimentalement avec une probabilité $\leq 0,05$ fixée comme seuil significatif.

2- Résultats et discussion:

Le *Z-Ave* des nanoparticules et des nanocapsules lipidiques, leur potentiel ζ ainsi que le *Pdl* des suspensions sont présentés dans le Tableau 19. Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques montrent un *Z-Ave* inférieur à 1 μm dans un intervalle compris entre 175 nm et 403 nm. Le *Z-Ave* des SLN est plus important que celui des autres nanostructures lipidiques suivi par celui des NLC, des NPLC et enfin des NC. Le *Pdl* des différentes suspensions se situe entre 0,07 et 0,7 ce qui indique une polydispersion. Les SLN, qui sont les plus grosses particules lipidiques, ont un cœur lipidique purement solide contrairement aux autres suspensions dont le cœur des nanoparticules lipidiques comprend un mélange de lipides solides et liquides. La diminution de la viscosité de la matrice lipidique en y intégrant des lipides liquides pourrait être à l'origine de la diminution de la taille des particules en suspension. En effet, la composition de la matrice lipidique semble influencer la taille des

nanoparticules lipidiques. En diminuant la viscosité du cœur lipidique, les nanoparticules lipidiques peuvent être dispersées plus facilement dans la phase aqueuse [193].

Les NPLC et les NC dont la matrice lipidique comprend un polymère hydrophobe montrent les plus petits *Z-Ave*. Les NC sont dispersées dans un gel de poloxamer qui est un polymère amphiphile comprenant un bloc lipophile d'oxyde de polypropylène (OPP) qui peut s'attacher sur la capsule lipophile des NC et de chaînes hydrophiles d'oxyde de polyéthylène (OPE) qui vont préférentiellement se tourner vers la phase dispersante aqueuse de la suspension (Figure 36). Le gel de poloxamer constituant la phase aqueuse des NC semble diminuer le *Z-Ave* des capsules en suspension. En effet, le *Z-Ave* des NC est inférieur à celui des NPLC qui ne sont pas dispersés dans un gel de poloxamer.

Toutes les nanoparticules et nanocapsules lipidiques ont un potentiel ζ négatif. La valeur du potentiel ζ influence la stabilité physique des particules en suspension. Plus sa valeur est élevée (en valeur absolue) et plus les particules seront moins susceptibles de s'agréger entre elles. Certaines études montrent qu'un potentiel ζ supérieur ou égal à $|20 \text{ mV}|$ permet d'éviter aux particules de s'agréger entre elles [163]. Le potentiel ζ des SLN, NLC et NPLC est supérieur à $|40 \text{ mV}|$ tandis que celui des NC est de $|25 \text{ mV}|$. Une étude a montré que les polymères tels que les poloxamers avaient tendance à réduire la valeur du potentiel ζ des particules en suspension [194]. Cependant, la présence de ce polymère entraîne un encombrement stérique autour des particules ce qui permet de prévenir leur agrégation. Toutes les suspensions montrent donc un potentiel de stabilité satisfaisant.

Tableau 19 : *Z-Ave*, *Pdl* et potentiel ζ des suspensions de SLN, NLC, NPLC et NC.

Suspensions	<i>Z-Ave</i> (nm)	<i>Pdl</i>	Potentiel ζ (mV)
SLN	412 ± 15 ^{*\$#}	0,242 ± 0,16 ^{*\$#}	- 40,2 ± 3,6 ^{*\$#}
NLC	315 ± 12 ^{‡\$#}	0,362 ± 0,06 ^{‡\$#}	- 43,2 ± 2,0 ^{‡#}
NPLC	242 ± 5 ^{‡*#}	0,265 ± 0,02 ^{‡*#}	- 43,6 ± 1,4 ^{‡#}
NC	175 ± 23 ^{‡*\$}	0,091 ± 0,03 ^{‡*\$}	- 26,0 ± 2,8 ^{‡*\$}

Les valeurs de *Z-Ave* et de *Pdl* correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 30 mesures expérimentales. Les valeurs de potentiel ζ correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 23 et 30 mesures expérimentales respectivement pour la suspension de SLN et pour les suspensions de NLC, NPLC et NC.

[‡] Significativement différent de la suspension de SLN ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

^{*} Significativement différent de la suspension de NLC ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

[§] Significativement différent de la suspension de NPLC ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

[#] Significativement différent de la suspension de NC ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

Les taux d'encapsulation de la BP-3 dans les quatre types de nanoparticules et nanocapsules lipidiques sont présentés dans le Tableau 20. Les taux de recouvrement de la concentration en BP-3 totale formulée dans les différentes formulations sont compris entre 97 et 101 %. L'écart entre la concentration théorique en BP-3 et celle réellement mesurée n'excède pas le seuil limite de 5 %. Les SLN et NLC montrent significativement les taux les plus bas de BP-3

encapsulée (respectivement 32,8 et 33 %) par rapport aux NPLC et aux NC (respectivement 56,3 et 35,1 %). Les NPLC semblent donc être significativement les plus performants pour encapsuler la BP-3 au sein de leur matrice lipidique comparées aux SLN, aux NLC et aux NC. Le faible taux de BP-3 encapsulée dans les NC peut être expliqué par leur petit Z-Ave (i.e. $175 \pm 0,1$ nm) comparée à celui des autres particules lipidiques. Contrairement à ce qui pouvait être supposé, la présence d'acide oléique (lipide liquide) dispersé dans la matrice lipidique solide des NLC ne permet pas d'augmenter le taux de BP-3 encapsulée. La BP-3 montre donc une faible affinité pour la matrice lipidique des SLN, des NLC et des NC.

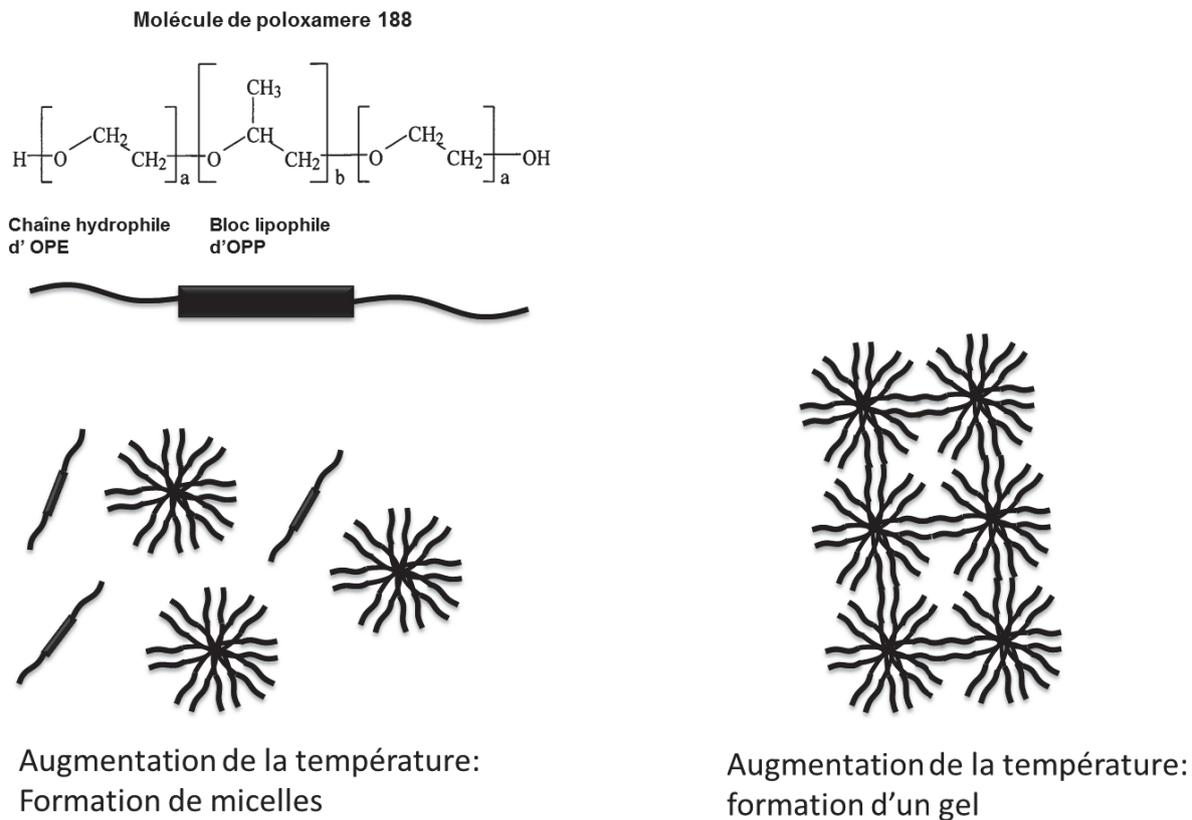


Figure 36 : Représentation schématique du processus de gélification du Poloxamer 188. Le poloxamer 188 est un copolymère d'oxyde de polypropylène (OPP) formant un bloc central lipophile (b) et d'oxyde de polyéthylène (OPE) formant des chaînes hydrophiles (a). Le bloc central d'OPP est d'environ 1800 g.mol^{-1} tandis que les chaînes d'OPE représentent environ 80 % de la masse moléculaire totale du polymère. En augmentant la température, les molécules de poloxamer s'assemblent en micelles ce qui entraîne la formation d'un gel.

Tableau 20 : Efficacité d'encapsulation des SLN, NLC, NPLC et NC.

Suspensions	Concentration théorique en BP-3 (%)	Concentration réelle en BP-3 (%)	Concentration en BP-3 encapsulée (%)
SLN	5	5,03 ± 0,02	32,8 ± 2,15 ^{#£}
NLC	5	4,83 ± 0,15	33,0 ± 1,97 ^{#£}
NPLC	5	4,93 ± 0,21	56,3 ± 2,18 ^{#§£}
NC	5	4,95 ± 0,02	35,2 ± 0,32 ^{#§¤}

Les valeurs correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de 6 mesures expérimentales.

[#] Significativement différent de la suspension de SLN ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

[§] Significativement différent de la suspension de NLC ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

[¤] Significativement différent de la suspension de NPLC ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

[£] Significativement différent de la suspension de NC ($p < 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

Concernant les résultats de l'étude de perméation de la BP-3 *ex vivo*, la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine, représentant la formulation témoin de cette étude, montre le flux de BP-3 à travers la peau le plus important (Figure 37). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la BP-3, qui est en solution aqueuse, va préférentiellement passer du véhicule au SC de par son bas poids moléculaire et son log ($K_{Oct/Eau}$) caractéristique d'une molécule lipophile (Tableau 12). Les flux de BP-3 obtenus lorsqu'elle est formulée dans les SLN et dans les NLC ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus lorsqu'elle est formulée dans la solution aqueuse d'albumine. Ceci pourrait montrer que ni les SLN ni les NLC ne favorisent le passage transcutané de la BP-3 mais que la BP-3 non encapsulée dans la matrice lipidique des nanoparticules va pénétrer la peau [195]. Le flux de BP-3 à travers la peau est significativement plus bas lorsqu'elle est formulée dans les NPLC et les NC comparé à celui obtenu avec la solution aqueuse d'albumine, les SLN et les NLC. Les NPLC montrent le taux d'encapsulation de la BP-3 le plus élevé et le flux de BP-3 à travers la peau le plus faible. La présence de PCL dans la matrice lipidique des NPLC semble agir en retenant la BP-3 à l'intérieur de la nanostructure. Les NC montrent un faible taux d'encapsulation de la BP-3 mais également un faible flux de BP-3 à travers la peau. Le gel de poloxamer constituant la phase dispersante aqueuse des NC pourrait solubiliser la BP-3 non encapsulée de par ses propriétés amphiphiles (Figure 36). Ceci pourrait augmenter l'affinité de la BP-3 libre dans la phase dispersante des NC pour la suspension et donc limiter sa pénétration cutanée. De plus, la présence de poloxamer dans la phase dispersante aqueuse de la suspension de NC contribue à augmenter sa viscosité. Or, une étude a révélé que la viscosité du véhicule influence la perméation de la BP-3 à travers la peau en réduisant sa pénétration lorsque la formulation est appliquée en dose infinie comme cela est fait dans cette étude [196]. Une étude réalisée au laboratoire tend également à montrer que le poloxamer 188 a tendance à

déshydrater la peau ce qui peut contribuer à diminuer la pénétration cutanée de la BP-3 (données non publiées). Une autre étude a révélé que les nanoparticules lipidiques polymériques exercent un effet cutané local en favorisant la rétention des PA qu'elles vectorisent au niveau des couches cutanées superficielles (i.e. SC) et ne permettent donc pas de favoriser la perméation cutanée des PA contrairement aux nanoparticules lipidiques non polymériques (i.e. SLN et NLC) [157].

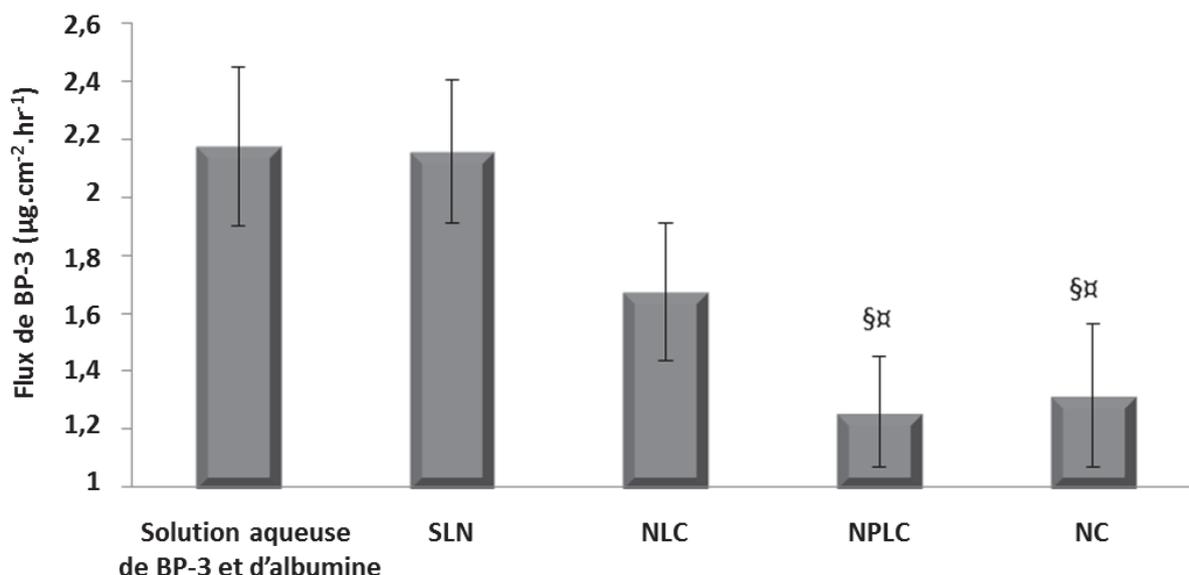


Figure 37: Evolution du flux de benzophénone-3 à travers la peau porcine en fonction de son véhicule.

Les valeurs de flux correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de la moyenne de 6 (pour la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine), 9 (pour les SLN), 11 (pour les NLC), 8 (pour les NPLC) et 7 (pour les NC) mesures expérimentales.

§ Significativement différent de la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine et de BP-3 ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

α Significativement différent des suspensions de SLN et de NLC ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

L'affinité des molécules pour leur véhicule est un paramètre important qui influence la pénétration cutanée des molécules. A partir des résultats de distribution de la BP-3 au sein des différentes couches cutanées (Figure 38), les coefficients de partage (K) de la BP-3 entre le SC et le véhicule ($K_{SC/veh}$) ainsi qu'entre l'épiderme et le SC ($K_{E/SC}$) ont pu être calculés (Figure 39). Les paramètres d'absorption cutanée de la BP-3 formulée (KL et D/L^2) dans les différents véhicules étudiés ont été calculés en intégrant les données de perméation obtenues expérimentalement dans la solution mathématique de la seconde loi de Fick (Eq. 14) (Tableau 21). Les paramètres de perméation de la BP-3 calculés à partir de l'Eq. 14 sont bien corrélés aux coefficients de partage qui ont été calculés à partir des données obtenues expérimentalement (Figure 39). En effet les coefficients de partage (K) de la BP-3

entre le véhicule et la peau montrent la même tendance que les coefficients de partage de la BP-3 entre le SC et le véhicule ($K_{SC/veh}$) obtenus expérimentalement ce qui confirme que le SC est la principale barrière cutanée face à la pénétration de la BP-3. En parallèle, les valeurs de diffusion de la BP-3 (D/L^2) sont corrélées avec les coefficients de partage de la BP-3 entre l'épiderme et le SC ($K_{E/SC}$) obtenus expérimentalement. Le coefficient de partage de la BP-3 entre le SC et la suspension de SLN ne diffère pas significativement de celui obtenu entre le SC et la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine. La BP-3 semble montrer une affinité plus importante pour les suspensions de NLC, NPLC et NC. Cependant, une fois que la BP-3 a traversé le SC, elle montre une forte tendance à pénétrer l'épiderme vivant. Comparée aux suspensions de NPLC et de NC, la suspension de NLC ne permet pas de limiter le passage de la BP-3 du SC vers l'épiderme vivant. En effet, le coefficient de partage de la BP-3 entre l'épiderme et le SC ($K_{E/SC}$) lorsqu'elle est formulée dans la suspension de NLC est le plus élevé de tous. En 2011, une étude réalisée par Marcato *et al.* a également montré que les SLN étaient moins efficaces que les nanoparticules polymériques, comportant une un polymère hydrophobe, pour limiter la pénétration cutanée de la BP-3 [181]. Les suspensions de NPLC et de NC semblent être les plus efficaces pour limiter la perméation cutanée de la BP-3 comparées aux autres formulations étudiées.

Les résultats concernant l'étude du pouvoir photo-protecteur dans le domaine UV des différentes formulations sont présentés sur la Figure 40. La suspension de NC montre significativement le plus haut FPS ($12,2 \pm 1,5$) suivie par la suspension de NPLC ($9,6 \pm 1$), la suspension de NLC ($8,7 \pm 0,6$), la suspension de SLN ($5,5 \pm 0,5$) et enfin la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine (3 ± 0). Le FPS reflète le pouvoir photo-protecteur d'une formulation au niveau du domaine UVB. La suspension de NC montre également de manière significative le plus haut FPUVA ($5,44 \pm 0,35$) suivie par la suspension de NPLC ($4,67 \pm 0,21$), la suspension de NLC ($4,59 \pm 0,03$), la suspension de SLN ($3,64 \pm 0,05$) et enfin la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine ($2,72 \pm 0,08$). La λ_c d'une formulation correspond à la longueur d'onde en dessous de laquelle la formulation exerce 90 % de son efficacité filtrante dans les domaines UVB et UVA. Les λ_c des SLN, NLC, NPLC et NC ne diffèrent pas significativement entre elles. La solution aqueuse de BP-3 et d'albumine montre significativement la plus haute λ_c . Ceci s'explique par l'allure plate du spectre d'absorption dans le domaine UV de la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine. Cette solution filtre peu au niveau des domaines UVB et UVA et montre des valeurs de FPS et de FPUVA très proches l'une de l'autre. Les quatre types de nanoparticules et nanocapsules lipidiques peuvent agir à la fois comme des filtres UV inorganiques, de par leur structure physique qui peut refléter une partie du rayonnement UV, et des filtres UV organiques en absorbant une autre partie du rayonnement UV [186]. Ce sont les nanoparticules lipidiques polymériques (i.e. NPLC et NC) qui montrent la plus forte efficacité anti-UV. La suspension de NC montre un FPS ainsi qu'un FPUVA significativement plus élevés que ceux de la suspension de NPLC. Cette différence pourrait être due au gel de poloxamer constituant la phase dispersante aqueuse de la suspension de NC qui améliorerait les propriétés filmogènes de la suspension et donc qui faciliterait la formation d'un film homogène de suspension sur la plaque de PMAM à

l'étalement. En effet, l'uniformité du film formé par une formulation comportant des filtres UV peut influencer le FPS évalué. Les NPLC et les NC montrent les propriétés photo-protectrices les plus importantes tout en ayant les plus faibles coefficients de perméabilité de la BP-3 (Figure 41). Ce sont donc les structures lipidiques les plus intéressantes pour formuler un écran solaire avec de la BP-3.

Dans cette étude, le FPS des formulations a été étudié *in vitro* ce qui ne permet pas de prendre en compte l'influence de la pénétration cutanée de la BP-3 sur le FPS puisque les formulations sont étalées sur des plaques en PMAM. Cependant, il est communément admis que l'efficacité optimale des filtres UV est exercée lorsque ces molécules restent localisées au niveau des couches cutanées les plus superficielles. Il est donc probable que les suspensions de NPLC et de NC montrent de hauts FPS *in vivo*.

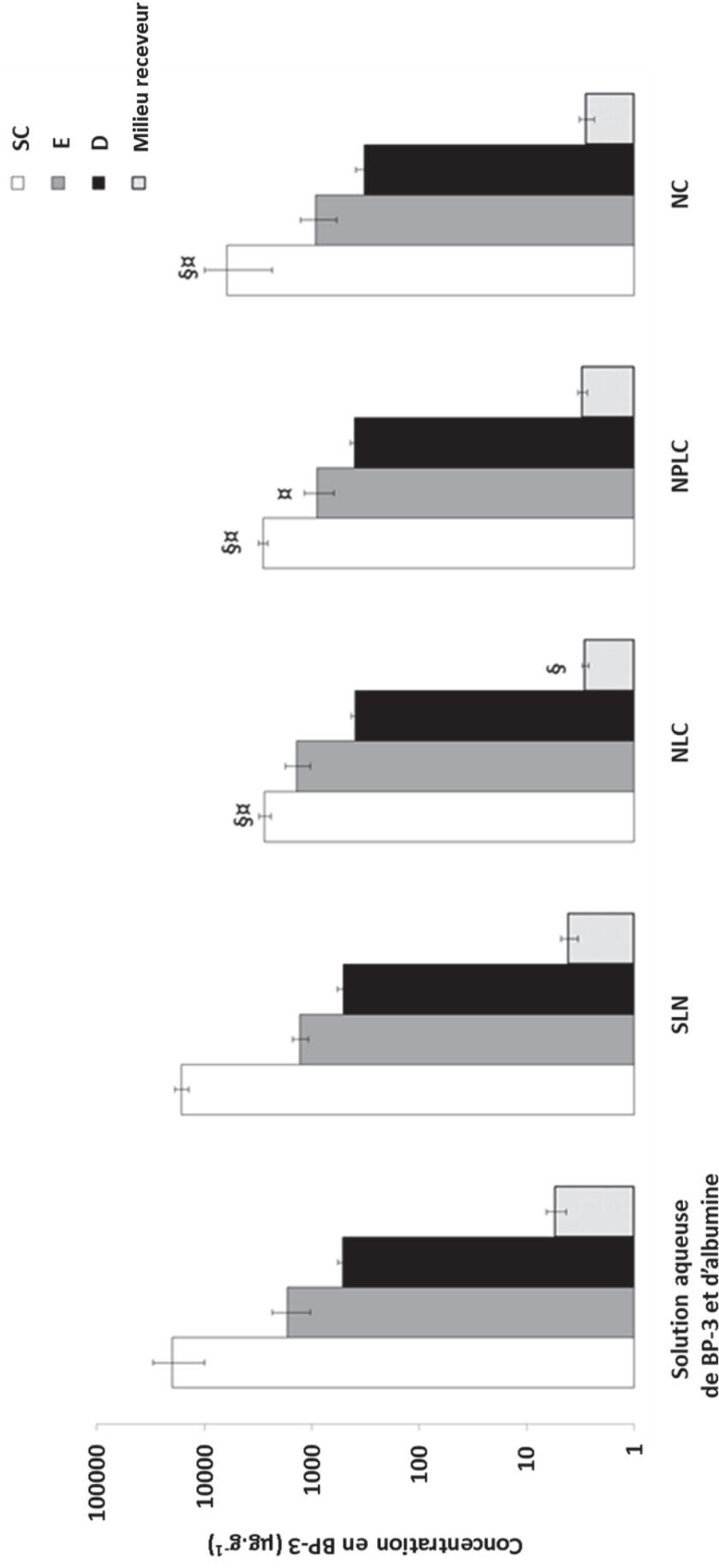


Figure 38 : Distribution de la BP-3 dans le *stratum corneum* (SC), l'épiderme (E), le derme (D) et le compartiment receveur (milieu receveur). Les valeurs correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de la moyenne de 6 (pour la solution aqueuse d'albumine et de BP-3, 9 (pour la suspension de SLN), 11 (pour la suspension de NLC), 8 (pour la suspension de NPLC) et 7 (pour la suspension de NC) mesures expérimentales.

§ Significantly different from BP-3 albumin aqueous solution ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

§ Significantly different from SLN suspensions ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

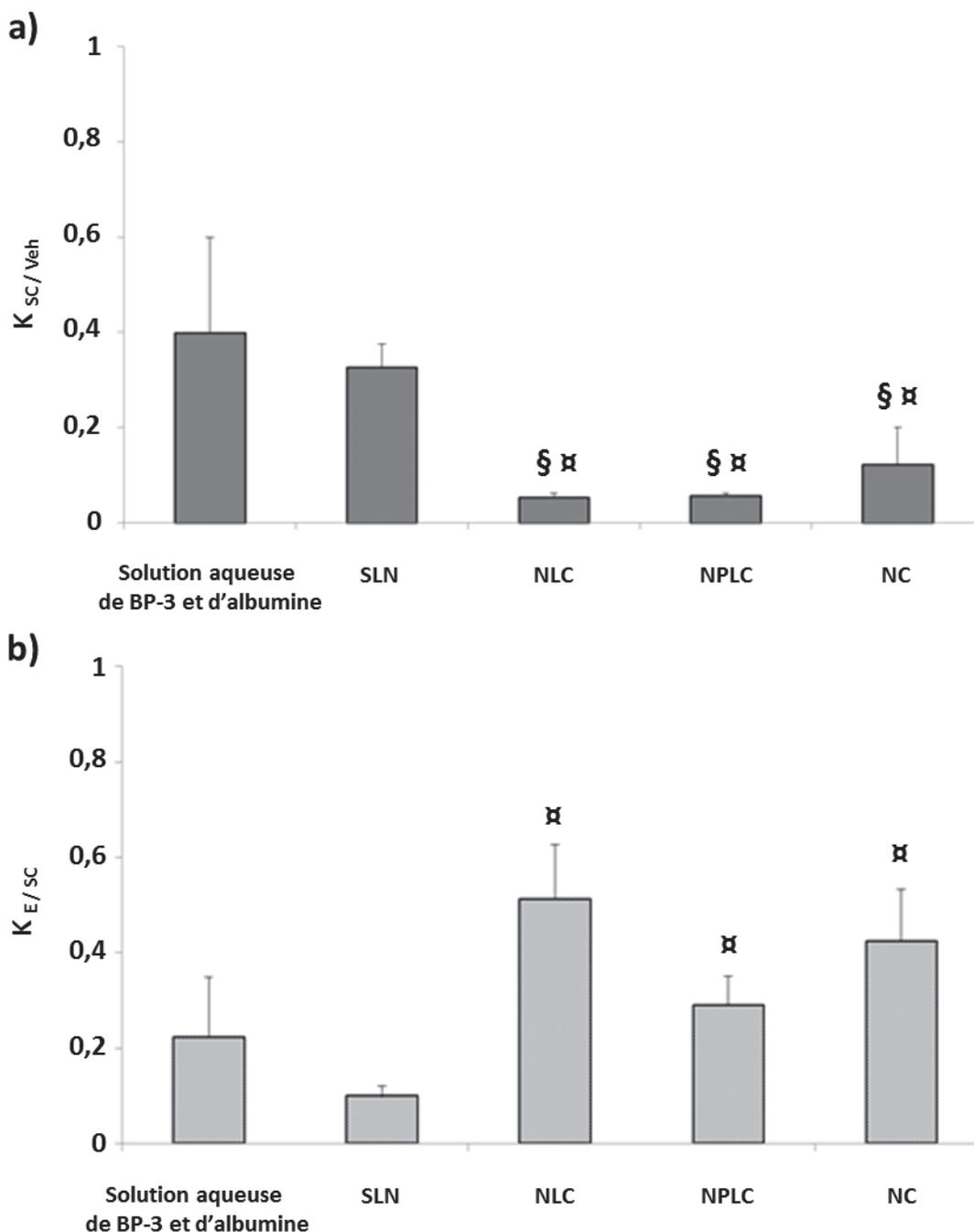


Figure 39: Coefficient de partage de la BP-3 entre le *stratum corneum* (SC) et les formulations ($K_{SC / veh}$) (a) et entre l'épiderme (E) et le SC ($K_{E / SC}$) (b). Les valeurs correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de la moyenne de six (pour la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine), neuf (pour la suspension de SLN), onze (pour la suspension de NLC), huit (pour la suspension de NPLC) et sept (pour la suspension de NC) mesures expérimentales.

¶ Significativement différent de la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

§ Significativement différent de la suspension de SLN ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

Tableau 21 : Paramètres d'absorption de la BP-3 à travers la peau porcine 24 h suivant l'application cutanée de quatre formulations en contenant.

Formulations	$10^2 \cdot KL$ (cm) [1]	$10^2 \cdot D/L^2$ (h ⁻¹) [2]	$10^5 \cdot Kp$ (cm.h ⁻¹) [3]
Solution aqueuse de BP-3 et d'albumine	0,07 ± 0,02	7,30 ± 1,2	4,3 ± 0,5
SLN	0,12 ± 0,08	5,30 ± 2,3	4,3 ± 0,5
NLC	0,06 ± 0,05 [§]	9,70 ± 6,7	3,3 ± 0,5
NPLC	0,05 ± 0,03 [§]	13,5 ± 3,9 [§]	2,5 ± 0,4 ^{¶§}
NC	0,03 ± 0,01 [§]	11,6 ± 2,3 [§]	2,6 ± 0,5 ^{¶§}

Ces paramètres ont été calculés en intégrant les données de perméation obtenues expérimentalement *ex vivo* à la solution mathématique de la seconde loi de Fick (Eq. 14). Les valeurs correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type de la moyenne de 6 (pour la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine), 9 (pour la suspension de SLN), 11 (pour la suspension de NLC), 8 (pour la suspension de NPLC) et 7 (pour la suspension de NC) mesures expérimentales.

[1]: K est le coefficient de partage de la molécule d'intérêt entre le véhicule et la peau.

[2]: Rapport entre le coefficient de diffusion (D) de la molécule d'intérêt et le chemin de diffusion (L) au carré.

[3]: $Kp = KL \cdot D/L^2$

[§] Significativement différent de la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

[¶] Significativement différent de la suspension de SLN ($p \leq 0,05$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

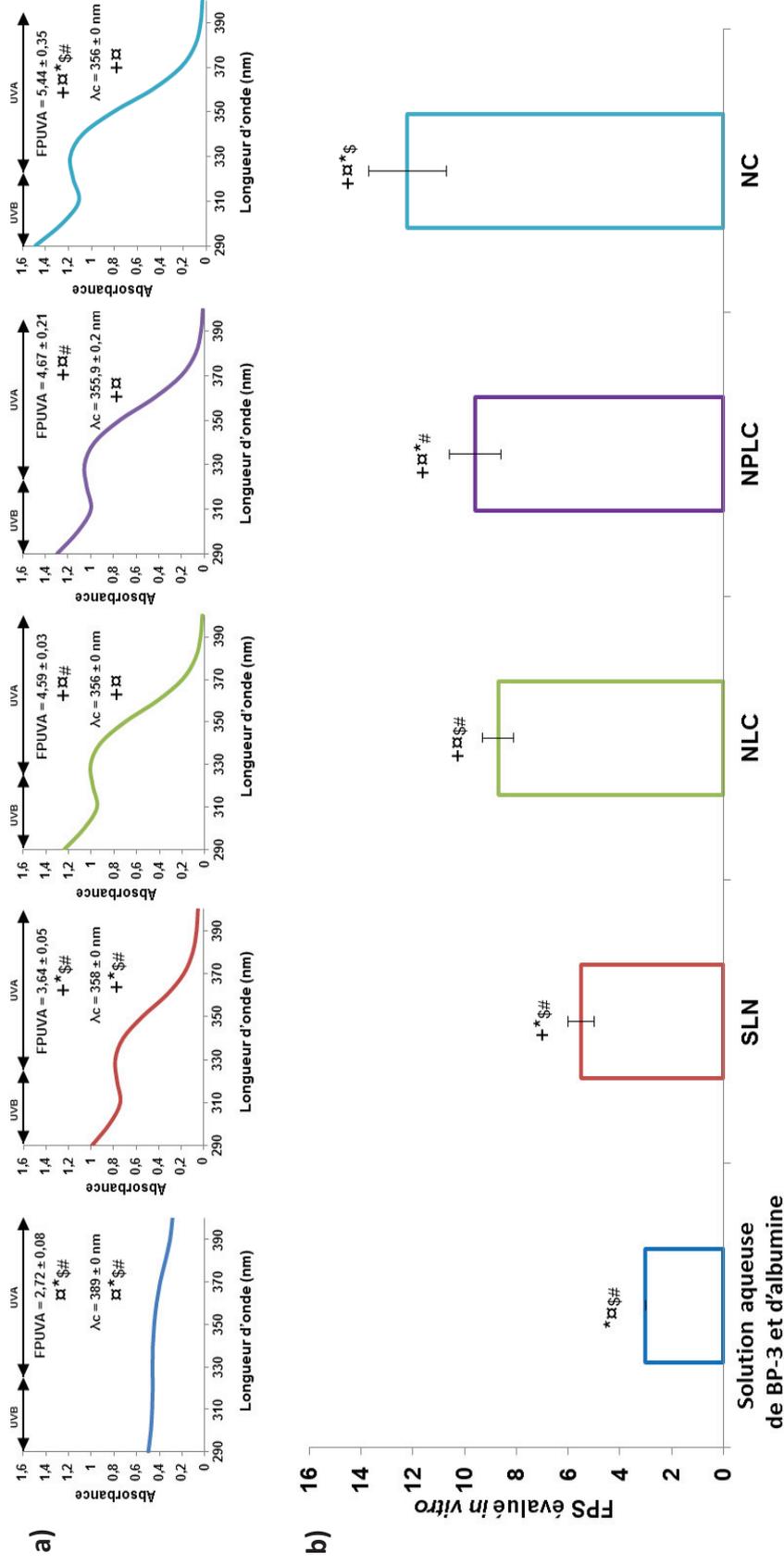


Figure 40: Spectres d'absorption dans le domaine UV, facteur de protection UVA (FPUVA), longueur d'onde critique (λ_c), (a) et facteur de protection solaire (FPS) (b) des suspensions de SLN, NLC, NPLC et NC.

Les valeurs de FPS et de λ_c correspondent à la moyenne plus ou moins l'écart-type 18 mesures expérimentales.

+ Significativement différent de la solution aqueuse de BP-3 et d'albumine ($p \leq 0,01$; Test de Wilcoxon Mann-Whitney)

× Significativement différent de la suspension de SLN ($p \leq 0,01$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

* Significativement différent de la suspension de NLC ($p \leq 0,01$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

§ Significativement différent de la suspension de NPLC ($p \leq 0,01$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

Significativement différent de la suspension de NC ($p \leq 0,01$; Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

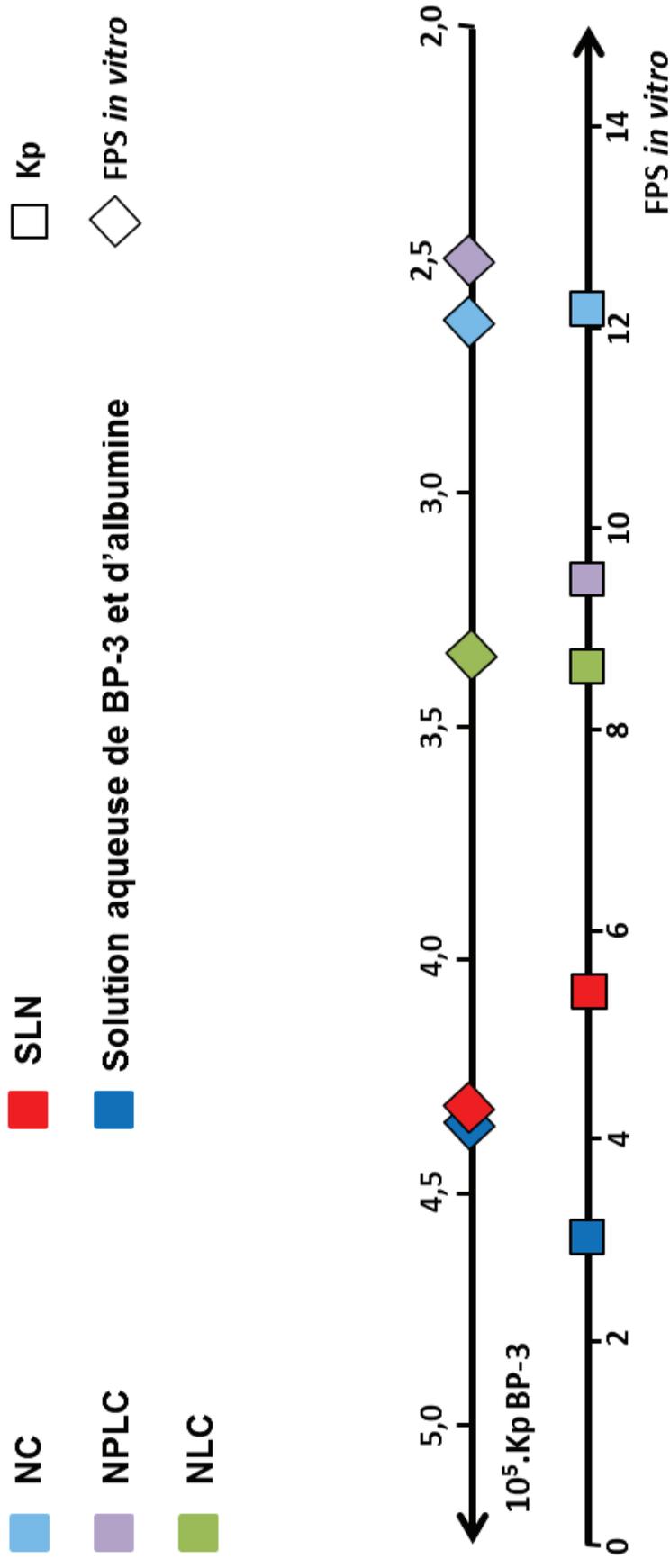


Figure 41: Classement des formulations étudiées en fonction de leur coefficient de perméabilité et de leur FPS.

B- Conclusion :

Les écrans solaires constituent le moyen de photo-protection le plus largement utilisé par les individus soucieux de protéger leur peau des effets délétères du rayonnement UV. Les filtres UV organiques, simples à formuler et esthétiquement agréables à utiliser, sont les filtres UV les plus couramment incorporés dans les écrans solaires bien que certains d'entre eux soient à l'origine d'effets indésirables parfois sérieux. En effet, plusieurs de ces molécules ont la capacité de pénétrer la peau. Il est donc nécessaire de trouver des formulations innovantes pour ces molécules permettant de les maintenir à la surface de la peau tout en les protégeant des phénomènes de photo-dégradation et en garantissant un effet photo-protecteur optimal pour l'utilisateur. La BP-3 est un des filtres UV organiques les plus controversé compte tenu du nombre de données publiées sur cette molécule concernant sa toxicité pour l'organisme. Cette étude montre que les suspensions de nanoparticules lipidiques polymériques de type NPLC et NC semblent être des véhicules intéressants pour formuler la BP-3. En effet, les suspensions de NPLC et de NC permettent de limiter la pénétration percutanée de la BP-3 tout en améliorant son pouvoir photo-protecteur dans le domaine UV. Les nanoparticules lipidiques polymériques pourraient être intéressantes pour formuler d'autres actifs. En effet, les actifs contenus dans les répulsifs anti-insectes doivent également rester à la surface de la peau afin d'exercer leur rôle répulsif de manière optimale. Il serait donc intéressant d'étudier la capacité des nanoparticules lipidiques polymériques à maintenir les actifs répulsifs à la surface de la peau et donc, à augmenter leur efficacité. Une méthode de dosage de l'IR3535[®], qui est un actif répulsif, a d'ailleurs été publiée en vue de futures études. Cette publication est présentée en Annexe 4.

Discussion générale

Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'intérêt des nanoparticules lipidiques polymériques (i.e. NPLC et NC) dans la formulation des filtres UV inorganiques et organiques. La PCL est un polymère hydrophobe largement utilisé dans le domaine pharmaceutique. En effet, la PCL est très étudiée pour développer des nano et microsphères polymériques pouvant véhiculer un large panel de PA dans l'organisme [202, 147, 203, 204].

La PCL est également étudiée dans le domaine de l'ingénierie tissulaire pour développer des biomatériaux pouvant être utilisés dans le domaine de la santé [205-210]. De nombreuses études montrent l'intérêt et la multiplicité d'application des matériaux composites constitués par l'association de polymères et de composés inorganiques [211-213].

Plusieurs associations PCL-composé inorganique sont décrites comme l'association PCL-hydroxyapatite [214], l'association PCL-argile [215], l'association PCL-silice [216] et l'association PCL-TiO₂ [217]. L'association PCL-TiO₂ est notamment étudiée pour développer des films polymériques à hauts indices de réfraction et des catalyseurs pouvant être intégrés dans les panneaux solaires.

Concernant l'étude réalisée dans le chapitre III, l'augmentation du pouvoir photo-protecteur du TiO₂ dans le domaine UV pourrait être due à son association avec la PCL. Les nanoparticules de TiO₂ incorporées dans les suspensions de NPLC présentent un enrobage inorganique d'Al₂O₃ permettant d'inhiber le potentiel photocatalytique des nanoparticules de TiO₂ et un enrobage organique constitué par de l'acide stéarique et de l'acide polyhydroxystéarique qui permet de disperser les nanoparticules de TiO₂ dans un mélange lipidique.

Des études suggèrent que le groupe carbonyle de la PCL formerait des interactions de Van der Waals avec les groupes alkyles des composés d'enrobage des nanoparticules de TiO₂ [167]. L'acide stéarique et l'acide polyhydroxystéarique qui enrobent les nanoparticules de TiO₂ pourraient être à l'origine de la présence de groupes alkyles à la surface des nanoparticules de TiO₂. L'interaction de la PCL avec les groupements alkyles des composés d'enrobage du TiO₂ permettrait une dispersion optimale des nanoparticules de TiO₂ dans la matrice polymérique constituée par la PCL en réduisant les phénomènes d'agrégaions entre les particules comme cela a déjà été montré [167].

Les nanoparticules de TiO₂ utilisées dans cette étude ont une taille de 15 nm tandis que leurs agrégats sont de 124 nm. Les nanoparticules de TiO₂ (i.e. < 100 nm) sont plus efficaces pour réfléchir le rayonnement UV que les particules de TiO₂ dont la taille est supérieure à 100 nm. L'interaction entre la PCL et les nanoparticules de TiO₂ permettrait d'inhiber la formation d'agrégaions de particules de TiO₂ ce qui pourraient conduire à une efficacité anti-UV optimale (Figure 42) [218, 219].

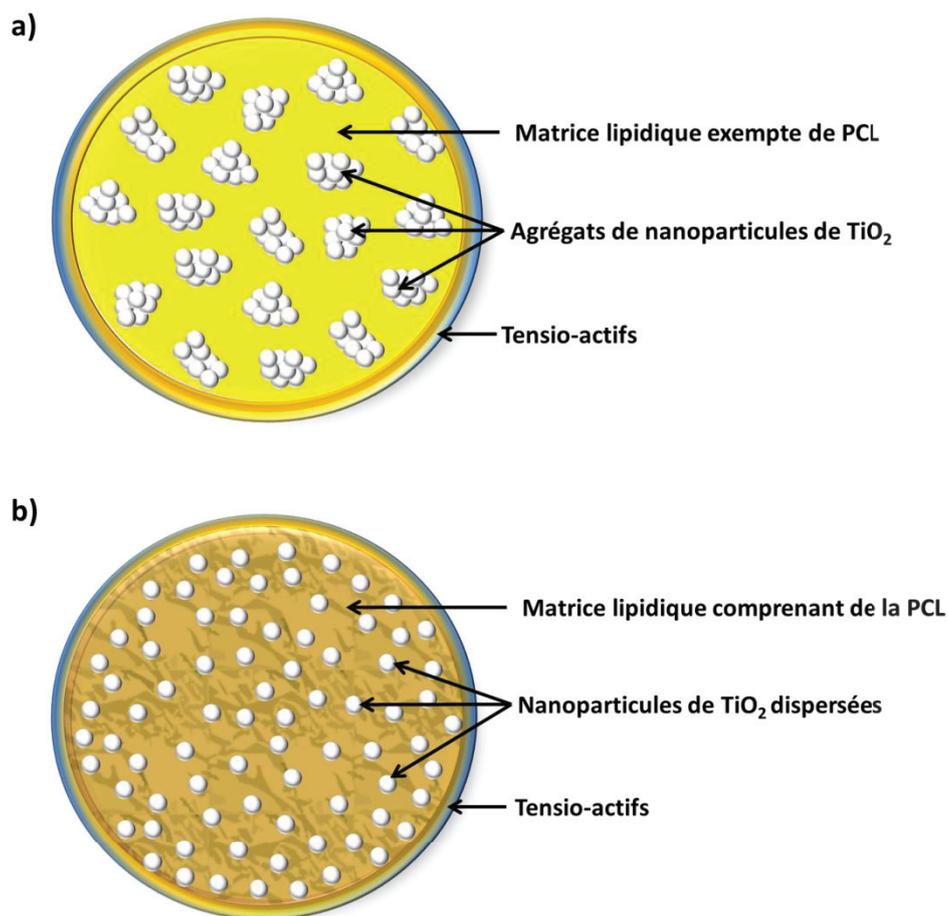


Figure 42 : Représentation schématique des agrégats de nanoparticules de TiO₂ dispersés dans une matrice lipidique exempte de PCL (a) et des nanoparticules de TiO₂ dispersées dans une matrice lipidique comprenant de la PCL (b).

En considérant la suspension de NPLC #11 formulée avec 11,71 % de nanoparticules de TiO₂, le Z-Ave des NPLC en suspension est de 137 nm. Les NPLC ont donc un volume de $1,35 \cdot 10^6 \text{ nm}^3$. Les nanoparticules de TiO₂ ont une taille de 15 nm et donc un volume de $1,77 \cdot 10^3 \text{ nm}^3$. En calculant le rapport entre le volume d'une NPLC et celui d'une nanoparticule de TiO₂, il peut être supposé que 761 nanoparticules de TiO₂ peuvent remplir une NPLC (Tableau 22). L'encapsulation des nanoparticules de TiO₂ dans les NPLC est donc envisageable.

Les particules de CeO₂ incorporées dans les suspensions de NPLC ont une taille supérieure à 200 nm et pas d'enrobage. Leur taille importante ainsi que le fait qu'elles n'aient pas d'enrobage ne permet pas la dispersion de ces particules dans la matrice de PCL. Le CeO₂ exercerait donc son effet anti-UV en dehors de la structure polymérique des NPLC.

Tableau 22 : Modélisation de l'encapsulation des nanoparticules de TiO₂ dans les NPLC de la suspension #11.

	NPLC (Suspension #11)	Nanoparticule de TiO ₂
Diamètre (nm)	137	15
Rayon (nm)	68,5	7,5
Volume (nm ³) [1]	1,35.10 ⁶ [2]	1,77.10 ³ [3]
Ratio [4]	761,88	

$$[1] = \frac{4\pi r^3}{3}$$

$$[4] = [2] / [3]$$

Des études complémentaires sont nécessaires afin de caractériser la possible interaction entre la PCL et les nanoparticules de TiO₂ qui pourrait être à l'origine de l'augmentation du pouvoir photo-protecteur dans le domaine UV des nanoparticules de TiO₂. En effet, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier pourrait permettre de caractériser la surface des nanoparticules de TiO₂ incorporées dans les NPLC. Cette technique pourrait également mettre en évidence les interactions entre la PCL et les nanoparticules de TiO₂. Des études de microscopie électronique à transmission (MET) et à balayage (MEB) permettraient de caractériser la morphologie des NPLC et de localiser les nanoparticules de TiO₂.

Concernant l'étude réalisée dans le chapitre IV, il serait intéressant de visualiser la morphologie des SLN, des NLC, des NPLC et des NC en MET et en MEB afin de mieux comprendre comment les NPLC et les NC retiennent plus efficacement la BP-3 à la surface de la peau. De plus, cette étude pourrait être réalisée de nouveau mais en exposant la surface cutanée en contact avec les formulations des compartiments donneurs des cellules de Franz au spectre de la lumière naturelle qui comprend les rayonnements UVB et UVA. En effet, la désorganisation de la fonction barrière cutanée par le rayonnement UV pourrait contribuer à augmenter la perméation cutanée de la BP-3. Il conviendrait donc de vérifier que les structures lipidiques polymériques permettent de maintenir la BP-3 à la surface cutanée même sous rayonnement UV.

Conclusion générale

Ces dernières décennies, l'incidence des cancers cutanés (mélanomes et carcinomes) a considérablement augmenté dans le monde. Les individus ont pris conscience des risques liés aux expositions solaires sans protection cutanée. Les écrans solaires, lorsqu'ils sont utilisés correctement, constituent un moyen de photo-protection efficace pour prévenir les dommages cutanés photo-induits. Leur efficacité repose sur les filtres UV qui y sont incorporés mais également sur la dispersion de ces filtres UV dans la formulation.

Les filtres UV inorganiques sont plus efficaces que les filtres UV organiques et plus respectueux pour la peau. Cependant, la plupart des écrans solaires ne contenant que des filtres UV inorganiques ne sont pas agréables à utiliser compte tenu de leur fini esthétique insatisfaisant. Les filtres UV inorganiques sont donc la plupart du temps incorporés sous forme de nanoparticules afin d'améliorer les qualités esthétiques des écrans solaires minéraux. De nombreuses études montrent le potentiel toxique de certains filtres UV organiques, pour l'Homme. De même, des études tendent à montrer les filtres UV inorganiques sous forme de nanoparticules pourraient exercer des effets délétères sur l'organisme si ils venaient à pénétrer la peau.

Ainsi, le développement de nouvelles formulations pour les filtres UV est nécessaire afin de diminuer les effets indésirables dont ils peuvent être à l'origine. Les nanoparticules et nanocapsules lipidiques sont intéressantes pour formuler les filtres UV organiques et inorganiques. En effet, ces structures lipidiques submicroniques permettent (i) d'améliorer l'efficacité des filtres UV et (ii) de réduire la perméation percutanée des filtres UV organiques. La formulation des filtres UV dans des nanoparticules et nanocapsules lipidiques permet de réduire les concentrations en filtres UV organiques et inorganiques dans les écrans solaires tout en maintenant un fort pouvoir photo-protecteur. Les filtres UV ne sont pas uniquement présents dans les écrans solaires. En effet, un large panel de produits cosmétiques en contiennent ce qui peut augmenter les concentrations en filtres UV auxquelles les individus sont exposés et donc le risque de développer des effets indésirables. Le développement de nouvelles formulations d'écrans solaires permettant de réduire les concentrations en filtres UV incorporées permettrait donc de diminuer les concentrations auxquelles les individus sont exposés.

Ce travail a mis en évidence l'intérêt des nanoparticules lipidiques polymériques pour formuler les filtres UV organiques et inorganiques en augmentant leur pouvoir photo-protecteur dans le domaine UV tout en limitant leur perméation percutanée. La matrice lipidique des NPLC comprend de la PCL qui pourrait interagir avec les nanoparticules de TiO_2 en augmentant leur pouvoir photo-protecteur ce qui permet de réduire drastiquement les concentrations en filtres UV utilisées pour formuler des écrans solaires. Des études complémentaires sur les nanoparticules et nanocapsules lipidiques utilisées dans cette étude sont nécessaires afin de caractériser de manière plus approfondie ces transporteurs lipidiques. A partir de ces résultats expérimentaux, des émulsions solaires ont pu être développées. Un lot pilote d'émulsion solaire a d'ailleurs été réalisé en vue de leur prochaine commercialisation.

Références bibliographiques

- [1] Hung, C.F., Chen, W.Y., Hsu, C.Y., Aljuffali, I.A., Shih, H.C., Fang, J.Y., 2015. Cutaneous penetration of soft nanoparticles via photodamaged skin: Lipid-based and polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 94, 94-105.
- [2] Papoutsaki, M., Costanzo, A., 2013. Treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Biodrugs.* 27, 3-12.
- [3] Hossein-Nezhad, A., Holick, M.F., 2013. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin. Proc.* 88, 720-755.
- [4] Juzeniene, A., Moan, J., 2012. Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. *Dermatoendocrinol.* 4(2), 109-117.
- [5] El-Abaseri, T.B., Putta, S., Hansen, L.A., 2006. Ultraviolet irradiation induces keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia through the activation of the epidermal growth factor receptor. *Carcinogenesis.* 27(2), 225-231.
- [6] Maeda, K., Hatao, M., 2004. Involvement of Photooxidation of Melanogenic Precursors in Prolonged Pigmentation Induced by Ultraviolet A. *J. Invest. Dermatol.* 122, 503-509.
- [7] Findlay, G.H., Van der Merwe, L.W., 1966. The Meirrowsky phenomenon. Colour changes in melanin according to temperature and redox potential. *Br. J. Dermatol.* 78(11), 572-576.
- [8] Nielsen, K.P., Zhao, L., Stamnes, J.J., Stamnes, K., Moan, J.J., 2006. The importance of the depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological processes. *Photochem. Photobiol. B.* 82(3), 194-198.
- [9] Del Bino, S., Ito, S., Sok, J., Nakanishi, Y., Bastien, P., Wakamatsu, K., Bernerd, F., 2015. Chemical analysis of constitutive pigmentation of human epidermis reveals constant eumelanin to pheomelanin ratio. *Pigment Cell Melanoma Res.*
- [10] Dossier de presse. Mercredi 23 mai 2012. Mieux prévenir et détecter tôt les cancers de la peau. Disponible à : <http://www.inpes.sante.fr/70000/dp/12/dp120523.pdf>. Consulté le 30 septembre 2015.
- [11] Salinaro, A., Emeline, A. V., Zhao, J., Hidaka, H., Ryabchuk, V.K. and Serpone, N. Terminology, relative photonic efficiencies and quantum yields in heterogeneous photocatalysis. Part I: Suggested protocol. *Pure Appl. Chem.* 71, 321-335 (1999).
- [12] Crosera, E., Prodi, A., Mauro, M., Pelin, M., Florio, C., Bellomo, F., Adami, G., Apostoli, P., De Palma, G., Bovenzi, M., Campanini, M., Filon, F.L., 2015. Titanium Dioxide Nanoparticle Penetration into the Skin and Effects on HaCaT Cells. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12(8), 9282-9297.
- [13] Anderson, M. W., Hewitt, J. P. and Spruce, S. R., 1997. Broad spectrum physical sunscreens: titanium dioxide and zinc oxide. In: *Sunscreens* (Marcel and Dekker, eds.), pp.353-398. *Cosmetic science and Technology Series*, New York.
- [14] Yabe, S., Sato, T., 2003. Cerium oxide for sunscreen cosmetics. *J. Solid State Chem.* 171(1-2), 7-11.

- [15] Serpone, N., Salinaro, A., Horikoshi, S., Hidaka, H., 2006. Beneficial effects of photo-inactive titanium dioxide specimens on plasmid DNA, human cells and yeast cells exposed to UVA/UVB simulated sunlight. *J. Photoch. Photobio. A.* 179(1–2), 200-212.
- [16] Siddiquey, I.A., Ukaji, E., Furusawa, T., Sato, M., Suzuki, N., 2007. The effects of organic surface treatment by methacryloxypropyltrimethoxysilane on the photostability of TiO₂. *Materials Mater. Chem. Phys.* 105 (2–3), 162-168.
- [17] Popov, A.P., Lademann, J., Priezzhev, A.V., Myllylä, R., 2005. Effect of size of TiO₂ nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin. *J. Biomed. Opt.* 10(6), 064037.
- [18] El-Boury, S., Couteau, C., Boulande, L., Papis, E., Coiffard, L.J., 2007. Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method. *Int. J. Pharm.* 340(1-2), 1-5.
- [19] Azeem, A., Khan, Z.I., Aqil, M., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Talegaonkar, S., 2009. Microemulsions as a surrogate carrier for dermal drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35(5), 525-47.
- [20] Zhai, H., Maibach, H.I., 2002. Occlusion vs. skin barrier function. *Skin Res. Technol.* 8(1), 1-6.
- [21] Nichols, J.A., Katiyar, S.K., 2010. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* 302(2), 71-83.
- [22] Grether-Beck, S., Marini, A., Jaenicke, T., Krutmann, J., 2015. Effective photoprotection of human skin against infrared A radiation by topically applied antioxidants: results from a vehicle controlled, double-blind, randomized study. *Photochem. Photobiol.* 91(1), 248-50.
- [23] Boyd, J., Parkinson, C., Sherman, P., 1972. Factors affecting emulsion stability, and the HLB concept. *J. Colloid. Interf. Sci.* 41(2), 359–370.
- [24] Jean Briant. Phénomènes d'interface. Agents de surface: principes et modes d'action. Editions Technip (3 mai 2000) p.283.
- [25] Couteau, C., Demé, A., Cheignon, C., Coiffard, L.J., 2012. Influence of the hydrophilic-lipophilic balance of sunscreen emulsions on their water resistance property. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 38(11), 1405-1407.
- [26] Osterwalder, U., Sohn, M., Herzog, B., 2014. Global state of sunscreens. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 30(2-3), 62-80.
- [27] Novick, R., Anderson, G., Miller, E., Allgeier, D., Unice, K., 2015. Factors that influence sunscreen application thickness and potential preservative exposure. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 31(4), 212-223.
- [28] Bech-Thomsen, N., Wulf, H.C., 1992. Sunbathers' application of sunscreen is probably inadequate to obtain the sun protection factor assigned to the preparation. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 9(6), 242-244.

- [29] Gaspar, L.R., Maia Campos P.M.B.G., 2003. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *Int. J. Pharm.* 250(1), 35-44.
- [30] Hewitt, J., Dahms, G.H., 1996. Rheology-its effect on physical SPFs. *Soap Perfum. Cosmet.* 69, 23-25.
- [31] Dahms, G.H., 1994. Einflub der Thixotropie auf die Lichtschutzwirkung von Sonnenschutzemulsionen. *Par-fuem. Kosmet.* 75, 675-679.
- [32] Halliday, G.M., Byrne, S.N., Damian, D.L., 2013. Ultraviolet A radiation its role in immunosuppression and carcinogenesis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* 30(4), 214-21.
- [33] European commission recommendation on the efficacy of sunscreen products and the claims made related thereto. *Official Journal of the European Union* 265/39 (26.9.2006).
- [34] ISO 24444:2010. Cosmetics – sun protection test methods – In vivo determination of the sun protection factor (SPF).
- [35] ISO 24442:2011. Cosmetics – sun protection test methods – In vivo determination of sunscreen UVA protection.
- [36] ISO 24443:2012. Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro.
- [37] Diffey, B.L., Robson, J., 1989. Sun protection factor in vitro. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40, 127-132.
- [38] Fitzpatrick, T.B., 1975. "Soleil et peau" [Sun and skin]. *Journal de Médecine Esthétique* (in French). 2, 3–34.
- [39] Fitzpatrick, T.B., 1988. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch. Dermatol.* 124(6), 869-871.
- [40] L'indice universel de rayonnement UV solaire, guide pratique. Bibliothèque de l'OMS. 2002. WHO/SDE/OEH/02.2.
- [41] Gilbert, E., Pirot, F., Bertholle, V., Roussel, L., Falson, F., Padois, K., 2013. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35(3), 208-219.
- [42] Commission Directive 2008/123/EC of 18 December 2008 amending Council Directive 76/768/EEC, concerning cosmetic products, for the purpose of adapting Annexes II and VII thereto to technical progress. *Off. J. Eur. Union* L 340/71 (2008).
- [43] Bouillon, C., 2000. Recent advances in sun protection. *J. Dermatol. Sci.* 23(1),: 57-61.
- [44] Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta.* 360(3), 794-802.
- [45] Allen, J.M., Gossett, C.J., Allen SF., 1996. Photochemical formation of singlet molecular oxygen (1O_2) in illuminated aqueous solutions of p-aminobenzoic acid (PABA). *J. Photochem. Photobiol. B.* 32(1-2), 33-37.

- [46] Inbaraj, J.J., Bilski, P., Chignell, C.F., 2002. Photophysical and photochemical studies of 2-phenylbenzimidazole and UVB sunscreen 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid. *Photochem. Photobiol.* 75(2), 107-116.
- [47] Cantrell, A., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., 2001. Photochemical and photophysical properties of sunscreens. (Giacomini, P. U. ed), *Sun protection in man.* 495-519.
- [48] Anderson, B.D., Raykar, P.V., 1989. Solute Structure-Permeability Relationships in Human Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* 93, 280–286.
- [49] Guy, R.H., Potts, R.O., 1992. Structure-permeability relationships in percutaneous penetration. *J. Pharm. Sci.* 81(6), 603-604.
- [50] Thakoersing, V.S., van Smeden, J., Boiten, W.A., Gooris, G.S., Mulder, A.A., Vreeken, R.J., El Ghalbzouri, A., Bouwstra, J.A., 2015. Modulation of stratum corneum lipid composition and organization of human skin equivalents by specific medium supplements. *Exp. Dermatol.* 24(9), 669-674.
- [51] Jannin, V., Chevrier, S., Michenaud, M., Dumont, C., Belotti, S., Chavant, Y., Demarne, F., 2015. Development of self emulsifying lipid formulations of BCS class II drugs with low to medium lipophilicity. *Int. J. Pharm.* 495(1), 385-392.
- [52] Zhang, Q., Grice, J.E., Li, P., Jepps, O.G., Wang, G.J., Roberts, M.S., 2009. Skin solubility determines maximum transepidermal flux for similar size molecules. *Pharm. Res.* 26(8), 1974-1985.
- [53] Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, L., Navalón, A., 2014. A new method for the determination of benzophenone-UV filters in human serum samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 121, 97-104.
- [54] Zhang, T., Sun, H., Qin, X., Wu, Q., Zhang, Y., Ma, J., Kannan, K., 2013. Benzophenone-type UV filters in urine and blood from children, adults, and pregnant women in China: partitioning between blood and urine as well as maternal and fetal cord blood. *Sci. Total Environ.* 461-462, 49-55.
- [55] Asimakopoulos, A.G., 2014a. Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine. *Sci. Total Environ.* 470-471, 1243-1249.
- [56] Asimakopoulos, A.G., Wang, L., Thomaidis, N.S., Kannan, K., 2014b. A multi-class bioanalytical methodology for the determination of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters, benzophenone-type ultraviolet filters in human urine. *J. Chromatogr. A.* 1324, 141-148
- [57] Philippat, C., Wolff, M.S., Calafat, A.M., Ye, X., Bausell, R., Meadows, M., Stone, J., Slama, R., Engel, S.M., 2013. Prenatal exposure to environmental phenols concentrations in

amniotic fluid and variability in urinary concentrations during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 121(10), 1225-1231.

[58] Vela-Soria, F., Jiménez-Díaz, J.I., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Ballesteros, O., Navalón, A., Vílchez, J.L., Fernández, M.F., Olea, N., 2011. Determination of benzophenones in human placental tissue samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta.* 85(4), 1848-1855.

[59] Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerkel, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., Faass, O., Stutz, E., Jarry, H., Wuttke, W., Lichtensteiger, W., 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update. *Toxicology.* 205(1-2), 113-122.

[60] Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109(3), 239-244.

[61] Bolt, H.M., Guhe, C., Degen, G.H., 2001. Comments on In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109(8), A358-361.

[62] Mueller, S.O., Kling, M., Arifin Firzani, P., Mecky, A., Duranti, E., Shields-Botella, J., Delansorne, R., Broschard, T., Kramer, P.J., 2003. Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells comparison with phyto and xenoestrogens. *Toxicol Lett.* 142(1-2), 89-101.

[63] Schreurs, R., Lanser, P., Seinen, W., Van der Burg, B., 2002. Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Arch. Toxicol.* 76(5-6), 257-61.

[64] Durrer, S., Maerkel, K., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., 2005. Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor. *Endocrinology.* 146, 2130-2139.

[65] Kunisue, T., Chen, Z., Buck Louis, G.M., Sundaram, R., Hediger, M.L., Sun, L., Kannan, K., 2012. Urinary concentrations of benzophenone-type UV filters in U.S. women and their association with endometriosis. *Environ. Sci. Technol.* 46(8), 4624-4632.

[66] Liao, C., Kannan, K., 2014. Widespread occurrence of benzophenone-type UV light filters in personal care products from China and the United States an assessment of human exposure. *Environ. Sci. Technol.* 48(7), 4103-4109.

[67] Addamo, M., Augugliaro, V., Bellardita, M., Di Paola, A., Loddo, V., Palmisano, G., Palmisano, L., Yurdakal, S., 2008. Environmentally Friendly Photocatalytic Oxidation of Aromatic Alcohol to Aldehyde in Aqueous Suspension of Brookite TiO₂. *Catal. Lett.* 126(1), 58-62.

- [68] Yurdakal, S., Palmisano, G., Loddo, V., Augugliaro, V., Palmisano, L.J., 2008. Nanostructured rutile TiO₂ for selective photocatalytic oxidation of aromatic alcohols to aldehydes in water. *Am. Chem. Soc.* 130(5), 1568-1569.
- [69] Palmisano, G., Yurdakal, S., Augugliaro, V., Loddo, V., Palmisano, L., 2007. Photocatalytic Selective Oxidation of 4-Methoxybenzyl Alcohol to Aldehyde in Aqueous Suspension of Home-Prepared Titanium Dioxide Catalyst. *Adv. Synth. Catal.* 349(6), 964–970.
- [70] Chandiran, A.K., Yella, A., Stefik, M., Heiniger, L.P., Comte, P., Nazeeruddin, M.K., Grätzel, M., 2013. Low-temperature crystalline titanium dioxide by atomic layer deposition for dye-sensitized solar cells. *ACS Appl. Mater. Inter.* 5(8), 3487-3493.
- [71] Diebold, U., 2003. The surface science of titanium dioxide. *Surf. Sci. Rep.* 48(5–8), 53-229.
- [72] Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V., 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Part. *Fibre. Toxicol.* 6, (33).
- [73] Silva, C.G., Faria, J.L., 2009. Anatase vs. rutile efficiency on the photocatalytic degradation of clofibrac acid under near UV to visible irradiation. *Photochem. Photobiol. Sci.* (5), 705-711.
- [74] Yang, Y.H., Chen, H., Pan, G., 2007. Particle concentration effect in adsorption desorption of Zn(II) on anatase type nano TiO₂. *J. Environ. Sci. (China).* 19(12), 1442-1445.
- [75] Serpone, N., Salinaro, A., Horikoshi, S., Hidaka, H., 2006. Beneficial effects of photo-inactive titanium dioxide specimens on plasmid DNA, human cells and yeast cells exposed to UVA/UVB simulated sunlight. *J. Photoch. Photobio. A.* 179(1–2), 200-212.
- [76] Faunce, T., Murray, K., Nasu, H., Bowman, D., 2008. Sunscreen safety: the precautionary principle; the Australian Therapeutic Goods Administration and nanoparticles in sunscreens. *Nanoethics.* 2, 231–240.
- [77] Baroli, B., 2010. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *J. Pharm. Sci.* 99(1), 21-50.
- [78] Cevc, G., Vierl, U., 2010. Nanotechnology and the transdermal route. A state of the art review and critical appraisal. *J. Control Release.* 141(3), 277-299.
- [79] Peira, E., Turci, F., Corazzari, I., Chirio, D., Battaglia, L., Fubini, B., Gallarate, M., 2014. The influence of surface charge and photo-reactivity on skin-permeation enhancer property of nano-TiO₂ in ex vivo pig skin model under indoor light. *Int. J. Pharm.* 467(1-2), 90-99.
- [80] Meyer, K., Rajanahalli, P., Ahamed, M., Rowe, J.J., Hong, Y., 2011. ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways. *Toxicol. In Vitro.* 25(8), 1721-1726.
- [81] Wamer, W.G., Yin, J.J., Wei, R.R., 1997. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 23(6), 851-858.

- [82] Tiano, L., Armeni, T., Venditti, E., Barucca, G., Mincarelli, L., Damiani, E., 2010. Modified TiO₂ particles differentially affect human skin fibroblasts exposed to UVA light. *Free Radic. Biol. Med.* 49(3), 408-415.
- [83] Kakinoki, K., Yamane, K., Teraoka, R., Otsuka, M., Matsuda, Y. J., 2004. Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine. *Pharm. Sci.* 93(3), 582-589.
- [84] Afssaps, 14/06/2011. Recommandations relatives à l'utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc en tant que filtres ultraviolets dans les produits cosmétiques. Disponible à : http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/07fee639ffe2915fd26d91d42a9487d8.pdf. Consulté le 1^{er} octobre 2015.
- [85] Règlement (CE) N° 1223/2009 du parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. Disponible à : <http://www.eurosafe.fr/vars/fichiers/reglement-12232009.pdf>. Consulté le 1^{er} octobre 2015.
- [86] Fiche toxicologique FT291. Institut national de recherche et de sécurité. Edition 2013.
- [87] Hayden, C.G.J., Roberts, M.S., Benson, H.A., 1997. Systemic absorption of sunscreen after topical application. *Lancet.* 350, 863-864.
- [88] Janjua, N.R., Kongshoj, B., Andersson, A.M., Wulf, H.C., 2008. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22(4), 456-461.
- [89] Treffel, P., Gabard, B., 1996. Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles. *Pharm. Res.* 13(5), 770-774.
- [90] Walters, K.A., Roberts, M.S., 2002. Percutaneous absorption of sunscreens. (Bronaugh, R. L. and Maibach, H. I. Eds) *Topical Absorption of Dermatological Products.* 465-481.
- [91] Kasichayanula, S., House, J.D., Wang, T., Gu, X., 2007. Percutaneous characterization of the insect repellent DEET and the sunscreen oxybenzone from topical skin application. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223(2), 187-194.
- [92] Sjøborg, T., Basse, L.H., Halling-Sørensen, B., 2007. Risk assessment of topically applied products. *Toxicology.* 236(1-2), 140-148.
- [93] Jiang, R., Roberts, M.S., Collins, D.M., Benson, H.A., 1999. Absorption of sunscreens across human skin an evaluation of commercial products for children and adults. *Br J Clin Pharmacol.* 48(4), 635-637.
- [94] Janjua, N.R., Mogensen, B., Andersson, A.M., Petersen, J.H., Henriksen, M., Skakkebaek, N.E., Wulf, H.C., 2004. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J. Invest. Dermatol.* 123(1), 57-61.

- [95] Dubois, D., Dubois, E.F., 1989. Nutrition metabolism classic - a formula to estimate the approximate surface-area if height and weight be known. (Reprinted from Archives Internal Medicine, Vol 17, pg 863-1916). Nutrition. 5, 303-311.
- [96] Morohoshi, K., Yamamoto, H., Kamata, R., Shiraishi, F., Koda, T., Morita, M., 2005. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. Toxicol. In Vitro. 19(4), 457-469.
- [97] Tinwell, H., Lefevre, P.A., Moffat, G.J., Burns, A., Odum, J., Spurway, T.D., Orphanides, G., Ashby, J., 2002. Confirmation of uterotrophic activity of 3-4-methylbenzylidene camphor in the immature rat. Environ. Health Perspect. 110(5), 533-536.
- [98] Okereke, C.S., Abdel-Rhman, M.S., Friedman, M.A., 1994. Disposition of benzophenone-3 after dermal administration in male rats. Toxicol. Lett. 73(2), 113-122.
- [99] Jeon, H.K., Sarma, S.N., Kim, Y.J., Ryu, J.C., 2008. Toxicokinetics and metabolisms of benzophenone-type UV filters in rats. Toxicology. 248(2-3), 89-95.
- [100] Kasichayanula, S., House, J.D., Wang, T., Gu, X., 2005. Simultaneous analysis of insect repellent DEET, sunscreen oxybenzone and five relevant metabolites by reversed-phase HPLC with UV detection application to an in vivo study in a piglet model. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 822(1-2), 271-277.
- [101] Nakagawa, Y., Suzuki, T., 2002. Metabolism of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in isolated rat hepatocytes and xenoestrogenic effects of its metabolites on MCF-7 human breast cancer cells. Chem. Biol. Interact. 139(2), 115-128.
- [102] Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S., 2005. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. Toxicol. Appl. Pharmacol. 203(1), 9-17.
- [103] Hung, C.F., Chen, W.Y., Hsu, C.Y., Aljuffali, I.A., Shih, H.C., Fang, J.Y., 2015. Cutaneous penetration of soft nanoparticles via photodamaged skin: Lipid-based and polymer-based nanocarriers for drug delivery. Eur. J. Pharm. Biopharm. 94, 94-105.
- [104] Balmer, M.E., Buser, H.R., Müller, M.D., Poiger, T., 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. Environ. Sci. Technol. 39(4), 953-962.
- [105] Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintana, J.B., Beiras, R., 2014. Ecotoxicological evaluation of four UV filters using marine organisms from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus*, and *Siriella armata*. Chemosphere. 104, 44-50.
- [106] Liu, H., Sun, P., Liu, H., Yang, S., Wang, L., Wang, Z., 2015a. Acute toxicity of benzophenone-type UV filters for *Photobacterium phosphoreum* and *Daphnia magna* QSAR analysis, interspecies relationship and integrated assessment. Chemosphere. 135, 182-188.

- [107] Bluthgen, N., Zucchi, S., Fent, K., 2012. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263(2), 184-194.
- [108] Liu, H., Sun, P., Liu, H., Yang, S., Wang, L., Wang, Z., 2015b. Hepatic oxidative stress biomarker responses in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to four benzophenone UV filters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 116-122.
- [109] Buser, H.R., Balmer, M.E., Schmid, P., Kohler, M., 2006. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 40(5), 1427-1431.
- [110] Almeida, C., Stępkowska, A., Alegre, A., Nogueira, J.M., 2013. Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective sorbent phases. *J. Chromatogr. A.* 1311, 1-10.
- [111] Wu, J.W., Chen, H.C., Ding, W.H., 2013. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples. *J. Chromatogr. A.* 1302, 20-27.
- [112] Jurado, A., Gago-Ferrero, P., Vázquez-Suñé, E., Carrera, J., Pujades, E., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2014. Urban groundwater contamination by residues of UV filters. *J. Hazard Mater.* 271, 141-149.
- [113] Fent, K., Zenker, A., Rapp, M., 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ. Pollut.* 158(5), 1817-1824.
- [114] Loraine, G.A., Pettigrove, M.E., 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ. Sci. Technol.* 40(3), 687-695.
- [115] Zhang, Z., Ren, N., Li, Y.F., Kunisue, T., Gao, D., Kannan, K., 2011. Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 45(9), 3909-3916.
- [116] Wang, L., Asimakopoulos, A.G., Moon, H.B., Nakata, H., Kannan, K., 2013. Benzotriazole, benzothiazole, and benzophenone compounds in indoor dust from the United States and East Asian countries. *Environ. Sci. Technol.* 47(9), 4752-4759.
- [117] Tsui, M.M., Leung, H.W., Lam, P.K., Murphy, M.B., 2014. Seasonal occurrence, removal efficiencies and preliminary risk assessment of multiple classes of organic UV filters in wastewater treatment plants. *Water Res.* 53, 58-67.
- [118] Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2012. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Anal. Bioanal. Chem.* 404(9), 2597-2610.
- [119] Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2013. Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid

chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1286, 93-101.

[120] Kunz, P.Y., Galicia, H.F., Fent, K., 2006. Comparison of In Vitro and In Vivo Estrogenic Activity of UV Filters in Fish. *Toxicol. Sci.* 90(2), 349-361.

[121] Weisbrod, C.J., Kunz, P.Y., Zenker, A.K., Fent, K., 2007. Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 225(3), 255-66.

[122] Coronado, M., De Haro, H., Deng, X., Rempel, M.A., Lavado, R., Schlenk, D., 2008. Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. *Aquat. Toxicol.* 90(3), 182-187.

[123] Zucchi, S., Blüthgen, N., Ieronimo, A., Fent, K., 2011. The UV-absorber benzophenone-4 alters transcripts of genes involved in hormonal pathways in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos and adult males. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 250(2), 137-146.

[124] Danovaro, R., Bongiorno, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, L., Pusceddu, A., 2008. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environ. Health Perspect.* 116(4), 441-7.

[125] Jovanović, B., Guzmán, H.M., 2014. Effects of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on caribbean reef-building coral (*Montastraea faveolata*). *Environ. Toxicol. Chem.* 33(6), 1346-53.

[126] Fahmy, S.R., Abdel-Ghaffar, F., Bakry, F.A., Sayed, D.A., 2014. Ecotoxicological effect of sublethal exposure to zinc oxide nanoparticles on freshwater snail *Biomphalaria alexandrina*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 67(2), 192-202.

[127] LOI n° 2010-788 du 12 juillet 2010 portant engagement national pour l'environnement (1). Disponible à : <http://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2010/7/12/DEVX0822225L/jo/texte>. Consulté le 1er octobre 2015.

[128] Stiefel, C., Schwack, W., 2014. Photoprotection in changing times – UV filter efficiency and safety, sensitization processes and regulatory aspects. *Int. J. Cosmet. Sci.* 37(1), 2-30.

[129] OECD (2004). Test Guideline 427: Skin absorption: in vivo Method. OECD, Paris. Palm, M.D., O'Donoghue, M.N., 2007. Update on photoprotection. *Dermatol. Ther.* 20(5), 360-376.

[130] Levintova, Y., Plakogiannis, F.M., Bellantone, R.A., 2011. An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *Int. J. Pharm.* 419, 96-106.

[131] Salmon D, Pirot F, Rodriguez L, et al. Device for studying the permeability of artificial, synthetic or biological membranes. Patent WO2013057401, priority date: 10 october 2011.

[132] ISO/TS 80004-2:2015. Nanotechnologies - Vocabulaire - Partie 2: Nano-objets.

- [133] Uchechi, O., Ogbonna, J.D.N., A., Attama, A.A., 2014. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery. Application of Nanotechnology in Drug Delivery. In: Nanotechnology and Nanomaterials. Ed. Ali Demir Sezer. Chapter 6, 193-235.
- [134] Manjunath, K., Venkateswarlu, V., 2005. Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of clozapine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration. *J. Control. Release.* 107(2), 215-228.
- [135] Müller, R.H., Keck, C.M., 2004. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J. Biotechnol.* 113(1–3), 151-170.
- [136] Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 385(1-2), 113-142.
- [137] Wissing, S.A., Kayser, O., Müller, R.H., 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 56(9), 1257-1272.
- [138] Lollo, G., Hervella, P., Calvo, P., Avilés, P., Guillén, M.J., Garcia-Fuentes, M., Alonso, M.J., Torres, D., 2015. Enhanced in vivo therapeutic efficacy of plitidepsin-loaded nanocapsules decorated with a new poly-aminoacid-PEG derivative. *Int. J. Pharm.* 483(1-2), 212-219.
- [139] Videira, M.A., Botelho, M.F., Santos, A.C., Gouveia, L.F., de Lima, J.J., Almeida, A.J., 2002. Lymphatic uptake of pulmonary delivered radiolabelled solid lipid nanoparticles. *J. Drug Target.* 10(8), 607-613.
- [140] Chana, J., Forbes, B., Jones, S.A., 2015. Triggered-release nanocapsules for drug delivery to the lungs. *Nanomedicine.* 11(1), 89-97.
- [141] Pandey, R., Sharma, S., Khuller, G.K., 2005. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis.* 85(5–6), 415-420.
- [142] Mahidhara, G., Kanwar, R.K., Roy, K., Kanwar, J.R., 2015. Oral administration of iron-saturated bovine lactoferrin-loaded ceramic nanocapsules for breast cancer therapy and influence on iron and calcium metabolism. *Int. J. Nanomedicine.* 10, 4081-4098.
- [143] Sznitowska, M., Gajewska, M., Janicki, S., Radwanska, A., Lukowski, G., 2001. Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52(2), 159-163.
- [144] Cavalli, R., Gasco, M.R., Chetoni, P., Burgalassi, S., Saettone, M.F., 2002. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *Int. J. Pharma.* 238(1–2), 241-245.
- [145] Lippacher, A., Müller, R.H., Mäder, K., 2002. Semisolid SLN™ dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 53(2), 155-160.

- [146] Zhai, Y., Yang, X., Zhao, L., Wang, Z., Zhai, G., 2014. Lipid nanocapsules for transdermal delivery of ropivacaine: in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 471(1-2), 103-111.
- [147] Steelandt, J., Salmon, D., Gilbert, E., Almouazen, E., Renaud, F.N.R., Roussel, L., Haftek, M., Pirot, F., 2014. Antimicrobial nanocapsules: from new solvent-free process to in vitro efficiency. *Int. J. Nanomedicine.* 9, 4467–4474.
- [148] Ourique, A.F., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Beck, R.C., 2008. Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *Int. J. Pharm.* 352(1-2), 1-4.
- [149] Demirel, M., Yazan, Y., Müller, R.H., Kiliç, F., Bozan, B., 2001. Formulation and in vitro-in vivo evaluation of piribedil solid lipid micro- and nanoparticles. *J. Microencapsul.* 18(3), 359-371.
- [150] Göppert, T.M., Müller, R.H., 2005. Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int. J. Pharma.* 302(1–2), 172-186.
- [151] Puri, D., 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC): A novel approach for cosmetic and dermal pharmaceutical. *J. Global Pharm. Techn.* 2(9), 1-15.
- [152] Wissing, S.A., Müller, R.H., 2001. A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles. *Int. J. Cosmetic. Sci.* 23(4), 233-243.
- [153] Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004. Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.* 278(1), 1-23.
- [154] Wissing, S.A., Müller, R.H., 2001. Solid lipid nanoparticles (SLN)—a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie.* 56(10), 783-786.
- [155] Villalobos-Hernández, J.R., Müller-Goymann, C.C., 2006. Physical stability, centrifugation tests, and entrapment efficiency studies of carnauba wax–decyl oleate nanoparticles used for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63(2), 115-127.
- [156] Villalobos-Hernández, J.R., Müller-Goymann, C.C., 2005. Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60(1), 113-122.
- [157] Villalobos-Hernández, J.R., Müller-Goymann, C.C., 2006. Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: The synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale. *Int. J. Pharma.* 322(1–2), 161-170.
- [158] Abdel-Mottaleb, M.M., Neumann, D., Lamprecht, A., 2011. Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79(1), 36-42.

- [159] Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., Zeng, F.D., 2009. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.* 191(1), 1-8.
- [160] Menzel, F., Reinert, T., Vogt, J., Butz, T., 2004. Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO₂ particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nucl. Instrum. Meth. B* 219–220, 82-86.
- [161] Nesseem, D., 2011. Formulation of sunscreens with enhancement sun protection factor response based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Cosmetic. Sci.* 33(1), 70-79.
- [162] Villalobos-Hernández, J.R., Müller-Goymann, C.C., 2007. In vitro erythematous UV-A protection factors of inorganic sunscreens distributed in aqueous media using carnauba wax–decyl oleate nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65(1), 122-125.
- [163] Gilbert, E., Pirot, P., De Larminat, A., Kurbiel, D., 2015. Aqueous suspension of nanocapsules encapsulating sunscreen agents. Patent WO2015/022471 A1. PCT/FR2014/052086. Published: 19.02.2015.
- [164] Truffault, L., Winton, B., Choquet, B., Andrezza, C., Simmonard, C., Devers, T., Konstantinov, K., Couteau, C., Coiffard, L.J.M., 2012. Cerium oxide based particles as possible alternative to ZnO in sunscreens: Effect of the synthesis method on the photoprotection results. *Mater. Lett.* 68, 357–360.
- [165] Gonzalez-Mira, E., Egea, M.A., Garcia, M.L., Souto, E.B. 2010. Design and ocular tolerance of flurbiprofen loaded ultrasound-engineered NLC. *Colloids Surface B.* 81(2), 412-21.
- [166] Kobo attenuation Grade TiO₂ Dispersions Flyer. Disponible à : [http://www.koboproductsinc.com/Downloads/Kobo-TiO₂Dispersions.pdf](http://www.koboproductsinc.com/Downloads/Kobo-TiO2Dispersions.pdf). Consultée le 13 septembre 2015.
- [167] Shoja, M., Shameli, K., Ahmad, M.B., Zakaria, Z., 2015. Preparation and characterization of poly(ε-caprolactone)/TiO₂ micro-composites. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 10(2), 471-477.
- [168] Brochure Ceriguard. Daito Kasei. Disponible à : <http://www.daitokasei.com/english/products/CERIGUARBROCHURE130426.pdf> Consulté le 7 octobre 2015.
- [169] Krause, M., Klit, A., Blomberg Jensen, M., Sjøeborg, T., Frederiksen, H., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., Skakkebaek, N.E., Drzewiecki, K.T., 2012. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *Int. J. Androl.* 35(3), 424-436.
- [170] Yamamoto, T., Kurasawa, M., Hattori, T., Maeda, T., Nakano, H., Sasaki, H., 2008. Relationship between expression of tight junction-related molecules and perturbed epidermal barrier function in UVB-irradiated hairless mice. *Arch. Dermatol. Res.* 300(2), 61-8.

- [171] Schlumpf, M., Kypke, K., Vokt, C.C., Birchler, M., Durrer, S., Faass, O., Ehnes, C., Fuetsch, M., Gaille, C., Henseler, M., Hofkamp, L., Maerkel, K., Reolon, S., Timms, B., Tresguerres, J.A., Lichtensteiger, W., 2008. Endocrine active UV filters: developmental toxicity and exposure through breast milk. *Chim. Int. J. Chem.* 62(5), 345-51.
- [172] Wong, T., Orton, D., 2011. Sunscreen allergy and its investigation. *Clin. Dermatol.* 29(3), 306-310.
- [173] Bryden, A.M., Moseley, H., Ibbotson, S.H., Chowdhury, M.M.U., Beck, M.H., Bourke, J., English, J., Farr, P., Foulds, I.S., Gawkrödger, D.J., George, S., Orton, D.I., Shaw, S., McFadden, J., Norris, P., Podmore, P., Powell, S., Rhodes, L.E., Sansom, J., Wilkinson, M., van Weelden, H., Ferguson, J., 2006. Photopatch testing of 1155 patients: results of the U.K. multicentre photopatch study group. *Br. J. Dermatol.* 155(4), 737-47.
- [174] Kim, S., Jung, D., Kho, Y., Choi, K., 2014. Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) — A two generation exposure study. *Aquat. Toxicol.* 155, 244-52.
- [175] Jiménez, M.M., Pelletier, J., Bobin, M.F., Martini, M.C., 2004. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. *Int. J. Pharm.* 272, 45-55.
- [176] Mestres, J.P., Duracher, L., Baux, C., Vian, L., Marti-Mestres, G., 2010. Benzophenone-3 entrapped in solid lipid microspheres: Formulation and in vitro skin evaluation. *Int. J. of Pharm.* 400, 1-7.
- [177] Sanad, R.A., Abdelmalak, N.S., Elbayoomy, T.S., Badawi, A.A., 2010. Formulation of a Novel Oxybenzone-Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLCs). *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 4, 1684-1694.
- [178] Lacatusu, I., Badea, N., Murariu, A., Meghea, A., 2011. The encapsulation effect of UV molecular absorbers into biocompatible lipid nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 6, 73.
- [179] Wissing, S.A., Müller, R.H., 2002a. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J. Controlled Release.* 81(3), 225-233.
- [180] Puglia, C., Damiani, E., Offerta, A., Rizza, L., Tirendi, G.G., Tarico, M.S., Curreri, S., Bonina, F., Perrotta, R.E., 2014. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: Characterization, in vitro penetration and photostability studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 51, 211-217.
- [181] Marcato, P.D., Caverzan, J., Rossi-Bergmann, B., Pinto, E.F., Machado, D., Silva, R.A., Justo, G.Z., Ferreira, C.V., Durán, N., 2011. Nanostructured polymer and lipid carriers for sunscreen. Biological effects and skin permeation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11(3), 1880-1896.
- [182] Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002a. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 242(1), 121-128.

- [183] Dash, T.K., Konkimalla, V.B., 2012. Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J. Control Release*. 158(1), 15-33.
- [184] Jee, J.P., Lim, S.J., Park, J.S., Kim, C.K., 2006. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 63(2), 134-139.
- [185] Puglia, C., Bonina, F., Rizza, L., Blasi, P., Schoubben, A., Perrotta, R., Tarico, M.S., Damiani, E., 2012. Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: in vitro percutaneous absorption and photostability studies. *J. Pharm. Sci.* 101(1), 301-11.
- [186] Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A., 2002b. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 131-155.
- [187] Chen, Y., Yang, X., Zhao, L., Almásy, L., Garamus, V.M., Willumeit, R., 2014. Preparation and characterization of a nanostructured lipid carrier for a poorly soluble drug. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 455, 36-43.
- [188] Alvarez-Roman, R., Barre, G., Guy, R.H., Fessi, H., 2001. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52(2), 191-195.
- [189] Das, S., Ng, W.K., Tan, R.B., 2012. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.* 47(1), 139-151.
- [190] Pohlmann, A.R., Mezzalana, G., Venturini, C.de G., Cruz, L., Bernardi, A., Jäger, E., Battastini, A.M., da Silveira, N.P., Guterres, S.S., 2008. Determining the simultaneous presence of drug nanocrystals in drug-loaded polymeric nanocapsule aqueous suspensions: a relation between light scattering and drug content. *Int. J. Pharm.* 359(1-2), 288-293.
- [191] Anderson, R.L., Cassidy, J.M. 1973. Variations in physical dimensions and chemical composition of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 61(1), 30-32.
- [192] Behl, C.R., Kumar, S., Mallick, A.W., Patel, H., Char, H., Piemontese, D., 1990. Choice of membranes for in vitro skin uptake studies and general experimental technics. *Methods Skin Absorpt*, Boca Raton FL CRC, 1-21.
- [193] Jennings, V., Thünemann, A.F., Gohla, S.H., 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* 199(2), 167-177.
- [194] Mosqueira, V.C., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F., Barratt, G., 2000. Poly(D,L-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: influence of the composition on physicochemical and structural properties. *J Pharm Sci.* 89(5), 614-626.

- [195] Kuntsche, J., Bunjes, H., Fahr, A., Pappinen, S., Rönkkö, S., Suhonen, M., Urtti, A., 2008. Interaction of lipid nanoparticles with human epidermis and an organotypic cell culture model. *Int. J. Pharm.* 354(1-2), 180-195.
- [196] Cross, S.E., Jiang, R., Benson, H.A., Roberts, M.S., 2001. Can increasing the viscosity of formulations be used to reduce the human skin penetration of the sunscreen oxybenzone? *J. Invest. Dermatol.* 117(1), 147-150.
- [197] Palm, M.D., O'Donoghue, M.N., 2007. Update on photoprotection. *Dermatol. Ther.* 20(5), 360-376.
- [198] Hanson, K.M., Gratton, E., Bardeen, C.J., 2006. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic. Biol. Med.* 41(8), 1205-1212.
- [199] Hany, J., Nagel, R., 1995. Detection of sunscreen agents in human breast milk. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 91, 341-345.
- [200] Poiger, T., Buser, H.R., Balmer, M.E., Bergqvist, P.A., Müller, M.D., 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere.* 55(7), 951-963.
- [201] Meinerling, M., Daniels, M., 2006. A validated method for the determination of traces of UV filters in fish using LC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 386(5), 1465-1473.
- [202] Murillo, M., Gamazo, C., Goñi, M.M., Irache, J.M., Blanco-Príeto, M.J., 2002. Development of microparticles prepared by spray-drying as a vaccine delivery system against brucellosis. *Int. J. Pharm.* 242(1-2), 341-344.
- [203] Aberturas, M.R., Molpeceres, J., Guzmán, M., García, F., 2002. Development of a new cyclosporine formulation based on poly(caprolactone) microspheres. *J. Microencapsul.* 19(1), 61-72.
- [204] Chandy, T., Wilson, R.F., Rao, G.H., Das, G.S., 2002. Changes in cisplatin delivery due to surface-coated poly (lactic acid)-poly(epsilon caprolactone) microspheres. *J. Biomater. Appl.* 16(4), 275-291.
- [205] Ivanov, A.N., Kozadaev, M.N., Bogomolova, N.V., Matveeva, O.V., Puchinyan, D.M., Norkin, I.A., Sal'kovskii, Y.E., Lyubun, G.P., 2015. In vivo evaluation of polycaprolactone-hydroxyapatite scaffold biocompatibility. *Tsitologiya.* 57(4), 286-293.
- [206] Abedalwafa, M., Wang, F., Wang, L., Li, C., 2013. Biodegradable poly-epsilon-caprolactone (PCL) for tissue engineering applications: a review. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 34(2), 123-140.
- [207] Wang, F., Mohammed, A., Li, C., Ge, P., Wang, L., King, M.W., 2014. Degradable/non-degradable polymer composites for in-situ tissue engineering small diameter vascular prosthesis application. *Biomed. Mater. Eng.* (6), 2127-2133.

- [208] Redenti, S., Tao, S., Yang, J., Gu, P., Klassen, H., Saigal, S., Desai, T., Young, M.J., 2008. Retinal tissue engineering using mouse retinal progenitor cells and a novel biodegradable, thin-film poly(ϵ -caprolactone) nanowire scaffold. *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.* (1), 19-29.
- [209] Hutmacher, D.W., 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 20(24), 2529-2543.
- [210] Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K.W., 2001. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Compos. Sci. Technol.* 61(9), 1189–1224.
- [211] Davies, B.L., Samoc, M., and Woodruff, M., 1996. Comparison of the Linear and Nonlinear Optical Properties of Poly(p-phenylenevinylene)/Sol–Gel Composites Derived from Tetramethoxysilane and Methyltrimethoxysilane. *Chem. Mater.* 8 (11), 2586–2594.
- [212] Yogo, T., Nakamura, T., Kikuta, K.I., Sakamoto, W., Hirano, S.I., 1996. Synthesis of α -Fe₂O₃ particle/oligomer hybrid material. *J. Mater. Res.* 11(02), 475-482.
- [213] Li, R., Nie, K., Pang, W., Zhu, Q., 2007. Morphology and properties of organic-inorganic hybrid materials involving TiO₂ and poly(ϵ -caprolactone), a biodegradable aliphatic polyester. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 83(1), 114-122.
- [214] Venkatesan, J., Kim, S.K., 2014. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering-a review. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10(10), 3124-3140.
- [215] Nitya, G., Nair, G.T., Mony, U., Chennazhi, K.P., Nair, S.V., 2012. In vitro evaluation of electrospun PCL/nanoclay composite scaffold for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23(7), 1749-1761.
- [216] Plazas Bonilla, C.E., Trujillo, S., Demirdögen, B., Perilla, J.E., Murat Elcin, Y., Gómez Ribelles, J.L., Clara, E. 2014. New porous polycaprolactone-silica composites for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 40, 418-426.
- [217] Gupta, K.K., Kundan, A., Mishra, P.K., Srivastava, P., Mohanty, S., Singh, N.K., Mishra, A., Maiti, P., 2012. Polycaprolactone composites with TiO₂ for potential nanobiomaterials: tunable properties using different phases. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14(37), 12844-12853.
- [218] Egerton, T.A., Tooley, I.R., 2014. Physical characterization of titanium dioxide nanoparticles. *Int. J. Cosmet. Sci.* 36(3), 195-206.
- [219] Singh, P., Nanda, A., 2014. Enhanced sun protection of nano-sized metal oxide particles over conventional metal oxide particles: an in vitro comparative study. *Int. J. Cosmet. Sci.* 36(3), 273-283.

Annexe 1:

Measurement, analysis and prediction of topical UV filter bioavailability



Measurement, analysis and prediction of topical UV filter bioavailability



L. Roussel^a, E. Gilbert^a, D. Salmon^a, C. Serre^a, B. Gabard^b, M. Haftek^a, H.I. Maibach^c, F. Pirot^{a,*}

^a Université Lyon 1, EA 4169 Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of the Skin Barrier Function, SFR Lyon-Est Santé, Lyon, France

^b Iderma, Dornacherstrasse 324, CH-4053 Basel, Switzerland

^c Department of Dermatology, Box 0989, University of California San Francisco, CA 94143-0989, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2014

Received in revised form 1 December 2014

Accepted 13 December 2014

Available online 16 December 2014

Keywords:

Chemical UV filters

Topical bioavailability

Dermatopharmacokinetics

Bioequivalence

ABSTRACT

The aim of the present study was to objectively quantify and predict bioavailability of three sunscreen agents (*i.e.*, benzophenone-3, 2-ethylhexylsalicylate, and 2 ethylhexyl-4-methoxycinnamate) in epidermis treated by petrolatum and emulsion-based formulations for 7 and 30 min on four human volunteers. Profiles of sunscreen agents through *stratum corneum* (SC), derived from the assessment of chemical amounts in SC layers collected by successive adhesive tape-stripping, were successfully fitted to Fick's second law of diffusion. Therefore, permeability coefficients of sunscreen agents were found lower with petrolatum than with emulsion based formulations confirming the crucial role of vehicle in topical delivery. Furthermore, the robustness of that methodology was confirmed by the linear relationship between the chemical absorption measured after 30 min and that predicted from the 7-min exposure experiment. Interestingly, in this dermatopharmacokinetic method, the deconvolution of permeability coefficients in their respective partition coefficients and absorption constants allowed a better understanding of vehicle effects upon topical bioavailability mechanisms and bioequivalence of skin products.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic solar ultra-violet (UV) radiations, while determinant in vitamin D and melanin synthesis, are undoubtedly involved in the genesis of skin cancers and premature skin aging. Although prophylactic sunlight exclusion is ultimate skin protection, chemical protection conferred by sunscreen agents was reported to reduce the incidence of squamous-cell carcinoma and actinic keratosis (Green et al., 1999) while preserving skin synthesis of vitamin D (Sollitto et al., 1997). Likely, sunscreen formulations are the cosmetic products in which the intrinsic efficacy would have the most extrinsic impact upon public health over next decades taking into account modern lifestyle, the increase of UV irradiation at Earth surface from ozone depletion.

The efficacy of sunscreens is usually determined by *in vivo* determination method of sun protection factor (SPF) (FDA, United States; Cosmetics Europe, European Union; AAN, Australia) where SPF value is defined as the UV energy required to produce a minimum erythema dose (MED), or redness, on protected skin divided by the UV energy required to produce an MED on unprotected skin (COLIPA, 1994; Food and Drug Administration, 2011). Furthermore, *in vitro* measurements of SPF based on UV transmittance analysis have been reported in earlier studies (Bendova et al., 2007; Springsteen et al., 1999).

The extent of sunscreen agent penetration into the *stratum corneum* (SC) is strongly dependent on vehicle properties and time of exposure. However, the correlation between sunscreen agent content into the SC and SPF measurements is still questioning since mineral based sunscreen agents exhibiting minimal penetration show high or very high SPF. Nevertheless, the characterization of topical bioavailability of UV filter based sunscreen agents (*i.e.*, lipophilic chemicals) is highly desired for safety reasons and to appraise the bioequivalence of these topical products. The techniques for the assessment of topical drug bioavailability *in vivo* are focused essentially on tape-stripping and microdialysis while

* Corresponding author at: Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, Plateforme FRIPHARM, Faculté de Pharmacie – 8, avenue Rockefeller, F-69373 Lyon cedex 08, France. Tel.: +33 4 78 77 71 67; fax: +33 4 78 77 28 60.

E-mail addresses: fabrice.pirot@univ-lyon1.fr, <http://www.fripharm.com> (F. Pirot).

skin biopsy, suction blister, follicle removal and confocal Raman spectroscopy techniques are less used (Herkenne et al., 2008). Tape-stripping seems well adapted technique to assess the bioavailability of UV filter in SC acting as penetration barrier, drug reservoir and target site. The simplicity of the tape-stripping procedure is, however, fully informative since (i) the successive SC thickness (x) removed and the total SC thickness (L) might be estimated gravimetrically or by protein assay, (ii) drug content collected onto adhesive might be quantified allowing to draw the profile of drug concentration through total or normalized (x/L) SC thickness. Additionally, the partition coefficient (K) and first-order rate constant (D/L^2) characterizing the extent and the rate of drug absorption through the SC are straightforwardly obtained from the fitting of drug profile to Fickian diffusion model, which might be usefully integrated to yield an area under the curve (AUC) giving the total concentration of drug in the SC. Furthermore, bioequivalence of topical products might be estimated from the comparison of AUC, K and D/L^2 parameters from diverse exposure scenarii.

In the present study, we characterized, by coupling tape-stripping and Fickian diffusion modelling, the topical bioavailability of three chemical UV filters (*i.e.*, oxybenzone or benzophenone-3, BP-3, 2-ethylhexylsalicylate or octylsalicylate, OS, and 2 ethylhexyl-4-methoxycinnamate or octyl-methoxycinnamate, OMC) carried in three formulations (two petrolatum jellies and an emulsion-gel) after short and then more prolonged exposures and, subsequently, the bioequivalence of these sunscreen topical products. The robustness of such technical and dermatopharmacokinetic approach was discussed from predicted and experimental assessment of UV filter topical bioavailability.

2. Materials and methods

2.1. Sunscreen products

Physico-chemical properties of the three chemical UV filters (*i.e.*, BP-3, OS and OMC) tested in this study and the composition of three sunscreen products applied on human volunteers, included a commercial Daylong[®] 15 formulation (*i.e.*, BP-3, OS and OMC loaded-liposomes in oil/water emulsion-gel, Galderma-Spirig, Egerkingen, Switzerland) and two laboratory-produced petrolatum jellies including BP-3, OS and OMC, are reported in Table 1. All sunscreen products respected the maximal concentrations authorized by the directive adopted by European Union (Cosmetic Directive 76/768/EEC, Annex VII. Part 1).

2.2. Human volunteers

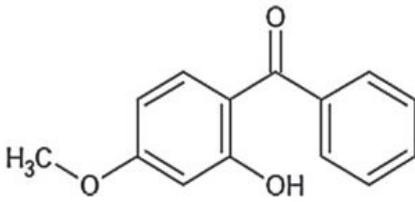
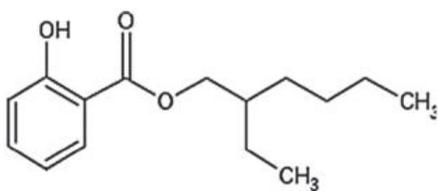
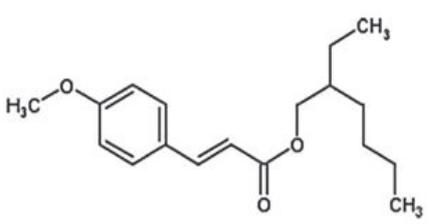
Four healthy volunteers (42–65 years old) presenting no history or clinical signs of atopic dermatitis or contact dermatitis were included in this study. Written informed consent was obtained from all volunteers.

2.3. Topical treatment protocol

Skin areas ($14 \times 2 \text{ cm}^2$) were delimited onto the back of each volunteer. Each sunscreen formulation was applied, under non occlusive conditions, using a pre-filled tuberculin syringe onto skin areas (3.57 mg/cm^2) for 7 min and 30 min. The dose applied was calculated weighing the syringe before and after application. A skin area was left untreated as control.

Table 1

Physico-chemical properties and concentrations of benzophenone-3 (BP-3), octylsalicylate (OS), octylmethoxycinnamate (OMC) in sunscreen formulations (Daylong[®] 15, E, Petrolatum jellies, P1 and P2) tested in the present study.

UV Filters	Chemical formula	MW (g mol ⁻¹)	log P ^a	Maximal absorption wavelength (nm)	Concentration		
					E	P1	P2
BP-3		228.24	3.64 ± 0.37	288–325	5.0% (0.22 M)	7.0% (0.31 M)	5.0% (0.22 M)
OS		250.33	5.77 ± 0.24	307	3.0% (0.12 M)	6.0% (0.24 M)	3.0% (0.12 M)
OMC		290.40	5.66 ± 0.25	311	7.5% (0.26 M)	10.0% (0.35 M)	7.5% (0.26 M)

^a log P: octanol/water partition coefficient determined by using Prolog P[®] software (ChemCad Obernai, France).

2.4. Tape-stripping (TS) procedure

After 7 min and 30 min of skin exposure, the excess of formulation was removed gently with cotton swabs and, then, SC was progressively removed by applying fifteen successive TS (12.5 × 1.6 cm, 3 M book tape 845; 3 M, St. Paul, MN, USA). The adhesive tape was pressed onto the skin using a metallic bar to stretch the skin surface in order to minimize the influence of furrows and wrinkles under the TS procedure (Lademann et al., 2009). That procedure was similar throughout the study in order to reduce experimental variation.

The mass of SC on each tape was determined using a microbalance (Mettler-Toledo, Columbus, OH). By measuring transepidermal water loss (TEWL) with an evaporimeter (Tewameter TM 210, Courage et Khazaka, Electronic GmbH, Köln, Germany) before and after the fifth, tenth and fifteenth tapes, the SC thickness on each treated and untreated areas was determined as described above. The time necessary for tape-stripping (fifteen tapes) and concomitant TEWL measurements was about 5 min.

2.5. SC thickness removed (x) by TS and SC thickness (L) determination

The SC thickness (x) removed by TS was determined from the mass (m) of cellular materials attached to well-defined surface (A) of each TS taking into account the density (ρ) of SC is $\sim 1 \text{ g/cm}^3$ as followed (Anderson and Cassidy, 1973):

$$x = \frac{m}{A \times \rho} \quad (1)$$

Therefore, successive TS were followed by TEWL measurements. A linear relationship between $1/\text{TEWL}$ and SC thickness removed by TS (x) was reported earlier as followed (Kalia et al., 1996; Pirot et al., 1997):

$$(\text{TEWL})_x^{-1} = \frac{L}{\gamma \times D\gamma \times D} x \quad (2)$$

where γ is the viable SC – viable tissue partition coefficient of water multiplied by the water concentration difference across the membrane, and D , the diffusion coefficient of water in the SC. The intercept of the curve on the x -axis equals the SC thickness (L).

In previous report, similar procedure was used to determine the SC thickness after application of ibuprofen solution under occlusive polyester film (Scotchpak, 3 M, St. Paul, MN), affixed to the skin with adhesive polyurethane (Herkenne et al., 2007).

2.6. High performance liquid chromatography (HPLC) assay

A surface of 1 cm × 1 cm was cut on each tape. Strips 1–3, 4–6, 7–10 and 11–15 were pooled separately, then powdered in a steel ball grinder mill (Retsch, D-Haan) working under liquid nitrogen and finally extracted with 2 × 2 ml of methanol (Clarys et al., 2001).

Therefore, UV filter content in methanol solutions was determined using HPLC analysis (Thermo Finnigan, USA). Briefly, methanol solutions (10 μl) were injected in HPLC system composed of liquid mobile phase (methanol/water/acetic acid; 83/17/0.01, v/v/v) flowing at 0.4 ml/min through a 250 × 4 mm Nucleosil C18, HD, 3 μm column (Macherey & Nagel, Oensingen, Switzerland). The detection of UV filter was made by a diode-array detector (UV-6000, Thermo Finnigan, USA) settled at 288 nm. UV filter concentrations were determined from standard curves of pure compounds in methanolic solution. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were $\sim 0.01 \mu\text{g/ml}$ and $0.1 \mu\text{g/ml}$, respectively for the three UV filters.

2.7. Concentration profiles of UV filters into SC

Amounts of UV filters (i.e., $\sim \mu\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) recovered in the collected tapes 1–3, 4–6, 7–10 and 11–15 were re-expressed as the amount divided by the thickness (cm) of SC removed given UV filter concentration in pooled TS ($\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-3}$). Thus, UV filter concentration profiles through the SC were plotted as the molar concentration of compounds within the SC as a function of its relative depth (x/L) into the barrier, in order to facilitate intra- and inter-individual comparisons. After *in vivo* exposure of human skin to sunscreen products for 7 min, the chemical analysis of the sequentially tape-stripped SC yielded values of $C(x)$ as a function of position x/L .

Considering that the transport through the SC generally follows Fickian diffusion through a simple, homogeneous membrane (Scheuplein, 1967), thus, under the boundary conditions of the experiments performed:

(i) Dose of the drug applied is infinite, C_{veh} remains thus constant throughout the application time (t).

(ii) SC initially contains no drug at $t=0$.

(iii) Viable epidermis respect sink condition for the active ingredient. $C(x)=0$ at $x=L$ for $t \geq 0$.

The 7-min and 30-min profiles of concentration were fitted to a mathematical solution of Fick's second law in order to determine dermato-pharmacokinetic (DPK) parameters of UV filters, K and D/L^2 , as followed (Crank, 1975).

$$C(x) = KC_{\text{veh}} \left(1 - \frac{x}{L}\right) - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{KC_{\text{veh}}}{n} \sin\left(\frac{n\pi x}{L}\right) \exp\left(-\frac{D}{L^2} n^2 \pi^2 t\right) \quad (3)$$

where C_{veh} is the permeant's concentration in the vehicle, K is the partition coefficient of the chemical between the SC surface and the vehicle. L and D are the diffusion pathlength and the coefficient of diffusion of the chemical across the SC, respectively.

The validity of Eq. (3) also assumes that (i) all transport of chemical substance across the SC takes place by passive diffusion, (ii) the vehicle in which the chemical is presented to the SC does not modify the membrane or act as a carrier for the compound, and (iii) that no others skin layers contribute to the total barrier. The permeability parameters (K and D/L^2) were determined by non-linear regression using Kaleidagraph software[®] (Synergy Software, Reading, PA, USA). Permeability coefficient, K_p , was calculated as reported earlier as followed (Anissimov et al., 2013):

$$K_p (\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}) = L \times K \times \frac{D}{L^2} \quad (4)$$

where $K, D/L^2$ and L were obtained from Eqs. (2) and (3).

2.8. Chemical absorption into SC

Furthermore, chemical absorption into the SC after 7-min and 30-min exposure was calculated from area under the curve (AUC) (M) of chemical concentration as function of x/L . Predicted chemical absorption at 30 min derived from permeability parameters determined after 7-min exposure was compared to experimental chemical absorption after 30-min exposure.

2.9. Statistical analysis

Experimental and predicted chemical absorptions into the SC were compared by using Mann–Whitney–Wilcoxon test. The influence of formulations upon the permeability of chemicals was tested by comparing permeability coefficients using Mann–Whitney–Wilcoxon test. The level of significance chosen was $p < 0.05$.

3. Results and discussion

In the present study, bioavailability of sunscreen agents was assessed on human volunteers by using TS procedure and subsequent analysis of SC chemical content. Therefore, the profiles of chemical concentration were successfully fitted to Fickian model of diffusion giving the permeability parameters of sunscreen agents through the SC treated with various formulations.

3.1. Application of Fickian diffusion model to characterize sunscreen agent penetration into SC

TS is a convenient method to assess the chemical content in SC regions. As earlier reported, the amount of SC removed by TS is not linearly proportional to the number of tapes removed (Pinkus, 1951). Furthermore, operating mode (Bashir et al., 2001; Tsai et al., 1991), skin hydration, cohesion between cells (which increases with SC's depth), body site and inter-individual differences (Marttin et al., 1996) were reported as factors affecting the relevance of TS in topical drug bioavailability studies. Finally, the quantification of SC (e.g., by gravimetric measurements or protein assays) onto TS is still subject of controversial debates.

In the present study, SC amount was quantified onto TS by gravimetric approach while concomitant TEWL measurements allowed to determine total SC thickness from the relationship between $1/TEWL$ and SC thickness recovered by TS (Fig. 1). The estimation of total SC thickness of treated zones in human volunteers is reported in Table 2. Large intra- (35%) and inter-individual (35%) variations were noted confirming the necessity to determine SC thickness instead of basic SC surface in topical drug bioavailability studies. Occlusive effect, induced potentially by formulation, would have for consequence a built-up of water in SC thickness, which should reduce the gradient for water from the inner to the upper part of SC. Finally, a rupture of the gradient of water concentration would not allow to apply the Fickian model of diffusion used for SC determination. The regression coefficient of $1/TEWL$ and SC thickness removed was ranged between 0.950 and 0.999, confirming that SC determination was not interfering by formulation effect.

From the accurate estimation of SC thickness, the chemical concentration at normalized position within the SC might be expressed, reducing the operating and inter-individual variations. The profile of chemical concentration through normalized SC thickness was established without discarding first TS as recommended by FDA guidelines (Shah, 1998), considering that (i) excess

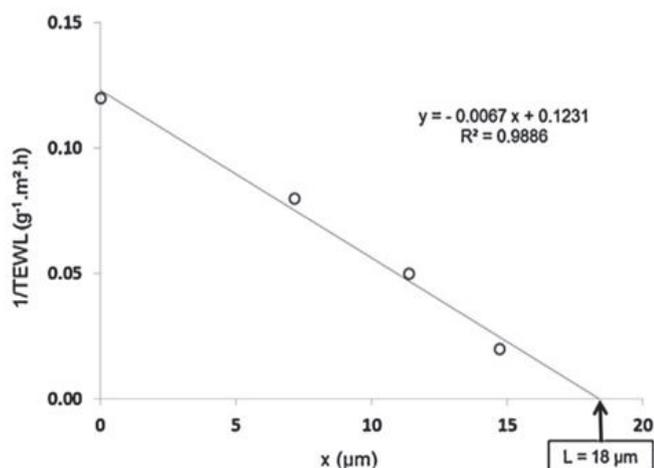


Fig. 1. Typical linear relation between $1/TEWL$ and SC thickness removed by TS following 7-min exposure to petrolatum based formulation. SC thickness (L) is equal to the intercept of the curve on the x -axis.

Table 2

Determination of stratum corneum thickness (L) in untreated skin area and after topical application of sunscreen formulations (Daylong[®]15, E, Petrolatum jellies, P1 and P2) for 7 min and 30 min in four volunteers, as earlier reported (Pirrot et al., 1997). SD: standard deviation. The regression coefficient of $1/TEWL$ and SC thickness removed was ranged between 0.950 and 0.999.

Volunteers	L (μm)						Control
	7 min			30 min			
	E	P1	P2	E	P1	P2	
#1	25	17	18	17	28	23	21
#2	25	17	15	17	21	18	10
#3	32	31	9	38	33	25	13
#4	5	12	8	4	11	4	21
Mean \pm SD	22 \pm 12	19 \pm 8	13 \pm 5	19 \pm 14	23 \pm 10	18 \pm 9	16 \pm 6

of formulation was efficiently removed by cotton swabs, and (ii) adsorbed chemical onto SC surface (i.e., unabsorbed in the first SC layer) might potentially diffuse into underlying SC layers (N'Dri-Stempfer et al., 2009). Therefore, Fickian model of diffusion was used to characterize the profile of chemicals through the SC and to estimate the permeability parameters (i.e., K and D/L^2) of sunscreen agents with regard to formulations (Table 3). No significant difference of D/L^2 (i.e., first-order rate constant for drug transport through the SC) was reported whatever the sunscreen based formulations tested in this study. Although, no significant difference was shown for K values, likely due to small number of volunteers, higher partition of chemicals between SC and emulsion based vehicle was evidenced as compared to petrolatum formulations, confirming the crucial role of physico-chemical properties of vehicle for the topical delivery of lipophilic compounds. This assumption was confirmed by the comparison of permeability coefficients of UV filters (Eq. (4), Fig. 2) showing higher values for emulsion as compared to petrolatum formulations. In a previous study, Treffel and Gabard reported likewise higher UV filter penetration in SC treated with emulsion as compared to petrolatum formulations, likely due to solubilizing properties of surfactants contained in emulsion toward SC lipids (Treffel and Gabard, 1996).

Interestingly, the effects of excipients used in formulations might be explained from the absorption parameters. Emulsion vehicle acted as chemical penetration enhancer by favoring partition of UV filters into SC, as reported in Table 3, although petrolatum reduced drastically sunscreen agent partition leading to a lower permeability coefficient (Fig. 2). Generally, petrolatum is known to induce occlusive effect, which could raise the diffusion of hydrophilic compounds through the SC and thus their permeation (Flesch, 1963). Due to the high lipophilicity of BP-3, OS and OMC, the promoting effect of occlusion induced by petrolatum did not impact UV filter diffusion. Additionally, OMC, exhibiting higher molecular weight and the smallest partition coefficient (K) values, whatever the vehicles considered, showed the smallest permeability coefficients as compared to BP-3 and OS.

Numerous studies mentioned toxic effects of BP-3 especially by generating reactive oxygen species (ROS) into human living epidermis keratinocytes (Gilbert et al., 2013; Hanson et al., 2006). Furthermore, BP-3 was detected into volunteer urine and breast milk after sunscreen application (Hany and Nagel, 1995; Janjua et al., 2008; Walters and Roberts, 2002). Besides, allergic reactions and toxic effects of OS (Bruynzeel, 2001; Morohoshi et al., 2005) and OMC (Hanson et al., 2006; Treffel and Gabard, 1996) were reported. Consequently, a restriction of UV filter permeability into living epidermis is highly recommended and might be obtained by varying the physico-chemical properties of vehicles.

Table 3
Absorption parameters of benzophenone-3 (BP-3), octylsalicylate (OS) and octylmethoxycinnamate (OMC) in human SC ($n = 4$ volunteers) following 7-min exposure to three sunscreen products (E, P1 and P2) *in vivo*. Those parameters were calculated from the fit of a mathematical solution of Fick's second law (Eq. (3)) to the 7-min *in vivo* data. Each data is the mean \pm SD of four experimental determinations.

Formulation	Volunteers	$10^{-5} D/L^2$ (s^{-1}) ^a			K^b		
		BP-3	OS	OMC	BP-3	OS	OMC
E	#1	3.58	4.28	3.59	18.83	20.25	5.26
	#2	3.34	3.62	2.34	8.27	9.75	1.97
	#3	6.99	14.90	11.51	1.69	1.25	0.31
	#4	3.45	3.47	1.95	25.47	32.75	13.46
	Mean \pm SD	4.34 ± 1.77	6.57 ± 5.57	4.85 ± 4.50	13.60 ± 10.60	16.00 ± 13.60	5.25 ± 5.85
P1	#1	10.02	13.50	9.78	1.30	1.00	0.67
	#2	5.33	5.05	4.19	0.78	0.88	0.29
	#3	4.17	4.17	4.26	1.79	2.50	1.04
	#4	6.62	1.87	6.99	2.12	4.42	0.93
	Mean \pm SD	6.54 ± 2.53	6.15 ± 5.08	6.31 ± 2.66	1.50 ± 0.58	2.20 ± 1.65	0.73 ± 0.33
P2	#1	16.84	11.01	6.32	0.91	1.33	0.31
	#2	3.27	2.73	2.41	3.58	5.25	1.24
	#3	8.58	9.35	4.02	2.80	3.58	1.28
	#4	2.96	2.92	1.47	9.19	13.17	4.52
	Mean \pm SD	7.91 ± 6.49	6.50 ± 4.30	3.55 ± 2.12	4.12 ± 3.56	5.83 ± 5.15	1.84 ± 1.85

Any significant difference of D/L^2 and K parameters was reported between formulations ($p > 0.05$; Mann–Whitney–Wilcoxon test).

^a Ratio of the diffusion coefficient (D) of the chemical to the diffusion pathlength (L) squared.

^b K is the partition coefficient of the chemical between the vehicle and the *stratum corneum*.

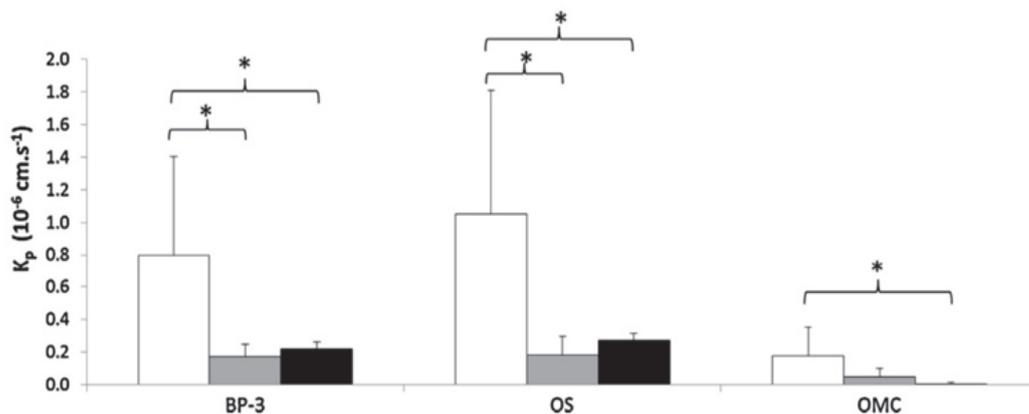


Fig. 2. Comparison between permeability coefficient (K_p) of three UV filters in SC treated with three sunscreen products calculated from Eq. (4) with data obtained from concentration profiles at 7-min.

Values are expressed as mean \pm SD of four experimental data.

*: $p < 0.05$ (Mann–Whitney–Wilcoxon test).

White columns: Emulsion formulation; light gray columns: P1 formulation; black columns: P2 formulation.

3.2. Application of Fickian diffusion model to predict sunscreen agent penetration into SC

K and D/L^2 determined from 7-min experiment were used to predict UV filter concentration profiles into the SC after 30-min exposure (Fig. 3). Therefore, straightforward estimation of UV filter concentration within the SC was made from experimental (7 min and 30 min) and predicted AUC (Table 4). Clearly, UV filter concentrations (BP-3, OS, OMC) in SC treated with P2 formulation were found significantly lower than those determined with emulsion treatment confirming the major role of formulation upon SC delivery of compounds. Furthermore, no significant difference ($p > 0.05$) was shown between predicted and experimental UV concentrations within SC confirming the relevance of Fickian based prediction. A significant relationship was established between predicted and experimental UV filter concentrations treated by petrolatum and emulsion formulations. However, the accuracy of the prediction estimated by the slope of the regression curve showing an overestimation for highly lipophilic UV filters (OS and OMC, $\log P$: 5.77 and 5.66, respectively)

as compared to quasi-exact prediction for BP-3 ($\log P$: 3.64). The slope of the regression curves of OS and OMC has been considered to be over the range between 0.80 and 1.25, which is considered to be the acceptable range for bioequivalence criteria. In similar approaches, a good correlation between predicted and experimental cutaneous bioavailability was reported for ibuprofen and terbinafine exhibiting comparable lipophilicity ($\log P$: 3.97 and 3.3, respectively) to BP-3 (Alberti et al., 2001; Herkenne et al., 2007).

The method is not claimed to have an accurate estimation of the UV filter concentration as a function of time exposure (no toxicological interest) but the method seems very adequate for the screening of different formulations. It is worth noting that the emulsion induced an increase by 6–10 of the concentration of UV filter as compared to petrolatum which is therefore much more important than the over estimation of the predicted data.

A key-point of this DPK method was dependent on time to carry out TS and to record the changes in TEWL values, which were estimated in the present study at 5 min. The impact of this delay did not modify significantly the accuracy of characterization and prediction of UV filter cutaneous bioavailability (data not shown).

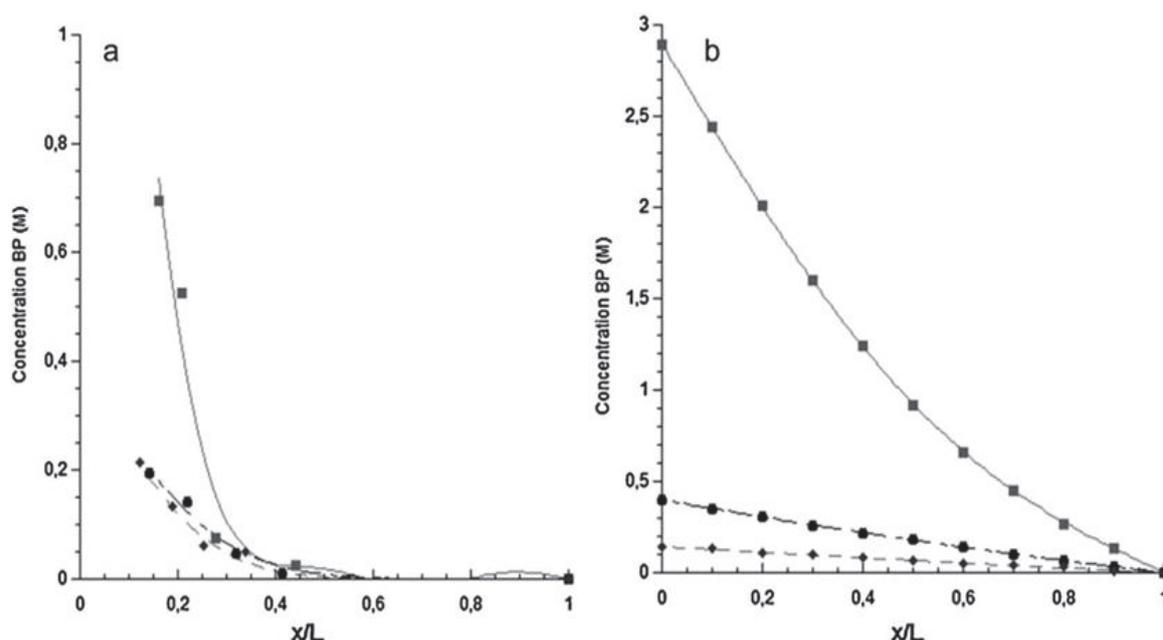


Fig. 3. Experimental (a) and predicted (b) concentration profiles of BP-3 through SC treated by (■) 3.5% BP-3 emulsion, (●) 7% BP-3 petrolatum P1 and (◆) 3.5% BP-3 petrolatum P2 for 30 min. Predicted profile was established from absorption parameters (i.e., K and D/L^2) determined from fitted experimental data obtained after 7-min exposure to Fickian diffusion model (see Section 2.8 into the text).

Table 4

Comparison between experimental and predicted UV filter concentrations (M) in SC following 30-min exposure *in vivo* calculated from the area under the curve AUC of the UV filter concentration profile. Predicted curve was obtained with the fit of a mathematical solution of Fick's second law (Eq. (3)) from experimental data obtained after 7-min exposure (see Section 2.8 into the text). Each data is the mean \pm SD of four experimental determinations.

Formulation	Concentration (M)					
	BP-3 ^{1,2,a}		OS ^{1,2,b}		OMC ^{1,2,c}	
	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted	Experimental	Predicted
E	0.65 \pm 0.77	0.81 \pm 0.63	1.41 \pm 2.24	0.76 \pm 0.63	0.49 \pm 0.75	0.49 \pm 0.52
P1	0.09 \pm 0.05	0.20 \pm 0.07	0.08 \pm 0.04	0.20 \pm 0.13	0.05 \pm 0.03	0.11 \pm 0.05
P2	0.05 \pm 0.03 [*]	0.16 \pm 0.08	0.06 \pm 0.03 [*]	0.17 \pm 0.08	0.02 \pm 0.01 [†]	0.09 \pm 0.05

^{*} Significantly different from emulsion group ($p < 0.05$; Mann–Whitney–Wilcoxon test).

[†] No significant difference between experimental and predicted concentrations into SC ($p > 0.05$; Mann–Whitney–Wilcoxon test).

² Significant linear relationship between predicted (y) and experimental (x) concentrations into SC ($n = 12$, 4 experimental and predicted data point per formulation):

^a $y = 0.92x - 0.09$, $R = 0.847$, $p < 0.01$.

^b $y = 2.61x - 0.49$, $R = 0.849$, $p < 0.01$.

^c $y = 1.27x - 0.11$, $R = 0.940$, $p < 0.001$.

Further studies will be necessary (i) to correlate UV filter concentration into the SC with effective UV protection after several skin exposure scenarios and skin toxicity, and (ii) to determine the interval of topical application insuring proper sunscreen activity.

4. Conclusion

In the present study, we used Fickian model to characterize and predict cutaneous bioavailability of UV filters from different formulations. Partition of UV filters into SC, greatly dependent on vehicle used, was believed to be the key point conditioning further SC permeability. This approach was enough accurate to establish the cosmetic equivalence of different formulations and topical bioavailability mechanisms.

References

- Alberti, I., Kalia, Y.N., Naik, A., Guy, R.H., 2001. Assessment and prediction of the cutaneous bioavailability of topical terbinafine, *in vivo*, in man. *Pharm. Res.* 18, 1472–1475.
- Anderson, R.L., Cassidy, J.M., 1973. Variation in physical dimensions and chemical composition of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 61, 30–32.
- Anissimov, Y.G., Jepps, O.G., Dancik, Y., Roberts, M.S., 2013. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 169–190.
- Bashir, S.J., Chew, A.L., Anigbogu, A., Dreher, F., Maibach, H.I., 2001. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res. Technol.* 7, 40–48.
- Bendova, H., Akrman, J., Krejci, A., Kubac, L., Jirova, D., Kejllova, K., Kolarova, H., Brabec, M., Maly, M., 2007. *In vitro* approaches to evaluation of sun protection factor. *Toxicol. In Vitro* 21, 1268–1275.
- Bruynzeel, D., 2001. Fisher's contact dermatitis. In: Rietschel, R.L., Fowler, J. (Eds.), *Patch Testing in Adverse Drug Reactions*. Springer, Philadelphia, pp. 479–494.
- COLIPA, 1994. *Sun Protection Factor Method*. European Cosmetic Toiletry, and Perfumery Association, Brussels.
- Clarys, P., Gabard, B., Lambrecht, R., Barel, A., Bieli, E., Ludi, S., 2001. There is no influence of a temperature rise on *in vivo* adsorption of UV filters into the stratum corneum. *J. Dermatol. Sci.* 27, 77–81.
- Crank, J., 1975. *Diffusion in a Plane Sheet*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, England.
- Flesch, P., 1963. Chemical basis of emollient function in horny layers. *Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assoc.* 40, 1–7.
- Food and Drug Administration, Department of Health and Human services, 2011. *Labeling and effectiveness testing; sunscreen drug products for over-the-counter human use. Final rule. Federal Register* 76, pp. 35620–35665.
- Gilbert, E., Pirot, F., Bertholle, V., Roussel, L., Falson, F., Padois, K., 2013. Commonly used UV filter toxicity on biological functions: review of last decade studies. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 208–219.
- Green, A., Williams, G., Neale, R., Hart, V., Leslie, D., Parsons, P., Marks, G.C., Gaffney, P., Battistutta, D., Frost, C., Lang, C., Russell, A., 1999. Daily sunscreen application

- and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: a randomised controlled trial. *Lancet* 354, 723–729.
- Hanson, K.M., Grattan, E., Bardeen, C.J., 2006. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic. Bio. Med.* 41, 1205–1212.
- Hany, J., Nagel, R., 1995. Detection of sunscreen agents in human breast-milk. *Deut. Lebensm-Rundsch.* 91, 341–345.
- Herkenne, C., Naik, A., Kalia, Y.N., Hadgraft, J., Guy, R.H., 2007. Dermatopharmacokinetic prediction of topical drug bioavailability *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* 127, 887–894.
- Herkenne, C., Alberti, I., Naik, A., Kalia, Y.N., Mathy, F.X., Preat, V., Guy, R.H., 2008. *In vivo* methods for the assessment of topical drug bioavailability. *Pharm. Res.* 25, 87–103.
- Janjua, N.R., Kongshoj, B., Andersson, A.M., Wulf, H.C., 2008. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *J. Eur. Acad. Dermatol.* 22, 456–461.
- Kalia, Y.N., Pirot, F., Guy, R.H., 1996. Homogeneous transport in a heterogeneous membrane: water diffusion across human stratum corneum *in vivo*. *Biophys. J.* 71, 2692–2700.
- Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H.J., Fluhr, J.W., 2009. The tape stripping procedure – evaluation of some critical parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 317–323.
- Martin, E., NeelissenSubnel, M.T.A., DeHaan, F.H.N., Bodde, H.E., 1996. A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping. *Skin Pharmacol.* 9, 69–77.
- Morohoshi, K., Yamamoto, H., Kamata, R., Shiraishi, F., Koda, T., Morita, M., 2005. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by *in vitro* assays. *Toxicol. In Vitro* 19, 457–469.
- N'Dri-Stempfer, B., Navidi, W.C., Guy, R.H., Bunge, A.L., 2009. Improved bioequivalence assessment of topical dermatological drug products using dermatopharmacokinetics. *Pharm. Res.* 26, 316–328.
- Pinkus, H., 1951. Examination of the epidermis by the strip method of removing horny layers. 1. Observations on thickness of the horny layer, and on mitotic activity after stripping. *J. Invest. Dermatol.* 16, 383–386.
- Pirot, F., Kalia, Y.N., Stinchcomb, A.L., Keating, G., Bunge, A., Guy, R.H., 1997. Characterization of the permeability barrier of human skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1562–1567.
- Scheuplein, R.J., 1967. Mechanism of percutaneous absorption. 2. Transient diffusion and relative importance of various routes of skin penetration. *J. Invest. Dermatol.* 48, 79–88.
- Shah, V.P., 1998. Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs, *in vivo* Bioavailability, Bioequivalence, *in vitro* Release, and Associated Studies. US Department of Health and Human Services, Rockville, pp. 1–19.
- Sollitto, R.B., Kraemer, K.H., DiGiovanna, J.J., 1997. Normal vitamin D levels can be maintained despite rigorous photoprotection: six years' experience with xeroderma pigmentosum. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37, 942–947.
- Springsteen, A., Yurek, R., Frazier, M., Carr, K.F., 1999. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal. Chim. Acta* 380, 155–164.
- Treffel, P., Gabard, B., 1996. Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles. *Pharm. Res.* 13, 770–774.
- Tsai, J.C., Weiner, N.D., Flynn, G.L., Ferry, J., 1991. Properties of adhesive tapes used for stratum-corneum stripping. *Int. J. Pharm.* 72, 227–231.
- Walters, K.A., Roberts, M.S., 2002. Percutaneous absorption of sunscreens. In: Bronaugh, R.L., Maibach, H.I. (Eds.), *Topical Absorption of Dermatological Products*. Marcel Dekker, New York, pp. 465–481.

Annexe 2:

**New easy handling and sampling device for
bioavailability screening of topical formulations**

Damien SALMON^{1,2}
 Elodie GILBERT¹
 Bruna GIOIA²
 Marek HAFTEK¹
 Christine PIVOT²
 Bernard VERRIER³
 Fabrice PIROT^{1,2}

¹ EA 4169 : Aspect fondamentaux, cliniques et thérapeutiques de la fonction barrière cutanée, Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, Plateforme FRIPHARM, Faculté de Pharmacie, SFR Lyon-Est Santé, Université Claude Bernard Lyon 1, 8, avenue Rockefeller; 69373 Lyon cedex 08, France
www.fripharm.com

² Unité de préparation et contrôle des médicaments, Service Pharmaceutique, Plateforme FRIPHARM, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, 5, Place d'Arsonval ; 69437 Lyon cedex 03, France

³ UMR 5305 : Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, CNRS/Université Claude Bernard Lyon 1, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, 7, Passage du Vercors ; 69367 Lyon Cedex 07, France

Reprints: D. Salmon
damien.salmon01@chu-lyon.fr

New easy handling and sampling device for bioavailability screening of topical formulations

Biopharmaceutical assessment of topical drug formulations is widely carried out by using vertical diffusion cells (Franz type cell). Although Franz diffusion cell model is well designed for percutaneous absorption studies, the extent of drug penetration within the skin requires more adapted device. Recently, we have developed a new patented versatile, easy-to-use, and disposable diffusion cell called VitroPharma. In this study we have assessed the cutaneous bioavailability of caffeine as hydrophilic compound model using Franz diffusion cell and VitroPharma. The percutaneous absorption of caffeine assessed with Franz diffusion cell and VitroPharma was characterized by using (i) finite dose model and (ii) classical pharmacokinetic analysis. Furthermore, the follow-up of caffeine penetration within the skin was determined by sequential measurements of tissular drug concentration throughout the time of skin exposure with VitroPharma. However, classical experimental design using Franz diffusion cell involved unique determination of tissular concentration at the final point of skin exposure protocol. Finally, device equivalence between Franz diffusion cell and VitroPharma was claimed from percutaneous absorption data analysis. Concomitant assessment of dual penetration and permeation kinetics by using VitroPharma reinforced the understanding of skin drug delivery.

Key words: caffeine, Franz diffusion cell, permeability assay, porcine skin, VitroPharma

Epithelia are biological membranes at the interface between the environment and the internal body. They have widely diversified throughout evolution to support many biological functions such as (i) gas and nutriment absorption (ii) body protection against external threat (iii) secretion and (iv) water homeostasis. The study of interactions between chemical compounds and epithelia is the object of biopharmacy that is to consider physiologic characteristics of epithelia together with physico-chemical characteristics of medicines in order to regulate the absorption of a compound within the body and allow a therapeutic concentration thereof to reach its target site [1-3]. A wide range of applications exist for biopharmaceutical studies, notably in drug development, such as (i) novel drug screening (ii) drug candidate characterization, (iii) medicine formulation, (iv) clinical trial authorization application [4] and (v) drug marketing authorization application. Furthermore, biopharmaceutical studies enable toxicological assessment of broad exposure to chemical compounds [5, 6]. Each epithelia considering its physical, chemical and biological properties, constitutes a potential route of administration. During the preclinical phase of drug development, various types of studies can be designed, including *in vitro* and *in vivo* assays. Preclinical animal *in vivo* assays give information about drug behavior in complete metabolic

conditions and may then be extrapolated to human administration. However, *in vivo* assays implicate complex and expensive experimental procedures. Furthermore, legislation tends to limit, if not abolish, animal experimentation for ethical reasons [7]. Oppositely, upstream the drug development process, *in vitro* assays enable early low cost and high throughput evaluation of compounds permeability through biological structures [8, 9].

In between, *ex vivo* assays using human or animal epithelial explants are useful to obtain physiologically relevant data with few ethical considerations and at relatively low cost. In such assays, experimental devices called diffusion cells are used to expose an epithelium explant to a drug product and study their interactions, especially (i) the penetration of the compound inside the epithelium and (ii) its permeation through the epithelium.

A diffusion cell consists in (i) a donor compartment filled with the studied product, (ii) a receptor compartment containing a receptor fluid, separated (iii) by the epithelial explant. Both compartments need to be sealed hermetically throughout the assay time (e.g., 24 hours) during which the whole cell is maintained at physiological temperature. The apparition of the drug product is monitored over time from the donor product, through the epithelial explants inside the receptor fluid. Depending on experimental conditions (i.e., finite or infinite dose) results can be either (i)

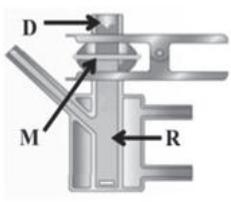
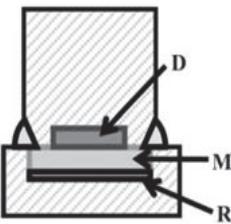
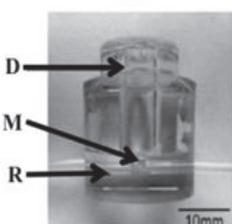
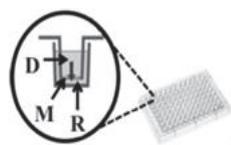
	Franz cell	Saarbrücken model	Mah's micro diffusion cell	Transwell® device
Structure				
Receptor	9 mL	Solid	Flow through	Depends on multiple well plate dimensions (from 6 to 96 wells)
Donor	3 mL Possible occlusion	Systematic occlusion	283 µL	Depends on multiple well plate dimensions (from 6 to 96 wells)
Membrane	0.76 cm ² From full thickness skin to ultrathin artificial membranes	Full thickness and dermatomed skin	0.283 cm ² Used with rat skin	Cell mono layer Artificial membrane Reconstructed tissue
Sealing system	Metallic clamp	Punch + polymeric joint	Sliding system	<i>Not applicable</i>
Advantages	Worldwide recognition	Penetration data	Small amount of product required	Available to automation Serial industrial production Possibility of single use
Drawbacks	Handcraft fabrication Cost Complex handling Fragility (glass made)	No permeation data Systematic occlusion	Few data available Only on rat skin yet	Not for <i>ex vivo</i> studies (PAMPA, Cell mono layer) Non keratinized epidermis (Episkin®)

Figure 1. Comparison of structural parameters of various existing diffusion cells displaying advantages and drawbacks (D: donor compartment, M: membrane, R: receptor compartment).

directly extrapolated to human administration or (ii) fitted to a mathematical model to obtain drug product permeability characteristics, respectively [10].

Worldwide harmonized experimental protocols for skin permeability studies are proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development [10]. Moreover, the European Union Reference Laboratory for Alternative to Animal Testing (EURL ECVAM) is meant to develop, validate and valorize alternative *in vitro* methods [7]. Therefore, a great scientific and regulatory interest exists for *ex vivo* permeability studies, although they are not yet sufficient by their own to secure human exposure downstream. In this context, optimization of experimental setup is required to expand the scope of *in vitro* / *ex vivo* permeability assays. Furthermore, in the future, the development of biomedicines and the complexity of formulations will require extensive characterization and optimization of permeability mechanisms to ensure quality, security and efficiency of new drug products [11].

Various different types of diffusion cells have been proposed with different applications (figure 1) [8, 9, 12, 13]. Franz diffusion cells are OECD compliant and widely used in permeability assays worldwide. However, literature describes yet unsolved drawbacks related to Franz diffusion cell use [14] among which, (i) the formation of bubbles at the membrane-receptor fluid interface due to degassing of receptor solution upon heating and (ii) the overhydration of *ex vivo* explants which may modify compounds partition coefficient of drug and the relevance of penetration data. In this context, the development and validation of a versatile, robust and readily accessible diffusion cell

for extensive *ex vivo* permeability studies is required. To overcome difficulties identified using Franz diffusion cells, we have developed an innovating patented diffusion cell called VitroPharma designed for dual drug penetration and permeation studies (figure 2) [15].

In this study, the percutaneous absorption of caffeine through porcine skin treated by a finite dose of commercial topical formulation was studied by using Franz diffusion cell and VitroPharma according to OECD Guideline n°428 [10]. Additionally, lateral and vertical penetration of caffeine into skin was assessed and discussed. Finally, device equivalence was discussed based on permeability and pharmacokinetic parameters.

Materials and methods

Caffeine and caffeine based formulation

Caffeine and commercial 5% (m/m) caffeine based hydroalcoholic gel were provided by Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA) and Pierre Fabre Medicament (Percutafeine® 5%, Boulogne, France), respectively. The physico-chemical properties of caffeine and composition of Percutafeine® 5% are reported in figure 3.

Franz diffusion cell and VitroPharma

Franz glass diffusion cells were provided by Verrierie Villeurbannaise (Villeurbanne, France). VitroPharma

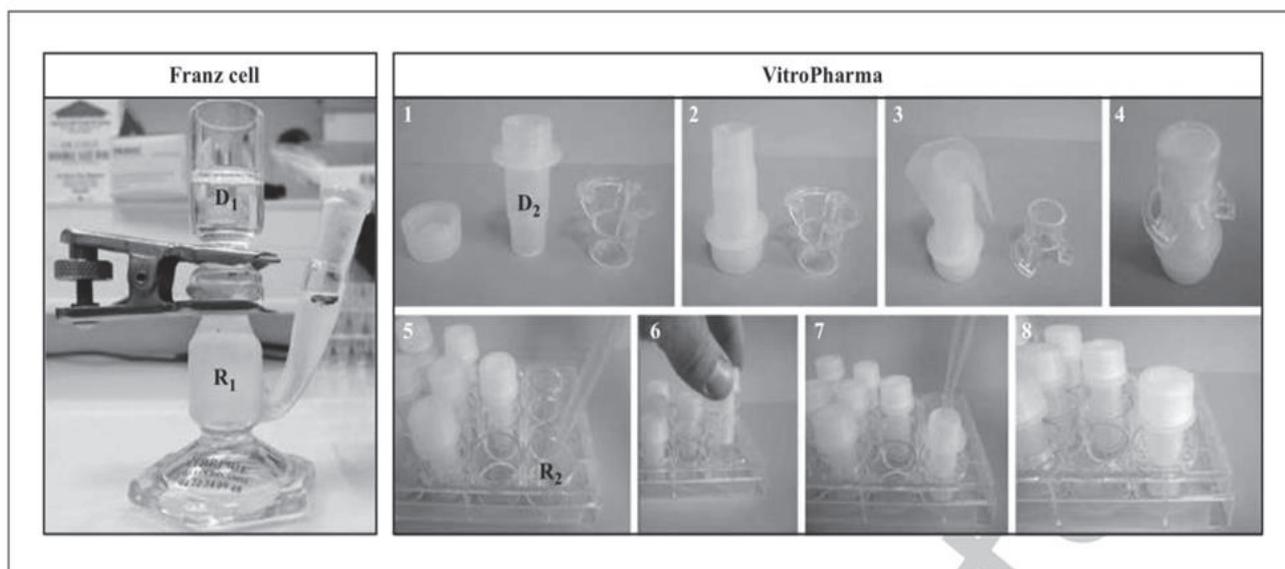


Figure 2. Photography of Franz diffusion cell displaying donor (D_1) and receptor (R_1) compartments and photographic operating mode for VitroPharma: (1) Presentation of the device including donor compartment (D_2) with its screwable cap and sealing system. (2) Empty donor compartment is turned head down. (3) Membrane (e.g., silicone membrane) is deposited onto donor compartment. (4) Sealing system is hermetically applied by simple pressure. (5) Receptor fluid is poured in multiple well plate receptor compartment (R_2). (6) Donor and membrane assemblage is positioned on receptor compartment. (7) Donor fluid is poured in donor compartment at $t = 0$. (8) Permeability assay takes place under controlled temperature conditions.

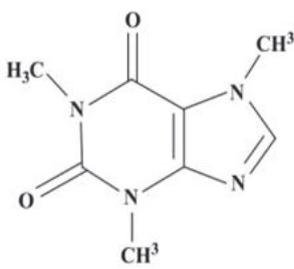
	Caffeine ^{1,2}	Percutafeine [®] 5%
	Melting point: 238 °C Molecular weight: 194.2 g/mol Log P: - 0.07 Water solubility (25°C): 16mg/mL Ethanol solubility (25°C): 15.15mg/mL	Caffeine (5%) Carbomer Triethanolamine Cethyl He (PEG-7 Glycerol Cocoate) Ethanol 96% Purified water

Figure 3. Physico-chemical properties of caffeine and qualitative composition of caffeine based hydroalcoholic gel (Percutafeine[®] 5%).

Source: ¹: Sigma-Aldrich product information sheet; ²: www DrugBank.ca

polypropylene prototype was designed by plastic specialist (Maire SA Oyonnax, France) accordingly to VitroPharma patent [15]. VitroPharma is based on a multiple well plate exhibiting standardized dimensions. Patent claims include (i) description of sealing system operating by sliding (ii) design of donor compartment able to cooperate with multiple well plates and (iii) characteristics of receptor medium. Graphical instructions for the use of this new device are depicted in figure 2. Franz diffusion cells and VitroPharma were used uncapped in this study. Receptor compartments of (i) Franz diffusion cells and (ii) VitroPharma were filled with 9 mL and 1.5 mL, respectively, of 0.0001% Patent Blue V (Guerbet, Roissy France) saline solution (NaCl 0.9%, B. Braun Medical SAS, Boulogne, France). Absorbance of Patent Blue V saline solution was measured at 640 nm by using V-630 spectrophotometer (Jasco, Bouguenais, France). Further determination of absorbance of Patent Blue V saline solution was carried out in order to appreciate the extent of receptor fluid water-loss in both Franz diffusion cell and VitroPharma (see next sections).

Unscalded porcine ears obtained from local slaughter house were frozen before use. Storage at 4°C for 12 hours allowed slow thawing of porcine ears which were clipped then dermatomed (500 μm in thickness) using a dermatome (Aesculap AG, Tuttlingen, Germany). Finally, skin explants (total surface area: 5.31 cm^2) were isolated using a biopsy punch. Therefore, skin explants were mounted on (i) Franz diffusion cells ($n = 4$; unexposed and exposed skin surface area: 4.53 cm^2 and 0.78 cm^2 , respectively) and (ii) VitroPharma ($n = 32$; unexposed and exposed skin surface area: 4.60 cm^2 and 0.71 cm^2 , respectively). Skin barrier integrity was checked by measuring transepidermal water loss (TEWL) using a Tewameter[®] (Courage Khazaka, Cologne, Germany). Skin samples exhibiting TEWL higher than 15 $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ were discarded. Then, Franz diffusion cell and VitroPharma were immersed into a 37 °C water bath and left for 1 hour to achieve temperature equilibration ($\sim 32^\circ\text{C}$). Percutafeine[®] 5% was applied by using lab-made applicator to the surface of mounted skin explants (Franz

diffusion cell: 7.28 ± 0.33 mg; caffeine: 364 ± 17 μg ; 467 ± 21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; VitroPharma: 7.55 ± 1.24 mg; caffeine: 378 ± 62 μg ; 532 ± 87 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Percutaneous absorption of caffeine

Franz diffusion cell

Receptor fluid aliquots (500 μL) were collected at 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 23 h and 24 h and then replaced by fresh receptor fluid. Absorbance of receptor fluid aliquots were measured at 640 nm as described in previous section and then diluted in 500 μL methanol:water mixture (60:40 v/v) for further analysis (see section 2.5). After 24 h, cells were disassembled. Donor formulation was recovered from skin surface using cotton swabs soaked with distilled water and then immersed in 1 mL methanol:water mixture (60:40 v/v). Skin explants were collected and preserved at 4 °C in aluminum foils for further analysis.

VitroPharma

Four individual VitroPharma cells were disassembled at 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 23 h and 24 h. Whole receptor solution was recovered, then its absorbance was measured at 640 nm as described in previous section and finally, 500 μL aliquots were diluted in 500 μL methanol:water mixture (60:40 v/v). Donor formulation was recovered from skin surface using cotton swabs soaked with distilled water and then immersed in 1 mL methanol:water mixture (60:40 v/v). Skin explants were collected and preserved at 4 °C in aluminum foils.

Caffeine cutaneous bioavailability

Treated skin surface (i.e., exposed skin, 0.78 cm^2 and 0.71 cm^2 in Franz diffusion cell and VitroPharma, respectively) was separated from unexposed skin parts using a biopsy punch. Unexposed and exposed skin samples were saved in 1 mL of methanol:water mixture (60:40 v/v) for separated analysis. Skin tissues were homogenized by using Mini-Bead Beater TM (Biospec Products, Bartlesville, USA) to ensure caffeine extraction for two minutes. Finally, tissue suspensions were centrifuged at 15 000 g for 20 minutes and supernatants were collected into vials.

Caffeine content analysis

Caffeine content in receptor solution and supernatants was assayed by high performance liquid chromatography

(HPLC) as reported in *table 1*. Limit of detection and limit of quantification were 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Data analysis and mathematical model

Considering that the transport through skin explant generally follows Fickian diffusion through a simple homogeneous membrane [16], thus under the boundary conditions of the experiment performed:

- Dose of the drug applied is finite, caffeine concentration in the vehicle (C_v) decreases through the application time (Eq. 1).
- Skin explant initially contains no drug at $t = 0$ (Eq. 2).
- Receptor fluid respects sink condition for caffeine (Eq. 3).

$$V_v \frac{dC_v}{dt} = AD_m \times \left. \frac{\partial C_m}{\partial x} \right|_{x=0} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$C_m(L, t) = 0 \quad (\text{Eq. 2})$$

$$C_x = 0 \text{ at } x = L \text{ for } t \geq 0 \quad (\text{Eq. 3})$$

Parameters defining the transport of caffeine through skin explants were calculated from the non-steady state solution to Fick's second law for single layer membrane [17] following Eq. 4:

$$Q_t = C_{v,0} Ah_v \times \left[1 - \frac{2 \exp\left(-\frac{D}{L^2} \times t\right)}{\cos\left(1 + \frac{h_v}{KL} + \frac{KL}{h_v}\right)} \right] \quad (\text{Eq. 4})$$

Where Q_t : cumulated amount of caffeine in receptor at t ; C_v , C_m and C_x : concentration of caffeine in (i) the vehicle, (ii) the membrane and (iii) the receptor, respectively; A : diffusion area, V_v : volume of the vehicle, h_v : thickness of the vehicle and L : thickness of the membrane.

The validity of Eq. 4 also assumes that (i) all transport of chemical substance across skin explants takes place by passive diffusion, (ii) that none other skin layers contribute to the total barrier. The permeability parameters (KL and D/L^2) were determined by non-linear regression using Kaleidagraph® software (Synergy Software, Reading, PA, USA). Permeability coefficient, K_p , was calculated following Eq. 5 [18]:

$$K_p \left(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1} \right) = KL \times \frac{D}{L^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

Table 1. Characteristics of caffeine assay by HPLC.

Equipment	Modular HPLC, Agilent 1200 series (Agilent Technologies SAS, Les Ulis, France)
Column	Gemini C18, 110 Å, 250 × 4.6 mm, 5 μm (Phenomenex, Le Pecq, France)
Pre-column	C18 4.6 × 2.5 mm, 5 μm
Mobile phase (v/v)	60% HPLC grade methanol/40% purified water
Flow	1.0 mL/min
Detection UV lamp	270 nm
Injection volume	20 μL
Retention time	3.5 min

Area under the curve (*AUC*) of cumulated amounts of caffeine permeated through skin either mounted in Franz diffusion cell or in VitroPharma, as function of time were calculated by using Kaleidagraph® software (Synergy, Reading, PA, USA). Device equivalence (*DE*) was estimated by using equation 6.

$$DE = \frac{Dose_{Franz\ cell} \times AUC_{VitroPharma}}{Dose_{VitroPharma} \times AUC_{Franz\ cell}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Permeability data obtained with (i) Franz diffusion cell and (ii) VitroPharma were compared using Wilcoxon-Mann-Whitney non-parametric test for unpaired data. $P < 0.05$ was chosen as significant level.

Results and discussion

Penetration and permeation of caffeine through porcine skin

Classical permeation experiments are performed by using Franz diffusion cell and sampling of receptor solutions withdrawn at regular intervals of time. Therefore, samples are assayed for the determination of permeant content while permeant into the skin is usually determined at the end of skin time exposure. Saarbrücken model was designed to study the rate and the extent of drug penetration into skin tissues maintained hydrated by filter paper impregnated with Ringer solution. Taking into account its design, Saarbrücken model is not suitable for percutaneous absorption investigation, although penetration/permeation data correlation from Saarbrücken model and Franz diffusion cell was reported [12].

In the present study, we detailed a “hybrid” model, for dual assessment of penetration and permeation of drug into and through the skin, suitable e.g., for the study of bioequivalence of topical products. Finite dose skin absorption experiments were conducted using conventional Franz diffusion cell and VitroPharma and by the application of semisolid formulation (i.e., Percutafeine® 5% gel) ranging from 1 to 10 mg/cm² as recommended by OECD Guideline 428 [10]. The profiles of (i) cumulative amounts absorbed through porcine skin mounted in Franz diffusion cell and VitroPharma and (ii) caffeine penetration into porcine skin mounted in VitroPharma are depicted in figures 4 and 5, respectively. Permeation curve shapes confirmed finite dosing conditions which thus were significantly fitted to Fickian diffusion model. Therefore, cumulative amount of caffeine absorbed into the skin increased exponentially, reached a maximum and then decreased (figure 5). Conversely, cumulative amount of caffeine absorbed through the skin increased exponentially, and then reached a plateau (figure 4). Similar value of caffeine penetration in whole skin was obtained in both devices after 24 hours (~6 µg/cm²).

Characterization of caffeine permeation through porcine skin

The permeability of caffeine through porcine skin was characterized by determining *KL* and *D/L*² parameters cal-

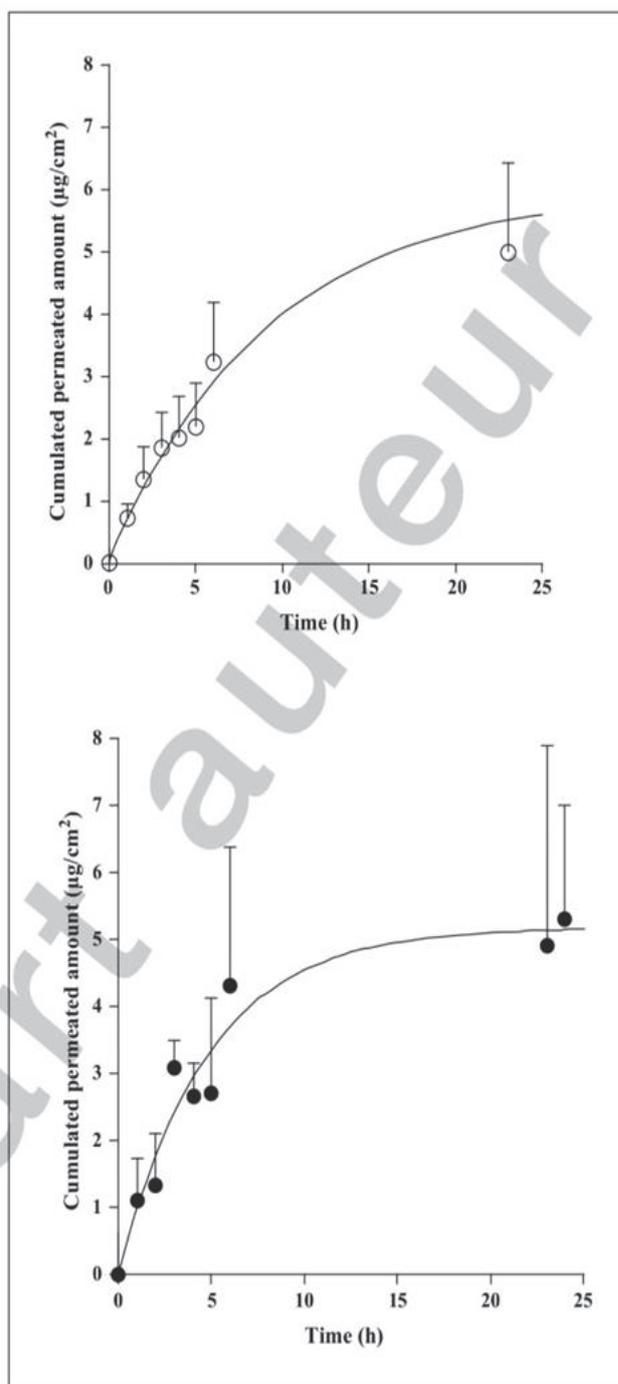


Figure 4. Permeation profile of caffeine through 500 µm dermatomed porcine skin explants mounted in (○) Franz diffusion cell and (●) VitroPharma. Each data point is the mean ± SEM of four experimental determinations.

culated from Fickian model, which were combined for the calculation of permeability coefficient, *K_p*. Furthermore, conventional pharmacokinetic analysis was undertaken enabling the determination of the maximum of cumulated caffeine absorbed (*Q_{max}*), and the *AUC* of cumulated permeant as function of time exposure. Therefore, device equivalence was calculated as the ratio of *AUC*s and applied doses. Permeability and pharmacokinetic parameters were reported in table 2. Permeability parameters of caffeine from Franz diffusion cell and VitroPharma were not significantly different confirming that the experimental setups achieved comparable percutaneous absorption. Moreover, it is worth noting that the partitioning and diffusion properties

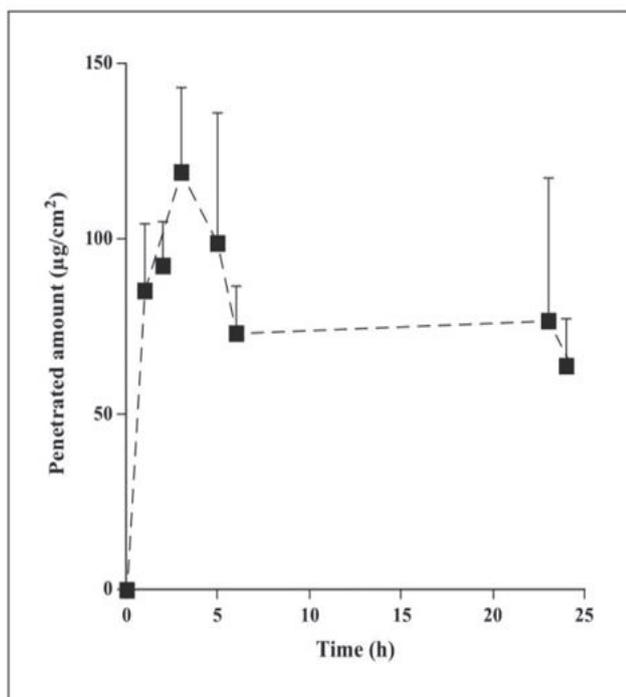


Figure 5. Penetration profile of caffeine into 500 μm dermatomed porcine skin explants mounted in VitroPharma. Each data point is the mean \pm SEM of four experimental determinations.

were strictly comparable between both devices. Although the receptor solution was unstirred in VitroPharma, Q_{max} and AUC values were found similar to those obtained from stirred receptor solution in Franz diffusion cell. These similarities might be explained in considering that the maximal caffeine concentration in receptor solution in both devices was much lower ($\sim 4 \mu\text{g/mL}$) that the limit of aqueous solubility of caffeine ($\sim 16 \text{ mg/mL}$ at 25°C and $\sim 26 \text{ mg/mL}$ at 32°C). Therefore, although boundary aqueous layers in the vicinity of dermis might interfere with proper homogeneity of receptor solution and overall diffusion of caffeine, that potential pitfall was not contributive in the present study. The importance of skin surface/receptor volume ratio (VitroPharma: 0.47 cm^{-1} versus Franz diffusion cell: 0.09 cm^{-1}) in diffusion experiment will be studied in further experiments. However, the absence of stirring in VitroPharma might be questionable for the assessment of percutaneous absorption of highly lipophilic compounds. In earlier study, permeation of caffeine through human skin treated by commercial caffeine formulations was conducted by using modified Franz diffusion cell with reduced active surface area (1 cm^2) and receptor phase volume (4 mL ; i.e., skin surface/receptor volume ratio: 0.25 cm^{-1}) [19]. Permeability coefficients of caffeine ($0.3 - 3 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$) obtained

previously ranged favorably with those determined in the present study ($\sim 6 \times 10^{-7} \text{ cm/s}$). Finally, device equivalence between Franz diffusion cell and VitroPharma was confirmed from pharmacokinetic analysis in which AUC s to dose ratio was found equal to 109% within acceptable range.

Lateral diffusion and finite dose

Lateral diffusion of permeant within skin structure during permeability assay impairs drug recovery and requires supplementary lateral skin compartment in permeability modelling [20]. It was shown that lateral diffusion depends on drug lipophilicity and molecular weight. Therefore, lateral diffusion might have important clinical consequences (e.g., reduction of drug bioavailability and formation of an undesirable drug reservoir out of treated area). Previous study reported fast lateral diffusion with a peak spreading inside outermost layers of the skin within minutes followed by a decrease over time [21].

In the present study, lateral penetration of caffeine was assessed in Franz diffusion cell and VitroPharma. Lateral untreated and treated skin areas represented $\sim 85\%$ and $\sim 15\%$ of total skin area (5.31 cm^2), respectively. After 24 hours, $17\% \pm 10\%$ and $31\% \pm 10\%$ of initial caffeine dose was recovered in untreated skin mounted in Franz diffusion cell and VitroPharma, respectively. Visual aspect of unexposed lateral skin in Franz diffusion cell was markedly dehydrated as compared to normal aspect in VitroPharma after 24 h. These discrepancies might be explained by the experimental setups where the skin is compressed between both donor and receptor compartments in Franz diffusion cell limiting dramatically water flux toward lateral skin areas, whereas water-tightness was insured by smooth sliding of skin between donor compartment and sealing ring (figure 3). Therefore, VitroPharma may respect more in use conditions where natural spreading of topical formulations occurs from the initial deposit. Complementarily to penetration experiment an assessment of lateral diffusion should be considered in permeation studies.

Conclusion

Cutaneous bioavailability of drug in formulation requires a relevant assessment of penetration and permeation when using diffusion cells. In the present study, we presented a new device enabling dual assessment of penetration and permeation of drug into and through the skin. Permeability of caffeine chosen as hydrophilic compound model was found similar in conventional Franz diffusion cell and VitroPharma, confirming biopharmaceutical equivalence of

Table 2. Permeability and pharmacokinetic parameters obtained from non-steady state solution to Fick's second law for single layer membrane displayed in section 2.6. Each data is the mean \pm standard deviation of 4 experimental determinations.

Devices	$10^2 \times KL$ (cm)	$10^5 \times D/L^2$ (s ⁻¹)	$10^7 \times Kp$ (cm/s)	Q_{max} ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{cm}^2$)
Franz cell	2.24 ± 0.89	2.80 ± 0.97	6.26 ± 0.32	6.04 ± 2.70	85.01 ± 44.44
VitroPharma	$2.00 \pm 0.46^{\text{NS}}$	$2.87 \pm 0.97^{\text{NS}}$	$5.74 \pm 0.62^{\text{NS}}$	$5.32 \pm 3.34^{\text{NS}}$	$96.17 \pm 41.62^{\text{NS}}$

NS: Not significantly different from Franz cell group (Wilcoxon-Mann-Whitney non-parametric test for unpaired data).

both devices. However, VitroPharma allowed a convenient evaluation of caffeine penetration profile confirming the importance of lateral diffusion in overall cutaneous transport. Further studies using a lipophilic compound will be conducted to achieve complete agreement to OECD procedure and to confirm the robustness of VitroPharma as dual penetration/permeation device for appropriate screening of topical formulations ■

Disclosure. Financial support: none. Conflict of interest: Authors DS, CP and FP declare being listed as inventors in the VitroPharma patent.

References

1. Schneider M, Windbergs M, Daum N, et al. Crossing biological barriers for advanced drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2013; 84: 239-41.
2. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci Technol To* 2000; 3: 318-26.
3. Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharm Res* 1992; 9: 663-9.
4. Salmon D, Kassai B, Roussel L, et al. Ex vivo absorption of promestriene from oil-in-water emulsion into infant foreskin. *Int J Pharm* 2013; 456: 121-4.
5. Williams FM. In vitro studies-how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption? *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 21: 199-203.
6. Hartung T. From alternative methods to a new toxicology. *Eur J Pharm Biopharm* 2010; 77: 338-49.
7. EURL-ECVAM, Method summaries - Percutaneous Absorption Review Document. Available at: <http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/>, consulted on the 10 January 2015.
8. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* 1998; 41: 1007-10.
9. Gardner CR, Almarsson O, Chen H, et al. Application of high throughput technologies to drug substance and drug product development. *Comput Chem Eng* 2004; 28: 943-53.
10. OCDE, Guidelines for the testing of chemicals - n°428, Skin Absorption: in vitro Method. 2004.
11. Prow TW, Grice JE, Lin LL, et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 470-91.
12. Wagner H, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharm Res* 2000; 17: 1475-81.
13. Mah CS, Kochhar JS, Ong PS, Kang L. A miniaturized flow-through cell to evaluate skin permeation of endoxifen. *Int J Pharm* 2013; 441: 433-40.
14. Levintova Y, Plakogiannis FM, Bellantone RA. An improved in vitro method for measuring skin permeability that controls excess hydration of skin using modified Franz diffusion cells. *Int J Pharm* 2011; 419: 96-106.
15. Salmon D, Pirot F, Rodriguez L, et al. Device for studying the permeability of artificial, synthetic or biological membranes. Patent WO2013057401, priority date: 10 october 2011.
16. Scheuplein RJ. Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 79-88.
17. Roberts MS, Anissimov YG, Gonsalvez RA. Mathematical Models in Percutaneous Absorption. In: Bronaugh RL, Maibach HI, Marcel Dekker, eds. *Percutaneous Absorption, Drugs – Cosmetics – Mechanisms – Methodology*. 3rd ed. 1999: 3-55.
18. Anissimov YG, Jepps OG, Dancik Y, Roberts MS. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 169-90.
19. Dias M, Farinha A, Faustino E, Hadgraft J, Pais J, Toscano C. Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *Int J Pharm* 1999; 182: 41-7.
20. Selzer D, Hahn T, Naegel A, et al. Finite dose skin mass balance including the lateral part: Comparison between experiment, pharmacokinetic modeling and diffusion models. *J Control Release* 2013; 165: 119-28.
21. Gee CM, Nicolazzo JA, Watkinson AC, Finin BC. Assessment of the lateral diffusion and penetration of topically applied drugs in humans using a novel concentric tape stripping design. *Pharm Res* 2012; 29: 2035-46.

Annexe 3:

Antimicrobial nanocapsules: from new solvent-free process to in vitro efficiency

Antimicrobial nanocapsules: from new solvent-free process to in vitro efficiency

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine
19 September 2014
[Number of times this article has been viewed](#)

Julie Steelandt¹
Damien Salmon^{1,2}
Elodie Gilbert¹
Eyad Almouazen³
François NR Renaud⁴
Laurène Roussel¹
Marek Haftek⁵
Fabrice Pirot^{1,2}

¹University Claude Bernard Lyon 1, Faculty of Pharmacy, Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of Skin Barrier Function, FRIPharm, Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, ²Hospital Pharmacy, FRIPharm, Hospital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, ³Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés, University Claude Bernard Lyon 1, ⁴University Claude Bernard Lyon 1, UMR CNRS 5510/MATEIS, ⁵University Claude Bernard Lyon 1, Faculty of Pharmacy, Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of Skin Barrier Function, FRIPharm, Laboratoire de Dermatologie, Lyon, France

Abstract: Skin and mucosal infections constitute recurrent pathologies resulting from either inappropriate antiseptic procedures or a lack of efficacy of antimicrobial products. In this field, nanomaterials offer interesting antimicrobial properties (eg, long-lasting activity; intracellular and tissular penetration) as compared to conventional products. The aim of this work was to produce, by a new solvent-free process, a stable and easily freeze-dryable chlorhexidine-loaded polymeric nanocapsule (CHX-NC) suspension, and then to assess the antimicrobial properties of nanomaterials. The relevance of the process and the physicochemical properties of the CHX-NCs were examined by the assessment of encapsulation efficiency, stability of the nanomaterial suspension after 1 month of storage, and by analysis of granulometry and surface electric charge of nanocapsules. In vitro antimicrobial activities of the CHX-NCs and chlorhexidine digluconate solution were compared by measuring the inhibition diameters of two bacterial strains (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) and one fungal strain (*Candida albicans*) cultured onto appropriate media. Based on the findings of this study, we report a new solvent-free process for the production of nanomaterials exhibiting antimicrobial activity, suitable stability, and easily incorporable as a new ingredient in various pharmaceutical products.

Keywords: nanomaterial, nanocapsules, antiseptic, chlorhexidine, solvent-free process

Introduction

Chlorhexidine (CHX) is a bis-biguanide showing broad-spectrum antiseptic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria, and fungi. Its efficient antimicrobial activity finds numerous pharmaceutical applications, notably in mucosal and cutaneous antiseptics.¹ Oral mucosa antiseptics is challenging, since saliva bathing and enzymes are responsible for the clearance and degradation of drugs.² In this field, CHX is widely used, and its efficacy has been fully described.^{3,4} However, oral mucosa administration of CHX exhibits potential side effects (eg, tooth staining, taste alteration, burning sensation, low bioavailability⁵), so original formulations were developed (eg, gels, varnishes, mucoadhesive tablets, and orthodontic materials), allowing controlled drug release.^{3,6,7} Furthermore, the use of antiseptic agents is mandatory to prevent surgical site infection and to reduce nosocomial infections responsible for morbidity and mortality incidence and growing economic pharmaceutical care.^{8,9} In this context, CHX was proven efficient in reducing the occurrence of resistant bacterial strains, especially methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum β -lactamase,¹⁰ and is recognized to produce an efficient, immediate, and sustained antiseptic effect maintained beneath surgical gloves.¹¹ However, compliance with antiseptic use is followed by only 50% of medical and nursing staff in care units.¹² Reiterated and time-consuming applications, as well as the misuse of antiseptics, reveal the necessity of a new strategy for a rapid and sustained antiseptic activity.^{13–15}

Correspondence: Fabrice Pirot
Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle, EA 4169: Fundamental, Clinical and Therapeutic Aspects of Skin Barrier Function, Faculty of Pharmacy, University Claude Bernard Lyon 1, 8 Avenue Rockefeller, Lyon 69373, France
Tel +33 4 78 777 167
Fax +33 4 78 777 247
Email fabrice.pirot@univ-lyon1.fr

An alternative to conventional formulations is found in nanomedicine supporting drug targeting and sustained pharmacological activity.¹⁶ In this field, polymeric nanocapsules (NCs) present many advantages, such as their ability to display immediate and sustained drug release while preventing chemical degradation.¹⁷ In previous publications, we have provided an *in vitro* release study, an *ex vivo* cutaneous permeability study, an *in vivo* human sustained antibacterial efficiency study, and a minimum inhibitory concentration determination for CHX-loaded poly- ϵ -caprolactone (PCL) NCs.^{18–20} However, CHX-NCs were prepared by conventional interfacial deposition, where PCL was dissolved in organic solvent, the latter being therefore eliminated from the aqueous phase by evaporation and multiple purification steps questioning the presence of solvent residue and the feasibility of industrial scale-up.²¹ The main objective of this study was to prepare by an original solvent-free process a stable and easily freeze-dryable CHX-NC suspension as a new antimicrobial nanomaterial. Physicochemical and granulometric characterization of CHX-NCs is provided that correlates with previous findings. Furthermore, the *in vitro* antimicrobial efficiency of CHX-NCs was verified using an agar-diffusion method^{22,23} and compared to 1% CHX digluconate aqueous solution.

Materials and methods

Materials

CHX base was purchased from Inresa (Bartenheim, France), Montanox 80 (polysorbate 80, hydrophilic surfactant) was given by Seppic (Castres, France), and Lutrol® F68 (poloxamer 188, molecular mass 7,680–9,510 g/mol, 81% polyoxyethylene units) was provided by BASF (Ludwigshafen, Germany). Labrafil® M1944CS (mixture of mono-, di-, and triglycerides and mono- and difatty esters of polyethylene glycol 300) and Plurol® Oléique CC 497 (polyglyceryl-6 dioleate) were provided by Gattefossé (St Priest, France). PCL (molecular mass ~80,000 Da) was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Müller–Hinton agar plates and bacterial and fungal strains were provided by Nosoco Tech (Lyon, France).

Nanocapsule production

In a recent patent, we reported a new solvent-free process for the production of polymeric NCs.²⁴ Briefly, a hydrophobic crystalline or amorphous polymer (ie, PCL) was melted or dispersed above the glass-transition temperature in an oily mixture containing triglycerides and a lipophilic surfactant. Then, the oily phase was mixed in an aqueous gel

containing hydrophilic surfactant, enabling the formation of polymeric NCs suspended in gelified suspension. In the present study, the oily phase was a mixture of Plurol Oléique CC 497 (HLB =6; 4 g), and Labrafil M1944CS (HLB =4; 0.36 g) heated at 60°C–70°C. Afterward, PCL (0.37 g) and CHX base (1 g) were introduced into the oily mixture and mechanically stirred (600 rpm) until a homogeneous and clear dispersion was obtained. Also, poloxamer 188 (34 g) hydrogel was prepared in a 0.15% Montanox 80 (HLB =15) aqueous solution (60.27 g) and heated at 60°C–70°C. Finally, the oily mixture and hydrogel were mixed under mechanical stirring (600 rpm), allowing the spontaneous formation of polymeric NCs. The theoretical CHX concentration in NC suspension was 1% (weight/weight [w/w]). CHX-NCs in suspension represented 5.73% (w/w).

Freeze-drying of nanocapsule suspension

CHX-NC suspensions was frozen for 48 hours at –80°C, then freeze-dried for 24 hours (Heto Power Dry LL3000 freeze-dryer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Additionally, freeze-dried powder was passed through a 2 mm sieve. Rehydration of 0.5 g freeze-dried CHX-NC powder in 10 mL of purified water enabled the restitution of the initial CHX-NC suspension.

Granulometric analysis

Particle size, polydispersity index, and zeta potential were determined using a coupled granulometer and zeta-potential analyzer (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, UK). This instrument enables the measurement by dynamic light scattering of particle sizes between 0.6 nm to 8.9 μ m (detector angle 173°, wavelength 633 nm). Zeta potential is achieved by laser Doppler electrophoresis (maximum conductivity 200 mS/cm). Adequate dilutions of each formulation in demineralized water were analyzed at 25°C \pm 2°C in a dedicated vial (Plastibrand™ 70 μ L micro; Sigma-Aldrich). Measurements were performed on three different batches of CHX-NC suspensions. Each measurement was repeated ten times, and results are expressed as means of ten measurements \pm standard deviation.²⁵

High-performance liquid-chromatography analysis

CHX was analyzed by reverse-phase chromatography using high-performance liquid chromatography (HPLC; 1200 series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to a method described previously.¹⁹ A C18 column was used (Zorbax, 150 \times 3 mm, 3.5 μ m particle size; Agilent

Technologies). The mobile phase was composed of acetonitrile and 30 mM sodium acetate buffer (1:1, volume/volume [v/v]) adjusted to pH 3.3 with acetic acid (96%). Samples were filtered through 0.45 μm polyvinylidene difluoride membranes (Millex® filter; EMD Millipore, Billerica, MA, USA) and degassed by ultrasonication. The injected sample volume was 40 μL , and the flow rate of the mobile phase was 0.8 mL/minute. The retention time of CHX detected at 260 nm was 1.3 minutes. For concentrations between 6.25 and 300 $\mu\text{g/mL}$, chromatograms were linear with a correlation factor of 0.999. The limit of quantification of CHX was ~ 20 ng/mL.

Determination of encapsulation efficiency

Total CHX in suspension and freeze-dried powder

The total amount of CHX in suspension and freeze-dried powder was determined by HPLC analysis. CHX-NC suspension (1 mL) was diluted in the mobile phase (1:100), and freeze-dried CHX-NC powder (0.5 g) was firstly dispersed in 10 mL mobile phase and then diluted in the mobile phase (1:100). Complete dissolution of NCs and subsequent CHX release were ensured by dilution in the mobile phase. Samples were filtered before analysis, as described in the “High-performance liquid-chromatography analysis” section.

Unencapsulated CHX in suspension and freeze-dried powder

The unencapsulated CHX amount in the CHX-NC suspension was determined by dilution of the CHX-NC suspension in purified water (1:100), then filtration through an Ultrafree®-CL filter (0.1 μm , polyvinylidene difluoride membrane; EMD Millipore), which was centrifuged (4 minutes, 6000 g). Thereafter, the collected unencapsulated CHX in ultrafiltrate was assayed by HPLC, as described in the “High-performance liquid-chromatography analysis” section.¹⁹ Similarly, freeze-dried CHX-NC powder (0.5 g) dispersed in 10 mL of purified water and then diluted in purified water (1:10) was ultrafiltered, as described previously.

Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency (EE) of the CHX input ($Q_{\text{CHX input}}$) was calculated from the total CHX amount in the CHX-NC suspension ($Q_{\text{CHX-NC suspension}}$), and the CHX amount recovered in ultrafiltrate ($Q_{\text{CHX ultrafiltrated}}$) calculated as follows:

$$\text{EE (\%)} = \frac{Q_{\text{CHX-NC suspension}} - Q_{\text{CHX ultrafiltrated}}}{Q_{\text{CHX input}}} \times 100. \quad (1)$$

Morphology of nanocapsule suspensions and freeze-dried powder

CHX-NC and freeze-dried CHX-NC morphology was studied by using an S800 scanning electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan) after gold-palladium coating.

Study of CHX-NC suspension stability

CHX-NC suspension stability was assessed using a Turbiscan™ Classic MA 2000 (Formulation, L'Union, France), in which the CHX-NC suspension filled aseptically in a sterile glass tube (filling height 50 mm) was scanned vertically by an 850 nm incident beam (ie, analysis of backscattering detection at a 180° angle). Turbiscan measurements were performed each day during the first week and every 3 days thereafter for 1 month while in storage at an ambient temperature (20°C±5°C).^{25,26} Additionally, granulometric analysis was performed as described in the “Granulometric analysis” section after 1 month's storage at an ambient temperature.

In vitro antimicrobial efficiency

The antimicrobial efficiency of the CHX-NC suspension and CHX-NC freeze-dried powder was compared to CHX digluconate solution (1%) by using an adapted antibiogram test.^{27,28} The choice of bacterial strains was driven by *European Pharmacopoeia* recommendations.²⁹ In vitro antimicrobial activity of CHX nanomaterials and CHX digluconate solution was determined against clinically isolated bacterial (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) and fungal (*Candida albicans*) strains on Müller–Hinton and Sabouraud media, respectively. Impregnated disks of tested formulations (2 μL) were deposited onto the surface of the culture media, and inhibition diameters of strains exposed to the CHX-NC suspension, freeze-dried CHX-NC powder dispersed in purified water, the CHX digluconate solution, and an unloaded PCL NC suspension (ie, NCs produced as detailed in the “Nanocapsule production” section without CHX load), which were measured after 24 hours at 37°C.

Statistical analysis

The granulometry and surface electric charge of the CHX-NC suspension were compared before and after 1) an immediate freeze-drying process by using the nonparametric Mann–Whitney–Wilcoxon test for unpaired data and 2) 1 month of storage by using the nonparametric Mann–Whitney–Wilcoxon test for paired data. The Kruskal–Wallis rank-sum test was performed for multiple comparisons between the antibacterial/antifungal activity of formulations. The level of statistical significance was chosen as $P < 0.05$.

Results

Formulation and characterization of CHX-NC suspension and freeze-dried powder

The CHX-NC suspension was characterized macroscopically as a homogeneous milky dispersion easily freeze-dried and sieved as a white powder (Figure 1D). Granulometry and surface properties of CHX-NC suspensions and freeze-dried CHX-NC powder are reported in Table 1. Submicronic size and mid-range polydispersity of the CHX-NC suspension were confirmed before and after 1 month of storage at an ambient temperature. As reported in our previous study, CHX-NCs exhibited a permanent positive surface electric charge throughout storage, due to CHX dissociation at the

water–polymeric wall interface compared to negatively charged unloaded NCs.¹⁹ No significant differences in granulometry and surface properties were observed between batches (n=3) of CHX-NC suspensions. Furthermore, immediate freeze-drying of CHX-NC suspensions did not significantly affect either granulometric or surface electric charge parameters. Electron microscopy observation of CHX-NC suspensions confirmed the nanometric spherical shape of CHX-NCs (Figure 1, A and B). The aggregated structure of freeze-dried CHX-NC powder was evident from scanning electron microscopy (Figure 1C).

Recovery of the initial CHX input was found between 85% and 89%, respectively, in suspension and after freeze-drying process. Total recovery was assumed as CHX loss

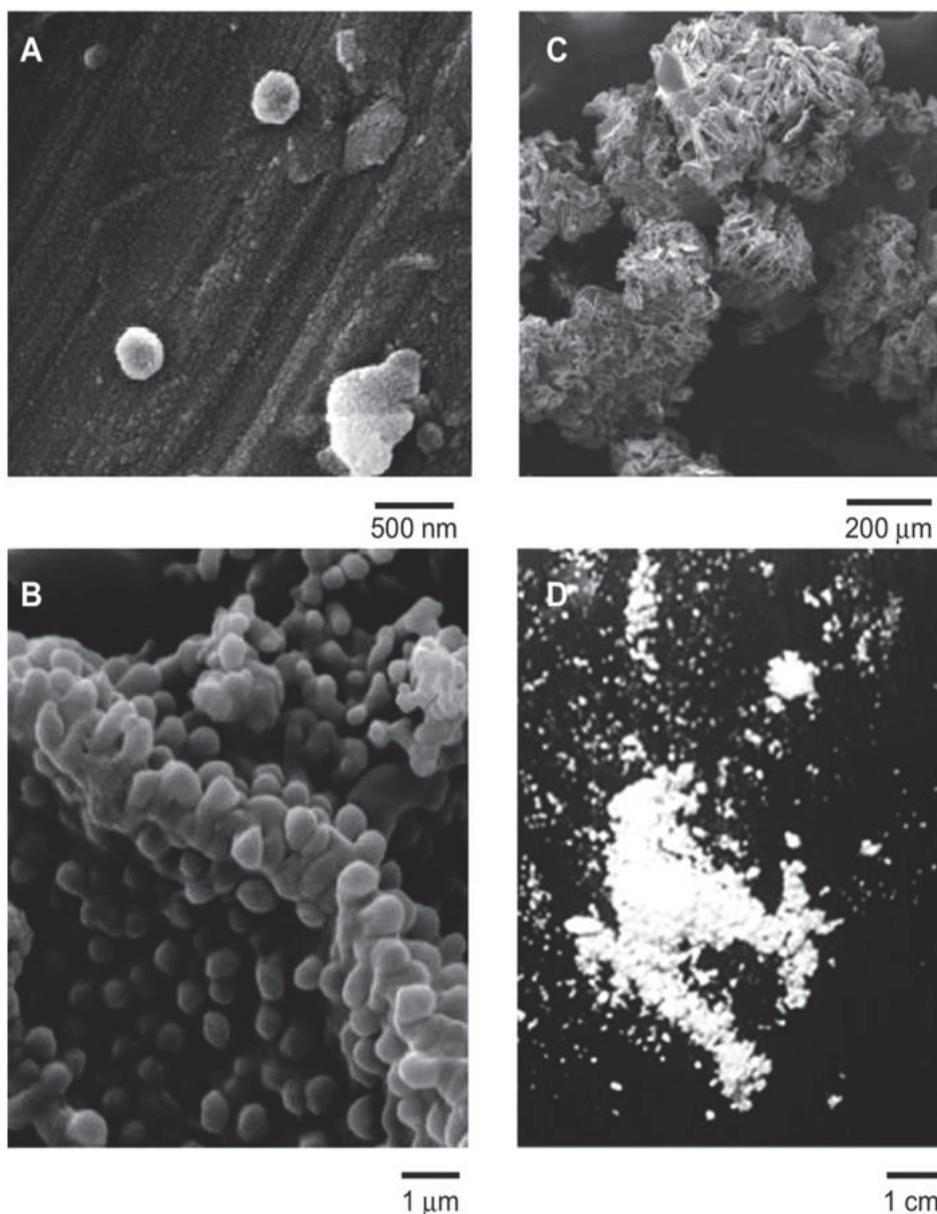


Figure 1 Scanning electron microscopy images of (A) chlorhexidine-loaded nanocapsules (CHX-NCs), (B) CHX-NC suspension, (C) freeze-dried CHX-NC powder, and (D) photograph of freeze-dried CHX-NC powder.

Table 1 Loading, granulometric, and surface electric properties of chlorhexidine nanocapsule (CHX-NC) suspensions (CHX 1%, 1 mL) and freeze-dried CHX-NC powder (CHX 2.5%, 0.5 g)

Formulation	CHX amount (mg)				EE (%)	Average size (nm)		I ⁰ PI		ζ (mV)	
	Input	Recovered	Encapsulated	Ultrafiltrated		Day 0	Day 30	Day 0	Day 30	Day 0	Day 30
CHX-NC suspension	10.0	8.5±0.1	6.9±0.3	1.6±0.3	69±3	225±2	247±3	16±0.7	19±0.2	18±5	13±4
Freeze-dried CHX-NC	12.5	11.1±0.1	6.2±1.6	4.9±1.6	50±13	224±1	ND	42±0.9*	ND	10±4*	ND

Notes: *Significantly different from CHX-NC suspension day 0 group (Wilcoxon test for unpaired data test, $P < 0.05$). Chlorhexidine amounts are expressed as means ± standard deviation of at least three experimental determinations. Granulometric data (average size, polydispersity index [PI], and zeta potential [ζ]) are expressed as means ± standard deviation of at least ten experimental determinations on each batch (n=3). Storage of suspensions was performed at room temperature (20°C±5°C) and protected from light.

Abbreviations: EE, encapsulation efficiency; NS, not significant; ND, not determined.

inferior or equal to 15%. In order to confirm the relevance of the new solvent-free process, the EE of CHX into polymeric NCs was evaluated from the ratio of unencapsulated CHX to initial input. At the outset, encapsulation of CHX was close to 70%, which was consistent with that determined in previous studies^{19,21} reporting CHX encapsulation in PCL NCs obtained by a conventional interfacial deposition technique involving predissolution of polyester in acetone and a subsequent solvent-evaporation step. Nevertheless, the EE of CHX assessed in freeze-dried CHX-NC powder was found to be lower than that of the CHX-NC suspension. Accordingly, the ultrafiltrated CHX rate was 2.5 times higher after freeze-drying (~44%) than that of the initial CHX-NC suspension (~18%). Different assumptions might be advanced to explain these discrepancies, such as a shrinking of nanocapsules during the freezing phase favoring oily mixture diffusion through the NC wall, or a breakage of NCs during freeze-drying releasing oily content into the suspending solution. However, no variation in CHX-NC size was evident, suggesting no dramatic breakage of nanomaterial, but higher polydispersity and lower surface electric charge tended to confirm a reversible and nondestructive shrinking of CHX-NCs following freeze-drying. Turbiscan analysis did not show any sedimentation or creaming in CHX-NC suspensions stored for 1 month, but negligible flocculation was assumed, as a minor variation (<10%) of suspension backscattering was observed over 1 month (Figure 2). These results were consistent with granulometry and surface electric charge findings determined after 1 month's storage at an ambient temperature (Table 1).

Antimicrobial activity

In vitro antimicrobial activity of encapsulated CHX was compared to CHX digluconate solution against common clinically isolated pathogenic bacterial and fungal strains (Figure 3).

Inhibition diameters of strains exposed to antimicrobial formulations are reported in Table 2, showing no significant difference of antimicrobial activity. However, antibacterial activities of CHX-NC suspensions and freeze-dried CHX-NC powder were slightly more important against *S. aureus* (5.3±0.1 cm and 5.1±0.3 cm, respectively) and *E. coli* (6.4±2.3 cm and 5.0±0 cm, respectively) than CHX digluconate (3.6±1.1 cm and 4.0±0.9 cm, respectively). As expected, no antimicrobial activity was evident with unloaded NCs.

The minimum inhibitory concentration for CHX-NCs had already been determined in a previous publication.¹⁹ Only the preparation method was changed: from interfacial polymer deposition following solvent displacement to a solvent-free method. Since NC-characterization results were consistent in both publications, minimum inhibitory concentration was

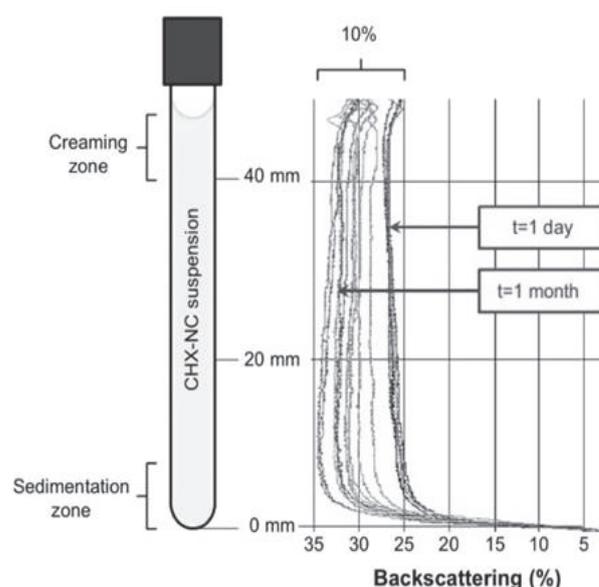


Figure 2 Turbiscan analysis of chlorhexidine-loaded nanocapsule (CHX-NC) suspension backscattering profile evolution over 1 month of storage at 20°C±5°C.

Notes: There was no evidence of sedimentation or creaming, while flocculation was observed. The extent of flocculation estimated from the variation of backscattering did not exceed 10%.

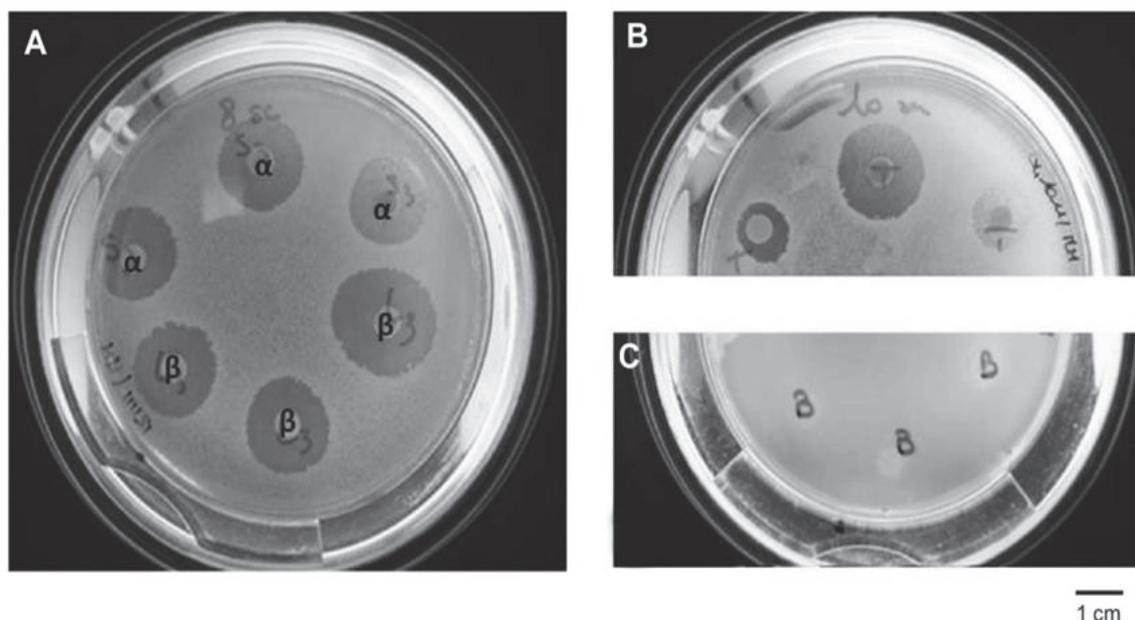


Figure 3A–C Photographs of inhibition diameters of *Staphylococcus aureus* stain exposed to chlorhexidine (CHX) formulations (2 μ L impregnation on paper disks). **Notes:** (A) CHX nanocapsule (CHX-NC) formulations (ie, CHX-NC suspension [α] and freeze-dried CHX-NC powder resuspended in purified water [β]). (B) 1% CHX digluconate solution (positive control), and (C) unloaded NC suspension (negative control).

assumed to be comparable with the new process using the same polymer. Therefore, inhibition diameters obtained by disk diffusion were considered sufficient to verify antiseptic activity, since a complete antiseptic-activity profile had already been determined in a previous publication.¹⁸

Discussion

The use of conventional CHX solutions is frequently the subject of controversy (eg, taste masking, low bioavailability),⁷ suggesting the need for new formulation strategies. Polymeric NCs have been extensively studied in the development of drug carriers. However, most NC-preparation methods, such as nanoprecipitation³⁰ and emulsification diffusion,³¹ use organic solvents (eg, alcohol, acetone, chloroform, dichloromethane), which must be eliminated at the final step of preparation to obtain a therapeutically usable form.²¹

The use of organic solvents presents an important drawback, due to their toxicity and the need for multiple purification steps, including long-lasting or complex processes, such as evaporation or solvent-diffusion steps. Moreover, solid lipid nanoparticles have been proposed as an alternative to polymeric NCs, with the major advantage of avoiding organic solvents. Solid lipid nanoparticle solvent-free preparation techniques like high-shear or high-pressure homogenization present some limitations, such as energy consumption, drug degradation, and lipid crystallization and modifications.³² These considerations are important to take into account in the perspective of industrial scale-up of polymeric and lipid nanoparticles. The method described in this study is solvent-free and consists of a two-step process (ie, separate oily and aqueous phase preparation and mixing) resulting in a stable and freeze-dryable NC suspension

Table 2 Comparison of inhibition diameters of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Müller–Hinton medium), and *Candida albicans* (Sabouraud medium) strains exposed to chlorhexidine nanocapsule (CHX-NC) suspensions (CHX 1%), freeze-dried CHX-NC powder (CHX 2.5%) dispersed in purified water (CHX 0.6%), 1% CHX digluconate solution (positive control), and unloaded nanocapsule suspension (negative control)

Formulation	Inhibition diameter (cm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> (NS)	<i>Escherichia coli</i> (NS)	<i>Candida albicans</i> (NS)
CHX-NC suspension	5.3 \pm 0.1	6.4 \pm 2.3	3.8 \pm 1.2
Freeze-dried CHX-NC	5.1 \pm 0.3	5.0 \pm 0.1	3.2 \pm 0.2
CHX digluconate solution	3.6 \pm 1.1	4.0 \pm 0.9	5.4 \pm 0.8
Unloaded NC suspension	0	0	0

Notes: Data are expressed as means \pm standard deviation of three experimental determinations. NS ($P > 0.05$; Kruskal–Wallis rank-sum test).

Abbreviation: NS, not significant.

ready for freeze-drying. The advantage of freeze-drying is to maintain stability, thus allowing longer lasting conservation of nanocapsules.³³

The average size of CHX-NC suspensions was in accordance with other NC-preparation methods,²¹ and microscopic observation showed that the CHX-NC structure was defined by a clear wall formed by polymer, as observed previously.¹⁹ EE was found to be in the same range as previously described in the literature (ie, 50%–70%,²¹ 60%¹⁹) but was decreased by the freeze-drying process. Flocculation was assumed, since a decrease of backscattering was reported after gentle agitation of the CHX-NC suspension (data not shown). Furthermore, the positive charge at the surface of CHX-NCs, evidenced by zeta-potential measurements, contributed to suspension stability.

The bactericidal effect of CHX-NC was proved to be equivalent to that of solubilized CHX toward Gram-negative (*E. coli*) and Gram-positive (*S. aureus*) bacteria and fungi (*C. albicans*). Recently, antimicrobial silver-based nanomaterials have been reported, including nanoparticles,^{34,35} and in wound dressing and surgical sutures.^{36,37} However, their safety is often controversial, considering silver cytotoxicity on keratinocytes and fibroblasts³⁸ and side effects (eg, cost, definitive tegument coloration). In contrast, the encapsulation of CHX limits drug diffusion into tissular and cellular structures, potentially reducing recurrent side effects by appropriate targeting against microorganisms. Furthermore, in a previous study, we reported that encapsulation of CHX enabled immediate and sustained antimicrobial activity against resident and transient skin flora.¹⁸ These results were explained by both adhesion properties of nanoparticles based on their physicochemical properties (eg, size, surface charge)³⁹ and controlled release of CHX from nanocapsules deposited onto the skin surface and accumulated in cutaneous appendages.⁴⁰

Moreover, biocompatible and biodegradable polymer enhances the tolerance and safety of the formulation,¹⁷ and thermosensitive active pharmaceutical ingredient encapsulation, including peptidic structures, is claimed by substituting crystalline polymer (ie, PCL melting point ~60°C) with an amorphous low glass-transition temperature polymer (eg, poly[lactide-co-glycolide acid] glass-transition temperature ~40°C).

Conclusion

In the present study, a stable formulation of antimicrobial NCs produced by a new solvent-free method was successfully tested against several strains of bacteria. The simplicity of the process enables the industrial scale-up of ready-to use or

freeze-dried products for widespread use in daily care practices, eg, in hand-washing hospital procedures or in dentistry. Eventually, such versatile nanoprocesses might encapsulate various chemical compounds for further pharmaceutical or cosmetic applications.

Acknowledgment

We acknowledge Aurélia Vettese (Nosoco Tech, Lyon) for her help with bacteriologic experiments and for giving us access to the equipment.

Disclosure

The formulation process described in this work is protected by a patent that belongs to the authors. The authors declare no conflicts of interest in this work.

References

- McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147–179.
- Hearnden V, Sankar V, Hull K, et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(1):16–28.
- Ankola AV, Hebbal M, Mocherla M. A review of efficacy of various modes of chlorhexidine delivery. *J Oral Biosci.* 2008;50(4):239–242.
- Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000.* 1997;15:55–62.
- Flotra L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *J Periodontol Res Suppl.* 1973;12:41–44.
- Doury J, Falson F, Pirot F, Huynh TT, inventors; Université Claude Bernard Lyon I, assignee. Elastic orthodontic elements that can release poorly saliva-soluble chlorhexidine. Patent WO2011121224 A3. 2011 Dec 29.
- Autio-Gold J. The role of chlorhexidine in caries prevention. *Oper Dent.* 2008;33(6):710–716.
- Harris BD, Hanson C, Christy C, et al. Strict hand hygiene and other practices shortened stays and cut costs and mortality in a pediatric intensive care unit. *Health Aff (Millwood).* 2011;30(9):1751–1761.
- Hassan M, Tuckman HP, Patrick RH, Kountz DS, Kohn JL. Cost of hospital-acquired infection. *Hosp Top.* 2010;88(3):82–89.
- Johnson PD, Martin R, Burrell LJ, et al. Efficacy of an alcohol/chlorhexidine hand hygiene program in a hospital with high rates of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection. *Med J Aust.* 2005;183(10):509–514.
- Beausoleil CM, Paulson DS, Bogert A, Lewis GS. In vivo evaluation of the persistent [sic] and residual antimicrobial properties of three hand-scrub and hand-rub regimes in a simulated surgical environment. *J Hosp Infect.* 2012;81(4):283–287.
- Widmer AF. Replace hand washing with use of a waterless alcohol hand rub? *Clin Infect Dis.* 2000;31(1):136–143.
- Tapia-Jurado J, Reyes-Arellano W, García-García JJ, Jiménez-Corona JL, Peña-Jiménez CM, León-Mancilla B. [Comparative study of the cost/effectiveness of surgical wash with various antiseptics]. *Cir Cir.* 2011;79(5):447–452. English and Spanish.
- Widmer AF. Surgical hand hygiene: scrub or rub? *J Hosp Infect.* 2013; 83 Suppl 1:S35–S39.
- Parianti JJ, Thibon P, Heller R, et al. Hand-rubbing with an aqueous alcoholic solution vs traditional surgical hand-scrubbing and 30-day surgical site infection rates: a randomized equivalence study. *JAMA.* 2002;288(6):722–727.
- Hughes GA. Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine.* 2005;1(1):22–30.

17. Dash TK, Konkimalla VB. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering. *J Control Release*. 2012;158(1):15–33.
18. Nhung DT, Freydiere AM, Constant H, Falson F, Pirot F. Sustained antibacterial effect of a hand rub gel incorporating chlorhexidine-loaded nanocapsules (Nanochlorex). *Int J Pharm*. 2007;334(1–2):166–172.
19. Lboutounne H, Chaulet JF, Ploton C, Falson F, Pirot F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly(epsilon-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J Control Release*. 2002;82(2–3):319–334.
20. Lboutounne H, Faivre V, Falson F, Pirot F. Characterization of transport of chlorhexidine-loaded nanocapsules through hairless and Wistar rat skin. *Skin Pharmacol Physiol*. 2004;17(4):176–182.
21. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm*. 2010;385(1–2):113–142.
22. Kanmani P, Lim ST. Synthesis and structural characterization of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its antimicrobial activity against food and multidrug resistant pathogens. *Process Biochem*. 2013;48(7):1099–1106.
23. Kumar S, Singh M, Halder D, Mitra A. Mechanistic study of antibacterial activity of biologically synthesized silver nanocolloids. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2014;449:82–86.
24. Pirot F, Falson F, inventors; Université Claude Bernard Lyon 1, assignee. Novel method for producing nanocapsules in the absence of an organic solvent, and nanocapsules produced thereby. United States patent US 20110111019 A1. May 12, 2011
25. Salmon D, Pont E, Chevallard H, et al. Pharmaceutical and safety considerations of tablet crushing in patients undergoing enteral intubation. *Int J Pharm*. 2013;443(1–2):146–153.
26. Mengual O, Meunier G, Cayré I, Puech K, Snabre P. Turbiscan MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*. 1999;50(2):445–456.
27. Huynh TT, Padois K, Sonvico F, et al. Characterization of a polyurethane-based controlled release system for local delivery of chlorhexidine diacetate. *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;74(2):255–264.
28. Wannachaiyasit S, Phaechamud T. Development of chlorhexidine thermosensitive gels as a mouth antiseptic. *J Met Mater Miner*. 2010;20(3):165–168.
29. European Directorate for the Quality of Medicines. Efficacy of antimicrobial preservation. In: *European Pharmacopoeia*. 8th ed. Strasbourg: EDQM; 2013:557.
30. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm*. 1989;55(1):R1–R4.
31. Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharm Res*. 1998;15(7):1056–1062.
32. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;47(2–3):165–196.
33. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(15):1688–1713.
34. Kim JS, Kuk E, Yu KN, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007;3(1):95–101.
35. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27(1):76–83.
36. Ho CH, Odermatt EK, Berndt I, Tiller JC. Long-term active antimicrobial coatings for surgical sutures based on silver nanoparticles and hyperbranched polylysine. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2013;24(13):1589–1600.
37. Ip M, Lui SL, Poon VK, Lung I, Burd A. Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J Med Microbiol*. 2006;55(Pt 1):59–63.
38. Poon VK, Burd A. In vitro cytotoxicity [sic] of silver: implication for clinical wound care. *Burns*. 2004;30(2):140–147.
39. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J Control Release*. 2004;99(1):53–62.
40. Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res*. 2011;303(8):533–550.

International Journal of Nanomedicine

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Annexe 4:

Development of a simple HPLC method using core-shell particles column for quantification of IR3535 in insect repellent liquid formulations

**DEVELOPMENT OF A SIMPLE HPLC METHOD USING CORE-SHELL PARTICLES COLUMN FOR QUANTIFICATION OF IR3535[®] IN INSECT REPELLENT LIQUID FORMULATIONS**

Sinh Thai Nguyen¹, Jean-Paul Salvi¹, Elodie Gilbert², Celine Serre², Fabrice Pirot², Roselyne Boulieu^{1*}

¹Clinical Pharmacy, Pharmacokinetics, and Drug Evaluation Laboratory, ²Industrial Pharmaceutics Laboratory, EA4169 “Normal and pathological functions of the cutaneous barrier”, Faculty of Pharmacy, Claude Bernard Lyon 1 University, University of Lyon, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France

*Corresponding author e-mail: roselyne.boulieu@univ-lyon1.fr

ABSTRACT

A simple, fast, precise and sensitive method for the quantification of IR3535[®], an insect repellent used in topical formulations, was developed by reversed-phase high performance liquid chromatography. The separation was carried out by using a core-shell silica particles column (Kinetex[®] C18, 5 μ m, 4.6 mm x 150 mm) with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid and methanol (40 : 60 v/v) in an isocratic mode at 0.5 ml/min and UV detection at 220 nm. The calibration curve was linear from 10 to 400 μ M, with regression coefficient $r^2 = 0.9999$. Limit of detection (LOD) and Limit of quantification (LOQ) were found to be 1 and 10 μ M, respectively. Precision and accuracy fulfilled the acceptance criteria. This method was validated and may be routinely used for quantitative analysis of IR3535[®] from various topical insect repellent liquid formulations.

Keywords: Insect repellent · IR3535 · HPLC · Validation

INTRODUCTION

Mosquitoes and ticks are common vectors of numerous infection diseases in human. Their saliva injected during blood feeding can cause swelling and irritation, as well as transport of viruses, bacteria and vector-borne pathogens^[1,2]. Thus currently, USA and other countries in Europe have approved the use of repellents as an important tool to protect people from these infections^[3]. Repellents are chemical substances that alter insect flight behavior and inhibit these pathogen vectors from landing on the skin and clothes^[4,5]. Ideally, repellents should protect against biting insects with a long-lasting effectiveness and cause no adverse reactions^[6]. Published data indicate that repellent efficacy and protection duration vary considerably among products and among mosquito or tick species^[7-9]. It is also significantly affected by other factors such as ambient temperature, level of

human activity, amount of perspiration, or exposure to water^[10,4]. Several insect repellents were evaluated and registered by the U.S. Environmental Protection Agency for skin application, such as DEET (N,N-diethyl-meta-toluamide), Picaridin, IR3535[®] or Oil of Lemon Eucalyptus (OLE)^[11]. The most widely marketed chemical-based insect repellent is DEET, which is effective against many species of mosquitoes, biting flies and ticks. Although known as the “standard” repellent, DEET has problems with safety due to its high skin permeability, unpleasant odors and several side effects^[4,12,13]. Moreover, recent studies have revealed that some individual insects are becoming increasingly resistant to DEET^[12]. Besides, IR3535[®] is a good DEET alternative with the same advantages and fewer disadvantages. Developed in the early 1970s, IR3535[®], chemically ethyl butylacetylaminopropionate or 3-(N-acetyl-N-butyl) aminopropionic acid ethyl ester (Figure-1), is derived

from a natural amino acid, β -alanine^[14,3]. Despite its marketed history of 25 years in European countries, this chemical has just been introduced as a product in USA from 1999^[3]. As well, the active ingredient is not under patent.

In comparison with other common insect repellents, IR3535[®] has very low toxicity at equal efficacy^[15]. This chemical has been tested for a number of toxic risks and showed accepted side effects. Even though eye irritant and sometimes skin irritant may occur, it still exhibits an excellent skin tolerance and general safety^[3,16]. In 2001, the World Health Organization declared this repellent safe and effective for human use^[17].

The repellent effects of IR3535[®] and DEET against mosquitoes (*Culex*, *Anopheles* species) have shown comparable protection efficacy^[18]. Depending on mosquito species and testing method, IR3535[®] has demonstrated widely variable effectiveness with complete protection times ranging from 23 minutes to over 10 hours^[1,3,7,19,20]. It also provides up to 12 hours of protection against blacklegged ticks^[7].

Due to its interesting cosmetic properties (non-sticky, odorless), IR3535[®] can be used in various cosmetic formulations, such as aqueous alcoholic lotions, oil-in-water or water-in-oil emulsions, pump sprays, aerosols, roll-ons, gels, and creams^[21,15].

Repellent products containing alcohol are thought to be able to permeate deeper into the skin, which results in a faster loss of effectiveness^[4] and the rapid absorption of dermally applied IR3535[®] may lead to toxicity^[14]. Therefore, our research group has investigated to develop an alcohol-free formulation of IR3535[®] that allows better efficacy and safety.

Despite currently used in over 150 consumer products worldwide, there are few documents related to the validation of a IR3535[®] quantitative method reported in the literature^[16]. Thus, the aim of the present study was to develop and validate a simple and reliable HPLC method for quantification of IR3535[®] assay from a topical repellent formulation.

MATERIALS AND METHODS

Apparatus: The liquid chromatographic system included a Waters Alliance 2795 pump, an auto injector and a Waters 2996 UV DAD detector (Waters Corporation, USA). Integration of the detector output was performed using the Waters Empower[®]2 software (Waters Corporation, USA).

Chemicals and reagents: IR3535[®] was received from the Merck company. The formulations containing 8% or 10% (w/w) IR3535[®] were supplied by pharmaceuticals laboratory (ISPB, Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France) and were stored at room temperature. Methanol and formic acid of HPLC-quality grade were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Water purified through a Purelab[®] Option purifying system (ElgaLabWater) was used in all procedures.

HPLC conditions: Analysis of IR3535[®] was performed under isocratic elution, using a Kinetex[®] column, C18, 5 μ m, 4.6mm \times 150mm (Phenomenex, USA). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid (pH = 2.89) and methanol in a ratio of 40:60 v/v. The run time was set up at 10.0 min. Analysis was executed at room temperature (25 \pm 1 $^{\circ}$ C). Prior to injection, the column was equilibrated for 30 min with the mobile phase. Detection was set at 220 nm with a flow rate of 0.5 mL \cdot min⁻¹ and the volume of injection was 15 μ L.

Stock and working solutions: The stock solution was obtained by dissolving 22 μ L of IR3535[®] with purified water in a 250 mL flask to obtain a final concentration of 400 μ M. From the stock solution, working standard solutions of IR3535[®] were prepared in the range of concentration from 10 to 400 μ M to establish the calibration curve as well as to evaluate the precision and accuracy of the method. Dilutions were performed with water.

Preparation of alcohol-free formulation of IR3535[®]: The formulation was designed as alcohol-free lipidic nanoparticle liquid suspension. IR3535[®] was dispersed into oily phase consisted of different waxes, a solubilizing agent and surfactants. This oily phase is dispersed into an aqueous phase consisted of only water or water associated with a thickening agent.

Preparation of sample solution: To quantify IR3535[®] in a topical formulation, samples required dilution up to 1000-fold or 2000-fold (for formulation containing 8% or 10% IR3535[®], respectively) with regard to the linear range of the calibration curve. First, acetonitrile was added into a 5 mL flask contained 0.5 mL of the liquid formulation. Sample was then vortexed 5 min and centrifuged 10 min at 3000 rpm, 20 $^{\circ}$ C. Supernatant was filtered through a 0.20 μ m PTFE membrane (Phenomenex, USA). Subsequently, 1 mL of this solution was diluted 10 fold with mobile phase and vortexed 2 min. Finally, the above solution was diluted 10-fold or 20-fold with mobile phase for 8% and 10% IR3535[®]

formulations respectively and vortexed 2 min. The last solution was then injected into the column.

METHOD VALIDATION

The validation of the chromatographic method was carried out according to the procedures described in the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines^[22].

(a). Linearity: Linearity of proposed analytical method describes the relationship between analyte concentration in the sample and the peak area. In our study, the linearity was evaluated by analyzing IR3535[®] solutions at six concentration levels (10, 25, 50, 100, 200, 400 µmol/L) and in quadruplicate (n=4). Calibration curve was obtained from the least-squares regression model. For acceptance, a correlation coefficient (r^2) of 0.997 or better was required.

(b). Precision: Repeatability (intra-day) was obtained by measuring five replicates of quality control samples at 300, 150, 25 µM and the limit of quantification (LOQ) on the same day. Intermediate precision (inter-day) was verified by repeating the above procedure on five different days. Intra-day and inter-day precision were presented as relative standard deviation (RSD). The precision around the mean value should be equal or inferior to 15% for normal concentrations and to 20% for LOQ.

(c). Accuracy: Accuracy was expressed as a percentage error (PE) from the theoretical concentration. PE should not exceed 15% for the quality control samples, except for the LOQ which should not exceed 20%^[23,24].

(d). Limit of detection (LOD): To determine the LOD, the graphic approach was used. A signal-to-noise ratio of 3:1 is considered acceptable for estimating the detection limit^[22].

(e). Limit of quantification (LOQ): LOQ was determined during precision and accuracy evaluation. The acceptance criteria of these two parameters at LOQ are 20% for both RSD and PE. The LOQ was used as the smallest concentration on the calibration curve^[23].

RESULTS AND DISCUSSION

Method development: The aim of this work was to develop a simple and reproducible analytical method to determine the amount of IR3535[®] in topical formulations. Currently, only two publications related to the analysis of IR3535[®] were reported. One was

about the determination of IR3535[®] in biological samples from human subjects after dermal application^[14]. A ReproSil Pur ODS3 column (150 x 2 mm, 5µm) was used. Mobile phases consisted of 0.1% formic acid : methanol 40:60 (v/v) in a gradient elution mode. Flow rate is only 200µL/min but retention time of the compound of interest is more than 14 minutes. A triple stage quadrupole mass spectrometer was needed for quantification of IR3535[®] in biological materials.

The other method proposed consists in the determination of IR3535[®] in an insect repellent gel^[16]. A Hypersil ODS-C18 column, (250 x 4.6mm, 5µm) was used. The mobile phase was water: acetonitrile 40:60 (v/v), using gradient elution mode and UV detection. Retention time of IR3535[®] was 8 minutes with a flow rate of 1.0mL/min.

In our study, a Kinetex[®] C18 column (150 x 4.6mm, 5µm) was chosen. This stationary phase exhibited less band broadening compared to fully porous particles and thus results in better resolution, higher sensitivity and low back pressure^[25]. The optimal mobile phase composition was confirmed to be 0.1 % formic acid and methanol (40:60, v/v) as reported in the first paper^[14]. However, even using a simple isocratic elution mode, IR3535[®] was eluted in a shorter retention time (6.2 minutes). The choice of methanol versus acetonitrile contributes to reduce the cost of the analysis.

As shown in Figure-2 corresponding to the typical chromatogram of the repellent formulation containing 8% of IR3535[®], no interference of any excipients which are included in the formulation was observed. Compared to the only HPLC method reported in the literature for analysis of IR3535[®] in a gel formulation^[16], the method described is simpler and cheaper due to short time analysis and the use of methanol instead of acetonitrile.

Method parameters: A typical calibration curve within a range from 10 to 400 µM (n = 6) was obtained by the following linear regression line: $y = 3803.3x - 11218$ with a high correlation coefficient ($r^2 = 0.9999$) (Figure-3). Intra-day and inter-day precision and accuracy are shown in Table-1 and Table-2. All values fulfilled acceptance criteria proposed by the ICH guidelines. As shown in table 1 and table 2, RSD and PE were 6.60% and 6.68% for intra-day and 7.47% and 11.39% for inter-day measurements, respectively for a concentration of 10 µM. The LOQ was defined as 10 µM. LOD was found at 1 µM.

CONCLUSION

The described HPLC method using core-shell silica particles as stationary phase provided satisfactory outcomes with symmetric peak, high resolution from excipients in the formulation and low back pressure.

We have succeeded in finding out a suitable, simple and rapid HPLC method using an isocratic mode. With results of linearity, precision, and accuracy, this method may be adequately used for quantitative routine analysis of IR3535[®] in topical insect repellent liquid formulations.

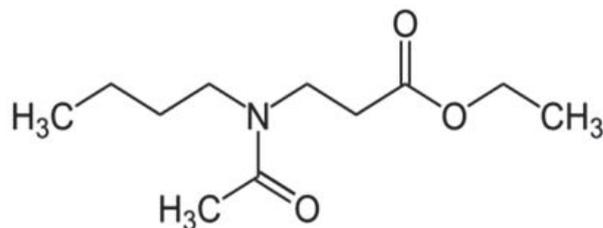


Fig-1: Structure of IR3535[®]

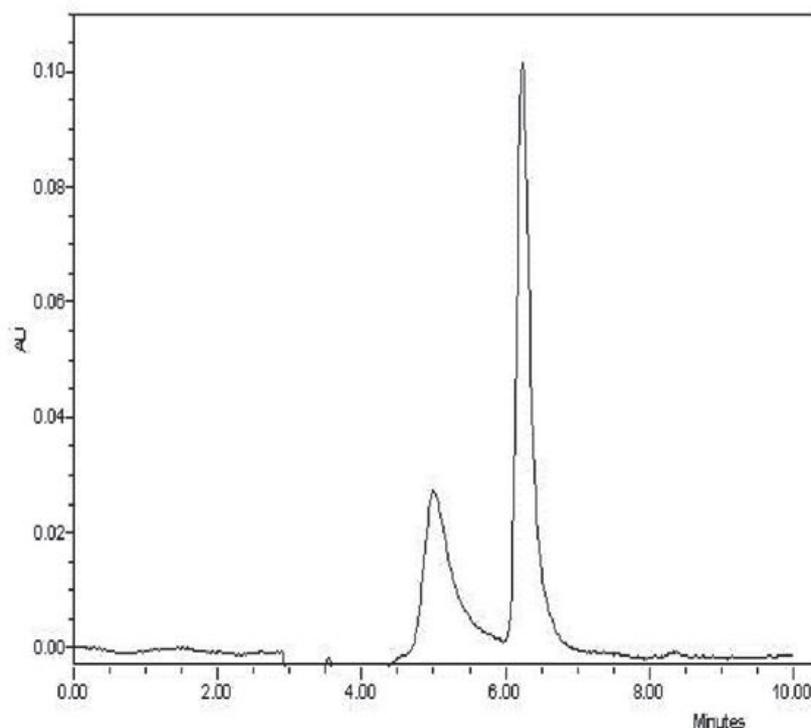


Fig-2: Chromatogram of IR3535[®] ($t_R=6.2mn$) in a topical 8% formulation.

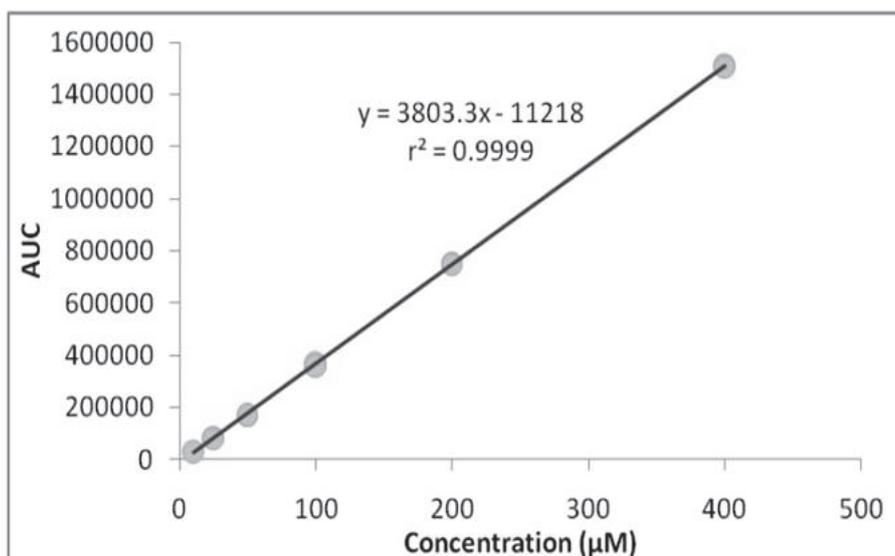


Fig-3: Calibration curve for IR3535[®]

Table-1: Intra-day precision and accuracy (n=5)

Theoretical conc. (µM)	Mean ± SD (µM)	RSD (%)	PE (%)
10	10.67 ± 0.70	6.60	6.68
25	25.30 ± 0.49	1.93	1.19
150	146.31 ± 1.71	1.17	2.46
300	296.31 ± 3.19	1.08	1.23

Table-2: Inter-day precision and accuracy (n=5)

Theoretical conc. (µM)	Mean ± SD (µM)	RSD (%)	PE (%)
10	11.14 ± 0.83	7.47	11.39
25	25.50 ± 0.83	3.27	2.01
150	143.67 ± 4.20	2.92	4.22
300	296.11 ± 3.11	1.05	1.30

REFERENCES

1. Fradin MS, Day JF. N Engl J Med, 2002; 347(1): 13–18.
2. McHugh CP. Lab Med, 1994; 25(7): 429–37.
3. Debboun M, Frances SP, Strickman D. Insect repellents: principles, methods and uses. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006. P. 405-414.
4. Lupi E, Hatz C, Schlagenhauf P. Travel Med Infect Dis, 2013; 11: 374–411.
5. Debboun M, Strickman D. Med Vet Entomol, 2013; 27: 1–9.
6. Brown M, Hebert AA. J Am Acad Dermatol, 1997; 36(2): 243–249.
7. Carroll SP. J Med Entomol, 2008; 45(4): 706–714.
8. Naucke TJ, Lorentz S, Grünewald HW. Int J Med Microbiol, 2006; 296 (S1): 230–232.

9. Semmler M, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KAS, Mehlhorn H. Parasitol Res, 2011; 108: 899–904.
10. Center for disease control and protection [Internet]. Atlanta: Protection against mosquitoes, ticks, & other insects & arthropods - Chapter 2 [updated 2013 Aug 1; cited 2014 Oct 14]. Available from: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2014/chapter-2-the-pre-travel-consultation/protection-against-mosquitoes-ticks-and-other-insects-and-arthropods>
11. US Environmental protection agency [Internet]: Insect repellents: use and protection times [updated 2013 Apr 10; cited 2014 Oct 14]. Available from: <http://cfpub.epa.gov/oppref/insect/>
12. Katz TM, Miller JH, Hebert AA. J Am Acad Dermatol, 2008; 58(5): 865–871.
13. Qiu H, Jun HW, McCall JW. J Am Mosquito Control., 1998; 14(1): 12–27.
14. Broschard TH, Bohlmann AM, Konietzny S, Schauer UMD, Dekant W. Toxicol Lett, 2013; 218: 246–252.
15. Marselos SC, Archontaki HA. J Chromatogr A, 2002; 946: 295–299.
16. World Health Organization [Internet]. Geneva: Specifications and evaluations for public health pesticides: Ethyl Butylacetylaminopropionate also known as IR3535®, 3-(N-acetyl-N-butyl) aminopropionic acid ethyl ester; 2006 [cited 2014 Oct 14]. Available from: http://www.who.int/whopes/quality/en/IR3535_eval_april_2006.pdf?ua=1
17. World Health Organization [Internet]. Geneva: Report of the 4th WHOPES working group meeting – IR3535, KBR3023, (RS)-methoprene 20% EC, pyriproxyfen 0.5% GR and lambda-cyhalothrin 2.5%GS; 2001 [cited 2014 Oct 14]. Available from: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/66683>
18. Thavara U, Tawatsin A, Chompoonsri J, Suwonkerd W, Chansang UR, Asavadachanukorn P. J Am Mosquito Control, 2001; 17(3): 190–195.
19. Barnard DR, Xue RD. J Med Entomol, 2004; 41(4): 726–730.
20. Tawatsin A, Asavadachanukorn P, Thavara U, Wongsinkongman P, Bansidhi J, Boonruad T, et al. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2006; 37(5): 915–931.
21. Merck performance [Internet]. Merck performance materials - Insect repellent IR3535: compatibility and formulations [updated 2013 Jan 24; cited 2014 Oct 14]. Available from: http://www.merck-performance-materials.com/en/cosmetics/dermacosmetics/ir3535_compatibility_and_formulations/ir3535_compatibility_and_formulations.html
22. International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human uses [Internet]. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1), 2005 [cited 2014 Oct 14]. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
23. Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. J Chromatogr B 1996; 686(1):3–10.
24. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Forensic Sci Int, 2007; 165: 216–224.
25. Hayes R, Ahmed A, Edge T, Zhang H. J Chromatogr A, 2014; 1357: 36-52