



HAL
open science

Apport de la physico-chimie de surface dans la compréhension des interactions entre la peau et son environnement et entre la peau et les produits cosmétiques

Florine Eudier

► **To cite this version:**

Florine Eudier. Apport de la physico-chimie de surface dans la compréhension des interactions entre la peau et son environnement et entre la peau et les produits cosmétiques. Chimie organique. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMMLH33 . tel-02417044

HAL Id: tel-02417044

<https://theses.hal.science/tel-02417044v1>

Submitted on 18 Dec 2019

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

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



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie

Préparée au sein de l'Université Le Havre Normandie

**Apport de la physico-chimie de surface dans la compréhension
des interactions entre la peau et son environnement et entre
la peau et les produits cosmétiques**

**Présentée et soutenue par
Florine EUDIER**

**Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2018
devant le jury composé de**

Mme. Sylvie BEGU	Maître de conférences HDR, Université de Montpellier	Rapporteur
M. Azeddine DRIOUICH	Professeur, Université Rouen Normandie	Examineur
M. Michel GRISEL	Professeur, Université le Havre Normandie	Co-Directeur de thèse
M. Alain MAVON	Directeur Science et Innovation, Oriflame Cosmetics	Examineur
M. Emile PEREZ	Directeur de recherche CNRS, Université Toulouse III – Paul Sabatier	Rapporteur
Mme. Céline PICARD	Maître de conférences HDR, Université le Havre Normandie	Directeur de thèse
Mme. Géraldine SAVARY	Maître de conférences HDR, Université le Havre Normandie	Examineur
M. Stéphane SERFATY	Professeur, Université de Cergy-Pontoise	Président
M. Luc LEFEUVRE	Directeur Recherche et Développement, Les Laboratoires Dermatologiques d'Uriage	Invité
M. Florent YVERGNAUX	Directeur Recherche et Développement Groupe Solabia	Invité

**Thèse dirigée par Céline PICARD, codirigée par Michel GRISEL et encadrée par Géraldine SAVARY,
Laboratoire URCOM**

Remerciements

Il est déjà venu le temps d'écrire les remerciements de mon manuscrit de thèse. La dernière étape, la dernière « pierre à l'édifice ». La fin de trois années passées au laboratoire URCOM. Ces trois années m'ont indéniablement fait grandir et évoluer, tant sur un plan professionnel que personnel. Au-delà des heures de recherches bibliographiques, d'essais en laboratoire, d'échecs, d'erreurs mais aussi de réussites, cette thèse m'aura permis de voyager à l'autre bout du monde et de rencontrer des personnes formidables. Et ce sont ces personnes, qui ont contribué de très près ou de loin à cette thèse, que je souhaite vivement remercier.

Tout d'abord, je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury de soutenance qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse : Madame Sylvie Bégu et Monsieur Emile Perez, qui ont accepté d'être rapporteurs, Messieurs Azeddine Driouich et Alain Mavon qui ont accepté d'être examinateurs. Je remercie Monsieur Stéphane Serfaty d'avoir accepté d'être Président du jury et d'avoir orchestré le bon déroulement de ma soutenance. Je remercie également les deux membres invités de mon jury, Luc Lefeuvre et Florent Yvergnaux, également partenaires du projet UrbaSkin, pour leur présence en ce jour très important pour moi et pour l'intérêt qu'ils ont montré pour mes travaux. Nos discussions lors de cette soutenance m'ont permis d'avoir de nouveaux éléments et ont mis en évidence toute l'étendue des perspectives de ces travaux de thèse.

Merci également à l'ensemble des partenaires du projet UrbaSkin, qui ont suivi et encouragé mes travaux. En particulier, merci à Giuseppe Percoco pour tous les échanges que nous avons pu avoir et pour sa disponibilité. Merci à tous les membres du projet avec qui j'ai pu échanger lors des réunions : Elian Lati, Angela Patatian, Laurence Nizard, Hichem Henrichi, Charlene Delacour, Yasmina Ramdani, Marine Di Giovanni. Une mention particulière pour Marie-Laure Follet Gueye, qui était également mon enseignante référente tout au long de ces trois années et qui a suivi de près l'avancée de mes travaux.

Ensuite, je souhaite bien évidemment remercier très (très) chaleureusement Céline Picard, ma directrice de thèse, Michel Grisel, mon co-directeur et Géraldine Savary, mon encadrante. Si j'en suis arrivée là, c'est pour sûr en grande partie grâce à vous ! Vous m'avez fait confiance dès le début, vous m'avez conseillée, guidée, aidée, accompagnée et bien plus encore. Vous m'avez également encouragée à participer à de nombreux congrès, ce qui fut très formateur et enrichissant pour moi. Si ce manuscrit marque la fin de mes trois années de recherche avec vous, je sais que nous avons encore beaucoup de discussions à mener pour porter un peu plus loin notre « invention » !

Un grand merci très mérité à Déborah Hirel, que j'ai eu la chance de recruter, former et encadrer durant presque 18 mois. Déborah m'a beaucoup aidé à réaliser toutes les analyses nécessaires à l'aboutissement de ce manuscrit. Son organisation, sa précision, son écoute m'ont été indispensables. Merci pour tout le travail que tu as fait. Et encore félicitations pour avoir réussi tes concours avec brio ! Je te souhaite plein de réussite dans ta nouvelle carrière à l'URCOM !

Un petit mot pour les étudiantes que j'ai encadré en projet tuteuré : Mégane, Mathilde, Juliette, Claire et Anne-Sophie. Merci pour le travail que vous avez réalisé sur ce projet « anti-pollution », j'espère que cela vous aura été bénéfique pour la suite et je vous souhaite une belle carrière !

Merci également aux membres du laboratoire qui m'ont aidé durant ces trois années de thèse. Un merci particulier à Nicolas Hucher pour son aide très précieuse en LC-MS. Tu as toujours été présent et à l'écoute. Ton expertise m'a permis d'avancer sur beaucoup de problématiques de mon sujet, grâce à tes remarques et conseils toujours pertinents. Merci à Vincent Loisel, que l'on m'a présenté comme le « MacGyver » du labo, et qui ne déroge pas à sa réputation ! Tu es toujours présent pour nous aider, dans la bonne humeur (même lorsque l'on a fait tomber la nacelle dans le four de l'ATG ...) ! Merci aussi pour les montages farfelus que tu as pu réaliser pour m'aider dans le développement de mes protocoles.

Merci à Odile et Faustine toujours présentes et attentives, Marie Jo, Catherine J, Sébastien (on peut dire que j'aurais été un bon public pour tes blagues durant ces trois années !), Frédéric (même si ce fut une courte période), Catherine M, Vincent D, Martin, Mohammed et Nathalie. Merci également à Sandrine et Valérie pour leur aide dans la gestion des problématiques administratives, toujours pleines de rebondissements !

Une grosse pensée à l'ensemble des AJER et post-docs que j'ai croisé durant mon doctorat. Laura G, la référence, la bible ... (merci pour ton manuscrit, qui m'a beaucoup inspiré ! Et merci pour ta présence le jour de ma soutenance), Alexandre P, Lucie, Omar et Maria. Un merci particulier à Ecaterina, pour nos discussions et moments passés ensemble. Bonne poursuite à l'URCOM et dans ta vie perso avec Denis et tes deux petits anges. Bonne chance également à Livia qui reprend avec un nouveau regard la suite du projet UrbaSkin !

Passons maintenant à tous les doctorants rencontrés durant cette thèse et qui ont partagé mon quotidien. L'ancienne génération : un grand merci à Pauline pour ton accueil au laboratoire, et ton initiation à l'ambiance Urcomienne dès le premier jour ! Merci à Laura R, Thomas, Julien, Philippe pour les moments passés ensemble et qui me paraissent déjà si loin ! Un grand grand grand merci à Daria, passée de doctorante

à post-doc, pour tous tes conseils, que ce soit sur les manips, les présentations ou la rédaction, mais aussi pour ta générosité incomparable. On aura fait une super team dans le bureau de rédaction ! Une grande pensée pour Alex et Fanny, les successeurs. Bon courage pour cette dernière année, ce n'est pas aussi terrible que ça en a l'air ... promis ! Et aux petits « jeunes » (enfin ... parfois plus vieux que moi !) Clément, Samy, Charbel, Ismaïl et Elodie, merci d'avoir contribué à l'ambiance du labo et à ma dernière année de thèse, passée si vite ! Un merci tout particulier à Céline, avec qui j'ai partagé toutes les étapes du doctorat, presque jusqu'à soutenir le même jour ! Je n'oublierai pas nos pauses « avez-vous déjà vu ? », nos nombreuses discussions chats, vacances, recrutement, nos plaintes parce que « la thèse c'est long, c'est dur, vivement que ce soit fini », même si on sait que l'on finira par être nostalgiques de cette période de nos vies.

Enfin, je tiens bien évidemment à remercier toute ma famille et mes amis pour leur présence à mes côtés, indispensable pour traverser cette étape. Et cette fois-ci, c'est vraiment fini les études ! En particulier, merci à mes parents, qui m'ont toujours encouragée et qui ont tout fait pour que je réussisse. Mon retour au Havre est déjà sur le point de se terminer, mais je ne repars pas très loin ! Merci à ma sœur Lucie, à Camille, et à leurs deux rayons de soleil, Théotime et Maxence. Les trois ans de Théotime seront une journée que l'on ne risque pas d'oublier !

Merci à Laetitia, Elsa et Eléa, qui me soutiennent depuis tellement d'années qu'il vaut mieux ne plus les compter. Merci d'être vous et d'être toujours là. Merci également au CPéens et aux docteurs CPéens qui ont vécu la même « galère ». Maintenant que je reviens sur Paris, j'espère que vous n'allez pas tous partir !!

Pour finir cette longue liste de remerciements, merci à Julien, merci d'avoir supporté et encouragé ta petite étudiante jusqu'au bout. Et vivement cette nouvelle vie qui nous attend ! ♥

Table des matières

Table des matières	9
Abréviations	16
Table des figures	17
Table des tableaux	21
Introduction du travail de thèse	23
PARTIE 1 – Synthèse bibliographique	31
Introduction	33
Chapitre 1 – Impact des polluants atmosphériques sur la peau humaine	35
I. La peau humaine : un matériau multicouche et fonctionnel.....	35
I.1. Structure de la peau.....	35
I.2. Propriétés des lipides du stratum corneum et du sébum.....	38
I.3. Intégrité de la fonction barrière et hydratation de la peau.....	41
I.4. Propriétés mécaniques	45
II. La pollution urbaine : un stress environnemental majeur pour la peau.....	47
II.1. Contexte actuel.....	47
II.2. Les principaux polluants atmosphériques	48
II.3. Mise en évidence expérimentale de l'impact de polluants sur la peau.....	50
III. Conséquences des effets de la pollution sur la peau	52
III.1. Mécanismes d'action des polluants.....	52
III.2. Accélération du vieillissement cutané.....	54
III.3. Aggravation des désordres cutanés	55
III.4. Altération des paramètres physiologiques.....	56
IV. Conclusion du chapitre	56
Chapitre 2 – Etude de la physico-chimie de surface de la peau	59

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue bibliographique intitulée « ***Skin surface physico-chemistry : characteristics, methods of measurement, influencing factors and future developments*** » dont le plan est présenté ci-dessous.

Introduction

I. Methods for measuring surface physico-chemical properties

I.1. Surface free energy

I.2. Contact angle measurements

I.3. Physico-chemical parameters: critical surface tension, polarity, hydrophobia

II. *In vivo* measurements of skin physico-chemical parameters

II.1. Skin surface free energy and physico-chemical parameters

II.2. Impact of lipids on skin surface physico-chemistry

II.3. Influence of skin hydration state

II.4. Comparison with *ex vivo* measurements

III. Important properties involved in diverse research areas: from tribology to cosmetic and sensory aspects

III.1. Impact of skin physico-chemistry on its adhesive behavior

III.2. Impact of ingredients on skin hydrophobia: pharmaceutical and cosmetic application

III.3. Emollients and emulsion physico-chemistry: impact on sensory perceptions

IV. Modeling of skin surface physico-chemistry: which interest for future developments?

IV.1. Interest of modeling skin using non-biological surface

IV.2. Existing models and uses

IV.3. Characterization of two commercial skin models

IV.4. Perspectives

Chapitre 3 – Conclusion générale et définition des objectifs de la thèse.....101

I. Importance de l'approche physico-chimique dans la compréhension de l'impact des polluants atmosphériques sur la peau..... 101

II. Problématique du choix du modèle d'étude 102

III. Définition des objectifs de la thèse.....103

PARTIE 2 – Matériels et méthodes..... 107

Introduction.....109

Chapitre 1 – Modèles d'études.....	111
I. Le modèle d'explants de peau humaine.....	111
I.1. Préparation des plasties.....	111
I.2. Conditions de maintien en survie des explants	111
I.3. Mise sous tension mécanique des explants	112
II. Modèles non-biologiques étudiés.....	113
II.1. Modèles commerciaux Vitroskin® et Bioskin®	114
II.2. Principe du modèle développé au laboratoire : la Surfaskin®	115
III. Conclusion du chapitre	118
Chapitre 2 – Caractérisations instrumentale et sensorielle de surface	121
I. Mesures de l'angle de contact et d'énergie libre de surface.....	121
I.1. Mesure de l'angle à l'avancée.....	121
I.2. Liquides de références et calcul d'énergie libre de surface	122
I.3. Etude de l'étalement d'émollients sur les modèles d'études.....	123
I.4. Analyse physico-chimique du film résiduel d'ingrédients cosmétiques	124
II. Méthodes d'analyse complémentaires	125
II.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	126
II.2. Perte insensible en eau et pH surfacique.....	128
II.3. Caractérisation du microrelief des modèles non-biologiques.....	129
III. Caractérisation sensorielle du film résiduel de produits cosmétiques.....	131
III.1. Choix des descripteurs, définitions et protocoles.....	131
III.2. Sélection de produits à étudier.....	133
III.3. Recrutement et entraînement du panel	133
III.4. Conditions des tests et évaluation des produits	135
IV. Conclusion du chapitre	136
Chapitre 3 – Etude de polluants atmosphériques	137
I. Protocole d'exposition <i>ex vivo</i>	137
II. Vieillessement du squalène en présence de polluants	138

II.1. Conditions d'exposition	139
II.2. Méthodes d'analyse	139
III. Protocole d'évaluation de l'adhésion de particules sur la peau	142
III.1. Choix des particules et caractérisation.....	143
III.2. Protocole d'exposition et d'analyse	145
IV. Conclusion du chapitre	147
Chapitre 4 – Outils statistiques.....	149
I. Analyse de la variance (ANOVA).....	149
II. Analyse en composantes principales	149
III. Etablissement de corrélation et de modèles prédictifs	151
Conclusion.....	155
PARTIE 3 – Résultats et discussion	157
Introduction.....	159
Chapitre 1 – Mise en place d'un nouveau modèle d'étude des propriétés de surface de la peau.....	161

Ce chapitre a fait l'objet d'un article intitulé « *Design of a lipid coated polymeric material mimicking human skin surface properties: A performing tool to evaluate skin interaction with topical products* » dont le plan est présenté ci-dessous.

Introduction

I. Material and methods

I.1. Chemicals used

I.2. Study models

I.3. Surface characterization of non-biological skin models

I.4. Contact angle measurements and surface free energy calculation

I.5. Physico-chemical study

II. Results and discussion

II.1. Optimization of sebum coating on the non-biological skin model (NBSM)

II.2. Surface properties characterization of Vitroskin® and NBSM

II.3. Physico-chemical study of topical ingredients and emulsions: comparison with *in vivo* skin

Conclusion

Chapitre 2 – Compréhension de l’effet de polluants sur les propriétés de surface de la peau.....191

- I. Oxydation de lipides en présence de polluants atmosphériques : impact sur la physico-chimie de la peau191

Cette partie a fait l’objet d’une publication intitulée « ***Squalene oxidation induced by urban pollutants: impact on skin surface physico-chemistry*** » dont le plan est présenté ci-dessous.

Introduction

I. Material and methods

- II.1. Chemicals used
- II.2. Protocols of exposure
- II.3. Analyses methods
- II.4. Statistical analysis

II. Results and discussion

- III.1. Squalene ageing in presence of urban pollutants
- III.2. Impact of squalene oxidation on skin physico-chemistry

Conclusion

- II. Effet de la fumée de cigarette sur explants de peau humaine219
 - II.1. Impact de la fumée de cigarette sur la fonction barrière : mise en évidence chimique et physico-chimique219
 - II.2. Comparaison avec les résultats obtenus sur Surfaskin224
- III. Conclusion du chapitre227

Chapitre 3 – Etude de l’impact de produits cosmétiques sur les propriétés de surface de la peau : de nouvelles stratégies pour protéger la peau contre les polluants atmosphériques.....229

- I. Mise en évidence du film résiduel de produits cosmétiques.....231
 - I.1. Analyse physico-chimique de la peau in vivo après application de produits cosmétiques : présence d’un film résiduel (étude préliminaire)231
 - I.2. Mise en place d’un modèle prédictif pour l’étude physico-chimique du film résiduel236

II.	Caractérisation sensorielle du film résiduel après application de produits.....	242
II.1.	Analyse sensorielle du film résiduel in vivo et sur modèles non-biologiques ..	243
II.2.	Apport méthodologique de l'étude de surfaces non-biologiques : développement d'une méthode 100% instrumentale pour prédire une propriété sensorielle résiduelle	247

Cette partie a fait l'objet d'une publication intitulée « **Prediction of residual film perception of cosmetic products using an instrumental method and non-biological surfaces: the example of stickiness after skin application** » dont le plan est présenté ci-dessous.

Introduction

I. Materials and methods

- I.1. Studied cosmetic products and raw materials
- I.2. Non-biological skin surfaces
- I.3. Sensory analysis
- I.4. Texture analyzer measurements
- I.5. Statistical analysis

II. Results and discussion

- II.1. *In vivo* sensory perception of film stickiness: protocol validation
- II.2. Sensory evaluation of film stickiness on artificial surfaces: choice of the most performing surface
- II.3. Prediction of film stickiness using non-biological skin model: 100% instrumental measurements

Conclusion

II.3.	Lien entre propriétés instrumentales et sensorielles du film résiduel	269
III.	Lien entre les propriétés du film résiduel et l'adhésion de particules	272
III.1.	Adhésion de particules après application de produits cosmétiques	273
III.2.	Lien entre adhésion et physico-chimie du film résiduel	279
III.3.	Apport du modèle BS dans la compréhension de l'adhésion des particules ...	283
IV.	Conclusion du chapitre	286
	Conclusion de la thèse et perspectives.....	289
	Références bibliographiques	297
	Annexes.....	311

Annexe 1. Récapitulatif des différentes études menées concernant l'effet de divers polluants sur la peau.....	313
Annexe 2. Propriétés physico-chimiques et %AP des films résiduels des 11 produits étudiés.....	321

Abréviations

B(a)P : Benzo(a)pyrène

BS : Bio Skin Plate #30

DIM : Diiodométhane

FAS : Surfaskin exposée à la fumée de cigarette

FSS : Surfaskin sans sébum exposée à la fumée de cigarette

HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique (PAH en anglais pour Polycyclic Aromatic hydrocarbon)

LNP : Lumière Non Polarisée

LP : Lumière Polarisée

PIE : Perte Insensible en Eau (TEWL en anglais pour Trans Epidermal Water Loss)

PM : Particule de Matière (PM en anglais pour Particulate Matter)

SC : *Stratum Corneum*

SFS : Surfaskin (modèle non-biologique de peau développé au laboratoire)

TAS : Surfaskin témoin

TSS : Surfaskin sans sébum témoin

UV : Ultraviolet

VS : Vitroskin®

Table des figures

Figure 1. Schématisation des objectifs du projet UrbaSkin et interventions des différents partenaires.	26
Figure 2. Schéma de la peau humaine, du stratum corneum jusqu'au derme papillaire	35
Figure 3. Schéma du SC, adapté de (Proksch, Brandner, and Jensen 2008).	37
Figure 4. Organisation latérales des lipides (adapté de (Boncheva 2014; Mendelsohn, Flach, and Moore 2006)).	40
Figure 5. Fonction barrière de la peau, extrait de (Netzlaff et al. 2005)	42
Figure 6. Illustration de la barrière « chimique » à double sens de la peau	43
Figure 7. Mise en évidence de l'état de pré-tension de la peau in vivo (adapté de (Remache 2013))	46
Figure 8. Microrelief cutané (extrait de (Lagarde, Rouvrais, and Black 2005))	46
Figure 9. Conséquences de facteurs environnementaux sur le vieillissement prématuré de la peau (extrait de (Vierkötter and Krutmann 2012)).....	55
Figure 10. Le film résiduel cosmétique : peut-on expliquer le phénomène anti-adhésion de particules à partir de ses propriétés ?	104
Figure 11. Méthodologie développée pour répondre aux objectifs du projet Urbaskin.	105
Figure 12. Préparation et analyse des explants de peau humaine.....	112
Figure 13. Photographies d'explants (a1) dans un support classique non tendu et (b1) dans un support spécifique de maintien sous tension mécanique accompagnées des images de mesures de l'angle de contact avec l'eau réalisées avec ces deux supports (Goniomètre PGX+, Scangaule, Gravigny, France)	113
Figure 14. Concept de la surface développée au laboratoire : support synthétique recouvert d'un revêtement lipidique.....	115
Figure 15. Préparation du support polymérique avec une topographie similaire à la peau in vivo	116
Figure 16. Mesure de l'angle de contact à l'avancée	122
Figure 17. Caractérisation du film résiduel grâce aux mesures de l'angle de contact	124
Figure 18. Différents modes de vibrations : exemple des vibrations des groupements CH_2 d'une molécule (extrait de (Dalibart and Servant 2000)).....	126
Figure 19. Principe de la mesure en réflexion totale atténuée (adapté de (Dalibart and Servant 2000)).....	127
Figure 20. Evolution de la longueur d'onde $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ en fonction de la température et de l'organisation latérale des bicouches lipidiques (adapté de (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006)).....	128
Figure 21. Représentation du principe de la mesure de PIE à l'aide d'un Tewamètre® (issue de ("Tewameter® TM 300 - Courage - Khazaka Electronic, Köln" 2018)).....	129
Figure 22. Exemple d'images microscopiques obtenues (transmission, Gx50) (a) support Dragonskin20® moulé sans lipides, (b) SFS avec un dépôt de lipides homogène (c) SFS avec un excès de lipides dans les sillons du microrelief	130
Figure 23. Exemple d'images obtenues en microscopie numérique (a) SFS (b) VS.....	130
Figure 24. Phase d'évaluation de la texture d'un produit cosmétique	131

<i>Figure 25. Génération d'un nuage de pollution au sein de la Pollubox® par nébulisation d'une solution de polluants, injection de fumée principale de cigarette ou génération d'ozone</i>	<i>137</i>
<i>Figure 26. Structure chimique du squalène de formule C₃₀H₅₀.....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 27. Principaux éléments constituant l'appareillage LC-MS.....</i>	<i>141</i>
<i>Figure 28. Granulométrie (répartition en volume) des particules modèles pigments 1 et pigments 2 après tamisage, en comparaison avec les particules de diesel 1650 de référence (sans ultrasons (US), après 1h d'ultrasons et après 24h d'ultrasons).....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 29. Energie libre de surface et ses composantes calculées pour les particules 1 et 2</i>	<i>145</i>
<i>Figure 30. Protocole d'exposition aux particules modèles</i>	<i>146</i>
<i>Figure 31. Exemples d'analyse d'image réalisée à l'aide d'ImageJ</i>	<i>147</i>
<i>Figure 32. Exemple de projection obtenue par ACP : (a) représentation de 4 variables Vi dans le système d'axes F1 et F2 (b) représentation de 5 échantillons Ei dans ce nouveau système d'axes</i>	<i>150</i>
<i>Figure 33. Illustration de la validation croisée à k segments</i>	<i>152</i>
<i>Figure 34. Superposition des spectres RMN ¹H (a) du squalène avant vieillissement et 15 jours après vieillissement dans les conditions (E) ; (b) du squalène avant vieillissement et 45 jours après vieillissement dans les conditions (L).....</i>	<i>192</i>
<i>Figure 35. Spectres RMN ¹H de (a) S1E et S3E après 15 jours dans les conditions (E) et (b) S1L et S3L après 45 jours dans les conditions (L) : effet du protocole de vieillissement</i>	<i>194</i>
<i>Figure 36. (a) Angle de contact à l'avancée avec l'eau, le DIM et le formamide mesurés sur explants témoins et traités par la fumée de cigarette (b) Paramètre d'énergie libre déterminé grâce au modèle de Van Oss.....</i>	<i>221</i>
<i>Figure 37. Représentation schématique de l'impact de la fumée de cigarette sur la fonction barrière de la peau : bilan des observations réalisées.....</i>	<i>224</i>
<i>Figure 38. Représentation des différents lots de SFS de cette étude : modifications physico-chimiques dues au dépôt de fumée et/ou à l'oxydation lipidique.</i>	<i>225</i>
<i>Figure 39. Mesures de l'angle de contact réalisées sur les 4 lots de SFS, avec et sans sébum, témoin et traité par la fumée de cigarette.</i>	<i>226</i>
<i>Figure 40. Mise en évidence et caractérisation du film résiduel de produits cosmétiques : une nouvelle méthodologie d'étude.....</i>	<i>230</i>
<i>Figure 41. Angles de contact avec l'eau (°) mesurés 3 min après application de produits cosmétiques</i>	<i>232</i>
<i>Figure 42. Représentation schématique du film résiduel d'une émulsion hydrophile et d'une émulsion lipophile : conséquence sur la mouillabilité de la peau.....</i>	<i>233</i>
<i>Figure 43. Spectres infrarouges enregistrés in vivo 3 min après application de produits cosmétiques</i>	<i>234</i>
<i>Figure 44. Spectres infrarouges enregistrés 3 min (en noir) et 1h (en rouge) après application de (a) l'émollient I1 (b) d'une émulsion huile/eau et (c) d'une émulsion eau/huile ; en comparaison avec la peau nue (en gris) .</i>	<i>235</i>
<i>Figure 45. Corrélations obtenus entre les mesures réalisées in vivo et (a) sur SFS, (b) sur VS et (c) sur BS.....</i>	<i>237</i>
<i>Figure 46. Spectres infrarouges obtenus 3 min après application d'une émulsion H/E (en noir) en comparaison à la surface nue (en gris).....</i>	<i>238</i>

Figure 47. Mesures de l'angle de contact avec l'eau, le DIM et le Formamide 3 min après application des 11 produits étudiés (vert : produits capillaires ; bleu : émulsions H/E ; gris : émollient ; rouge : émulsion E/H)	240
Figure 48. ACP réalisée sur les grandeurs physico-chimiques caractéristiques des films résiduels.....	241
Figure 49. Spectres obtenus après application des produits P2, P3, P5, P6 ; P7 et P8 sur BS (zoom sur la zone d'intérêt entre 2417 et 3991 cm^{-1})	241
Figure 50. Résultats du test de classement des trois surfaces selon les descripteurs Rugueux, Collant et Brillant (indication statistique par rapport à la peau in vivo).....	244
Figure 51. Notes obtenues pour chaque produit sur chaque surface (indication statistique par rapport à la peau in vivo).....	245
Figure 52. Corrélation entre les notes de « collant » obtenues in vivo et sur (a) SFS (b) BS.....	246
Figure 53. Corrélation entre la perception sensorielle de collant sur SFS et ϑ_{eau} mesuré après application de produit.....	270
Figure 54. Schéma du Frictionmètre® et exemple de mesure in vivo (extrait de https://www.courage-khazaka.de)	270
Figure 55. Explication du phénomène de collant sensoriel par les propriétés instrumentales du film résiduel ..	271
Figure 56. Exemple d'images microscopiques obtenues 3 min après application de différents produits et exposition aux pigments 1 et 2. (PN : Peau Nue)	273
Figure 57. %AP 3 min après application de 11 produits et sur peau nue (PN) pour les deux pigments 1 et 2, calculé sur SFS	274
Figure 58. Représentation des %AP pigments 1 et %AP pigments 2 (en bleu) sur l'ACP des 5 variables physico-chimiques caractérisant les films résiduels des 11 produits cosmétiques(en rouge)	275
Figure 59. Représentation du ratio travail d'adhésion des pigments 1 sur les films résiduels / travail d'adhésion des pigments 2 sur les films résiduels	276
Figure 60. %AP 3 min et 1h après application de 11 produits (a) pour le pigment 1 (b) pour le pigment 2, calculé sur SFS	277
Figure 61. Comparaison des images des surfaces exposées aux pigments 1 par rapport à la peau in vivo.....	278
Figure 62. Possible influence du microrelief sur l'adhésion des particules.....	279
Figure 63. Etude de corrélation entre l'adhésion des pigments 1 sur la SFS et le collant résiduel mesuré (a) sensoriellement et (b) instrumentalement sur SFS.....	280
Figure 64. Prédiction du %AP Pigments 1 à partir d'une variable sensorielle et d'une variable physico-chimique	281
Figure 65. Prédiction du %AP Pigments 2 à partir de deux variables physico-chimiques.....	282
Figure 66. Exemple de calcul d'aire absorbée entre les longueurs d'ondes 2995 cm^{-1} et 2800 cm^{-1}	283
Figure 67. Corrélation entre une grandeur instrumentale de composition chimique et le %AP pigment 1 mesuré sur BS.....	284
Figure 68. Prédiction du %AP des pigments 1 sur BS grâce à une grandeur physico-chimique et à la teneur en lipides du film résiduel.....	285

Figure 69. Compréhension du phénomène d'adhésion des pigments 1 mesurée sur BS par rapport à la chimie et la physico-chimie des films résiduels..... 286

Table des tableaux

<i>Tableau 1. Composition des lipides épidermiques, adapté de (Peter and Elias 1983)</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 2. Localisation des propriétés barrières au sein du SC (adapté de (Elias 2005))</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 3. Composition du NMF (Verdier-Sévrain and Bonté 2007).....</i>	<i>44</i>
<i>Tableau 4. Composition du mélange de lipides sébacés</i>	<i>117</i>
<i>Tableau 5. Valeur des composantes d'énergie libre des liquides de références utilisés.....</i>	<i>123</i>
<i>Tableau 6. Emollients utilisés pour les mesures de l'angle de contact.....</i>	<i>123</i>
<i>Tableau 7. Produits cosmétiques utilisés pour comparer les modèles non-biologiques et la peau in vivo (H/E : huile dans eau ; E/H : eau dans huile)</i>	<i>125</i>
<i>Tableau 8. Paramètres de rugosité de surface (ISO 25178).....</i>	<i>130</i>
<i>Tableau 9. Nom commercial, code et usage des différents produits analysés.....</i>	<i>133</i>
<i>Tableau 10. Définition et protocole d'évaluation des descripteurs utilisés pour comparer les surfaces avant application de produit.....</i>	<i>134</i>
<i>Tableau 11. Conditions de vieillissement du squalène et mélanges étudiés</i>	<i>139</i>
<i>Tableau 12. Tension de surface des 4 émoullients testés et valeur de l'angle de contact avec l'eau après application</i>	<i>233</i>
<i>Tableau 13. Paramètres d'énergie libre des deux particules modèles</i>	<i>272</i>

Introduction du travail de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet UrbaSkin, sélectionné lors du 20^{ème} appel à projets FUI (Fond Unique Interministériel), porté par le Laboratoire BIO-EC. Il s'agit d'un projet collaboratif faisant intervenir des partenaires à la fois académiques et industriels possédant diverses compétences dans le domaine de la biologie ou de la chimie. Ce projet vise à répondre à de nouvelles problématiques de l'industrie cosmétique. En effet, depuis plusieurs années, l'impact de la pollution urbaine sur la peau préoccupe de plus en plus les consommateurs, essentiellement en Asie, conduisant les industries cosmétiques à développer de nouveaux produits capables de protéger la peau de cette pollution. Cette tendance a été démontrée par une étude Mintel, spécialiste de l'étude de marché et des tendances mondiales : en Asie Pacifique, le nombre de produits présentant une revendication anti-pollution a augmenté de 63% entre 2011 et 2013, et cette tendance s'est poursuivie jusqu'à aujourd'hui.

La pollution urbaine fait partie des différents stress abiotiques auxquels doit faire face notre organisme quotidiennement (variation de température, radiations ultraviolettes (UV), microorganismes ...). La peau étant l'organe externe du corps humain, elle agit en tant que barrière protectrice contre ces différents stress. Si l'effet des radiations UV sur la peau est aujourd'hui pleinement documenté (Ichihashi et al. 2003; Jiang et al. 2006; Biniek, Levi, and Dauskardt 2012; Merle, Laugel, and Baillet-Guffroy 2010; Rittié and Fisher 2002), les mécanismes mis en jeu en présence de polluants atmosphériques ne sont pas clairement définis. Ainsi, les objectifs du projet UrbaSkin sont multiples.

Dans un premier temps, l'un des objectifs du projet sera de développer un modèle d'exposition *ex vivo* à la pollution, recréant au mieux les conditions d'exposition réelles des individus. Ensuite, ce protocole d'exposition, défini en collaboration avec le laboratoire BIO-EC, devra permettre de mettre en évidence les paramètres biologiques et chimiques impactés par les polluants. Enfin, il faudra développer à partir de ces résultats de nouveaux actifs et de nouvelles formules cosmétiques, capables de protéger la peau de ces agressions. Ces objectifs sont répartis entre les différents partenaires du projet, comme illustré sur la Figure 1. L'originalité de l'approche UrbaSkin réside dans une analyse multiparamétrique et multi-échelle de l'effet des polluants. En amont du projet, les laboratoires BIO-EC et GlycoMev réaliseront une analyse histologique et microscopique afin de mettre en évidence les marqueurs moléculaires cutanés impactés par le stress polluants, sur explants de peau humaine (*ex vivo*). Leurs analyses seront complétées par les approches transcriptomiques développées par Genex qui, par analyses *in silico*, caractériseront les mécanismes génétiques impliqués dans la réponse aux polluants. Enfin, le laboratoire URCOM apportera son expertise en physico-chimie pour caractériser l'impact des polluants sur la surface de la peau. La mise en commun de l'ensemble des résultats

permettra d'une part de caractériser de façon complète les processus développés par la peau en réponse au stress exercé par les polluants. D'autre part, cela permettra de faire le lien entre différents niveaux d'approche et de valider les études histologiques et génomiques par l'observation de phénomènes surfaciques.

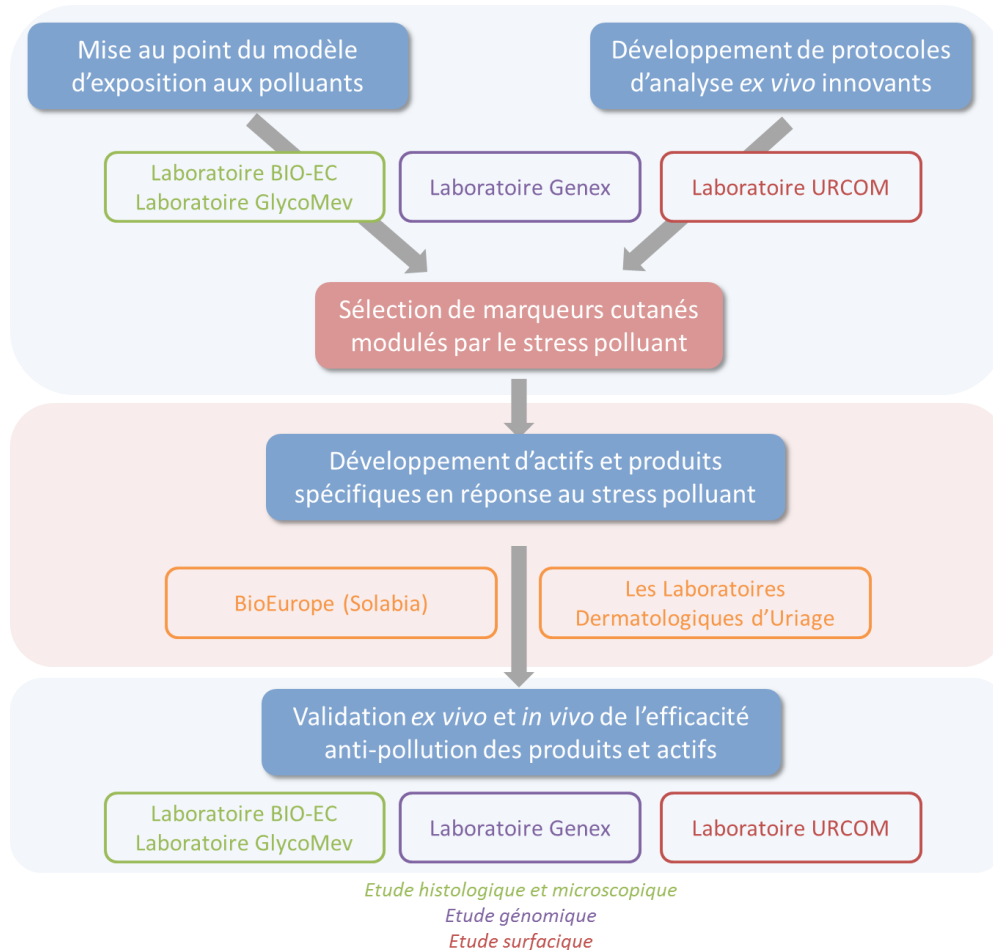


Figure 1. Schématisation des objectifs du projet UrbaSkin et interventions des différents partenaires.

La mise en évidence des effets des polluants permettra ainsi de développer des actifs et formules ciblés, agissant sur un ou plusieurs paramètres impactés par les polluants. Cette tâche sera réalisée par les équipes de recherche de BioEurope, filiale R&D du groupe Solabia, et par les Laboratoires Dermatologiques d'Uriage. Des tests seront réalisés sur des produits existants afin de sélectionner les actifs et les bases de formules les plus efficaces, puis de nouveaux produits seront mis au point. L'ensemble de ces nouvelles formules sera évalué par les autres partenaires du projet afin de valider leur efficacité de protection contre les polluants, grâce aux protocoles mis au point.

Le rôle du laboratoire URCOM au sein de ce projet s'inscrit pour l'essentiel dans les objectifs de cette thèse. L'approche innovante développée, axée sur l'étude des propriétés de surface de la peau, notamment chimiques et physico-chimiques, apportera des outils afin

de mettre en évidence et de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de l'exposition aux polluants mais aussi pour comprendre comment les produits cosmétiques peuvent agir en surface pour protéger la peau des polluants.

Ainsi, ce manuscrit de thèse est organisé en trois parties :

- *Partie 1 : Synthèse Bibliographique*

Cette partie se focalisera dans un premier temps sur la mise en évidence de l'effet des polluants sur la peau à partir des études déjà réalisées sur le sujet. L'objectif sera à partir de ces données de sélectionner les propriétés de surface de la peau les plus pertinentes pour l'étude. Une revue bibliographique concernant les propriétés physico-chimiques de surface de la peau, intitulée "**Skin surface physico-chemistry : characteristics, methods of measurement, influencing factors and future developments**" sera également présentée, suivi par une discussion sur la problématique de la modélisation des propriétés de surface de la peau. A partir de l'analyse de ces données bibliographiques, les objectifs de ces travaux de thèse seront détaillés.

- *Partie 2 : Matériels et méthodes*

Seront développés, dans cette partie, l'ensemble des protocoles, instrumentaux et sensoriels, mis au point pour l'étude de l'effet des polluants et pour l'étude de l'effet de l'application de produits cosmétiques. Les différents modèles de peau commerciaux utilisés seront présentés et la mise au point d'un nouveau modèle adapté à cette étude sera détaillée, le modèle innovant correspondant ayant fait l'objet d'une demande de brevet en août 2018 (réf EP18306149).

- *Partie 3 : Résultats et discussion*

Dans cette troisième et dernière partie, les résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse seront présentés, appuyés par plusieurs articles (publiés, en révision ou soumis).

Dans un premier chapitre, nous présenterons le développement d'un nouveau modèle de peau non-biologique capable de reproduire les propriétés chimiques, topographiques et physico-chimiques de la peau *in vivo*. Le concept de ce modèle, appelé Surfaskin, et le choix des matériaux utilisés seront présentés, suivi par l'article "**Design of a lipid coated polymeric material mimicking human skin surface properties: A performing tool to evaluate skin interaction with topical products**" qui décrira la mise au point et la validation de ce nouveau modèle non biologique de peau. La Surfaskin sera un outil clé dans la compréhension des phénomènes surfaciques liés à l'impact des polluants atmosphériques

sur la peau mais également un élément indispensable pour la caractérisation instrumentale de l'impact de produits cosmétiques sur la surface de la peau.

Dans un second chapitre, nous démontrerons l'effet des polluants sur la surface de la peau, grâce à l'utilisation de deux modèles de peau : la Surfaskin, modèle non-biologique, et les explants de peau humaine. La publication "**Squalene oxidation induced by urban pollutants: impact on skin surface physico-chemistry**" décrira les effets des polluants sur l'oxydation du squalène et sur les conséquences observées en termes de physico-chimie de surface sur la Surfaskin. Cet article nous permettra de mieux appréhender et comprendre les effets de polluants observés sur la surface des explants de peau.

Face aux effets importants de la pollution sur la peau mis en évidence dans le chapitre 2, le troisième chapitre présentera les stratégies développées pour protéger la peau des polluants. Nous avons notamment cherché à comprendre comment limiter le contact entre la peau et les composés toxiques grâce à des produits à effet barrière ou « anti-adhésion de particules ». De nombreuses questions ont été soulevées au cours de ce travail : comment évaluer l'effet « anti-adhésion de particules » ? Pourquoi un produit présente-t-il des propriétés anti-adhésion de particules ? Quelle(s) propriété(s) du produit explique(nt) cet effet ? Ce phénomène surfacique est-il relié au résidu laissé sur la peau après application de produit ?

Pour répondre à toutes ces questions, ce chapitre présentera une nouvelle méthodologie d'étude visant à caractériser ce résidu formé sur la peau après application, autrement appelé « film résiduel », grâce à des mesures instrumentales et sensorielles. Une partie de ces travaux sera présentée par la publication "**Prediction of residual film perception of cosmetic products using an instrumental method and non-biological surfaces: the example of stickiness after skin application**" qui décrit une méthode originale mise en place pour prédire la perception de collant après application de produits grâce à un protocole 100% instrumental. Une étude des propriétés anti-adhésion de particules de divers produits cosmétiques sera également présentée et mise en lien avec les précédentes caractérisations afin de définir des pistes de formulation de produits capables de protéger la peau des polluants atmosphériques.

Les travaux menés pendant cette thèse ont également fait l'objet de communications lors de congrès nationaux et internationaux, sous forme orale et sous forme de poster. L'ensemble des communications réalisées est répertorié ci-dessous.

"An original approach to determine the effect of urban pollution on skin surface properties" EUDIER Florine, GRISEL Michel, SAVARY Géraldine, PERCOCO Giuseppe, PICARD Céline, Journées Jean-Paul MARTY, Paris, 30/11/16 et 01/12/16 (Oral + poster)

1^{er} prix de la communication des doctorants

"Synthetic skin models versus human living skin explants as relevant tools to evaluate cosmetic products performance", EUDIER Florine, GRISEL Michel, SAVARY Géraldine, PERCOCO Giuseppe, PICARD Céline, COMET, Cergy Pontoise, 06 et 07/06/17 (Oral)

"Development of synthetic skin models to evaluate cosmetic products performance: comparison with *in vivo* evaluation", EUDIER Florine, GRISEL Michel, SAVARY Géraldine, PICARD Céline, JEDNC, Rouen, 16/06/2017 (Oral)

"Modification of the sebaceous lipids composition after urban pollution exposure: which impact on skin physico-chemistry? " Florine EUDIER, Nicolas HUCHER, Michel GRISEL, Celine PICARD, Geraldine SAVARY, Euro Fed Lipids Congress, Uppsala (Suède), du 27 au 30/08/17 (Oral)

"Les modèles non-biologiques de peau sont-ils des outils pertinents pour la recherche cosmétique ? Exemple d'études anti-pollution", EUDIER Florine, HUCHER Nicolas, GRISEL Michel, SAVARY Géraldine, PICARD Céline, GDR Cosm'actifs, Nouans le Fuzelier, 26/09/17 (Oral)

"New evidences of the effects of urban pollution on the skin based on *ex vivo* physico-chemical studies" EUDIER Florine, GRISEL Michel, HUCHER Nicolas, SAVARY Géraldine, PERCOCO Giuseppe, PENO-MAZZARINO Laurent, LATI Elian, PICARD Céline, IFSCC Conference, Séoul, du 23 au 25/10/17 (Poster)

"Non-biological skin models: new tools for cosmetic researches? From instrumental to sensory studies", EUDIER, Nicolas HUCHER, Michel GRISEL, Celine PICARD, Geraldine SAVARY, Skin Challenges Conference, Porto, du 26 au 27/02/18 (Oral)

"Predicting sensory perception of residual cosmetic film using artificial skin surface models: a novel methodology" EUDIER Florine, GRISEL Michel, PICARD Céline, SAVARY Géraldine, IFSCC Congress, Munich, du 18 au 21/09/18 (Poster)

PARTIE 1 – Synthèse bibliographique

Introduction

L'objectif de cette synthèse bibliographique est, dans un premier chapitre, de faire le bilan des données concernant l'impact de divers polluants atmosphériques sur la peau. Les différents types d'études réalisées (études cliniques, *in vitro*, *ex vivo*, sur modèles animaux ...) seront présentés et les conséquences sur la peau seront mises en évidence. Ce bilan servira de point de départ dans la sélection des paramètres surfaciques à étudier, dans le choix des protocoles et dans la compréhension des mécanismes mis en jeu.

Le second chapitre a fait l'objet d'une revue bibliographique intitulée « *Skin surface physico-chemistry: characteristics, methods of measurements, influencing factors and future developments* » publiée dans le journal *Advances in Colloid and Interface Science*. Cette revue fait le point sur les différentes études portant sur la physico-chimie de surface de la peau. Les méthodes de mesure et les différents paramètres étudiés y sont recensés. L'influence de différents facteurs sur la surface de la peau est également discutée. Le manque de données bibliographiques est notamment mis en évidence, malgré tout l'intérêt que présente la physico-chimie de la peau pour les études cosmétiques et pharmaceutiques. Une des problématiques liée à l'étude de la peau concernant le choix du modèle cutané sera soulevée. Cette difficulté s'explique par le fait que les études *in vivo* sont très limitées d'une part pour leur coût mais également en raison de l'utilisation de substances chimiques toxiques ou irritantes. Les solutions proposées dans la littérature seront évaluées et leur pertinence pour la présente étude sera discutée.

Le troisième chapitre de cette synthèse bibliographique a pour objectif de mettre en évidence l'importance de la physico-chimie de surface de la peau dans le cadre de cette étude sur l'impact des polluants. Une discussion concernant les différents modèles de peau disponibles dans la littérature sera menée et permettra de définir le(s) modèle(s) d'étude le(s) plus approprié(s). Enfin, les objectifs de ces travaux de thèse seront définis, en accord avec les objectifs du projet *UrbaSkin*, pour répondre à la problématique posée.

Chapitre 1 – Impact des polluants atmosphériques sur la peau humaine

I. La peau humaine : un matériau multicouche et fonctionnel

Avec une surface de 2m² et un poids d'environ 13 kg chez un homme de 70 kg (Robert 1985; Georgel 2008; Lai-Cheong and McGrath 2013), la peau est l'organe le plus lourd et le plus étendu du corps humain. Son épaisseur varie selon la zone du corps : elle est très fine au niveau des paupières (1,5 mm) mais peut atteindre 4 mm au niveau de la plante des pieds. A travers ses différentes couches et ses annexes (poils, glandes sudoripares, ongles ...) elle joue un rôle de protection indispensable face aux agressions extérieures (chimique, mécanique, biologique, thermique ...) (Kanitakis 2012). Dans le cadre de cette étude, le *stratum corneum* jouera un rôle primordial. Ainsi, ce premier paragraphe se focalisera plus particulièrement sur la structure et les propriétés de cette couche externe de la peau et son lien particulier avec la fonction barrière.

I.1. Structure de la peau

La peau présente une structure de base, identique chez tous les individus. Elle s'organise en 3 couches : l'épiderme, à l'extrême surface, qui recouvre le derme papillaire (représentés sur la Figure 2) et le derme réticulaire, puis l'hypoderme, souvent considéré comme un tissu sous-cutané, ne faisant pas partie de la peau au sens strict du terme. Chaque couche est caractérisée par une composition, structure et fonction particulière.

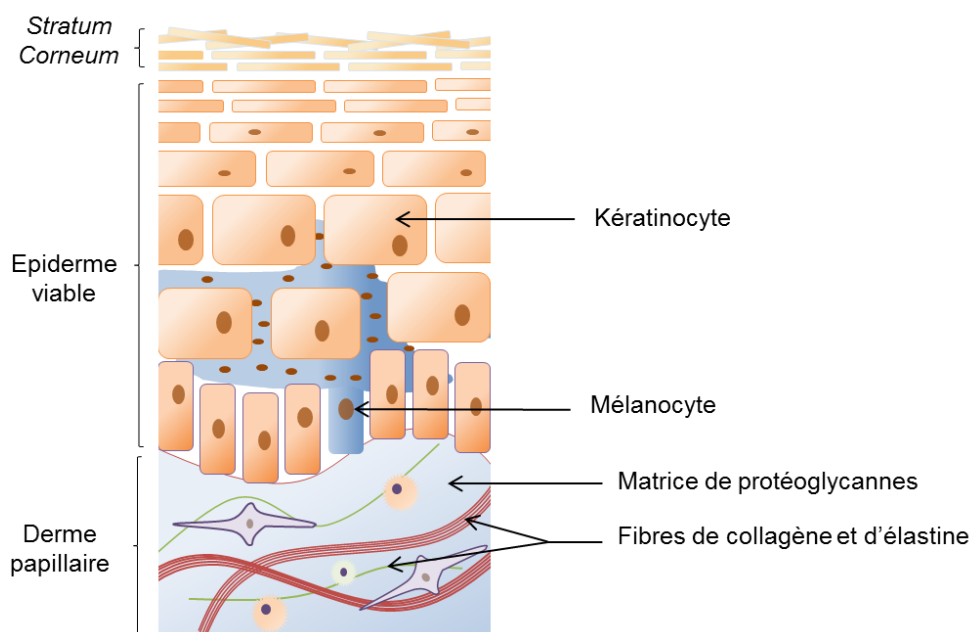


Figure 2. Schéma de la peau humaine, du *stratum corneum* jusqu'au derme papillaire

Le derme peut être considéré comme la couche la plus profonde de la peau. Il est divisé en plusieurs strates : le derme papillaire (ou *stratum papillaire*) au contact de l'épiderme (Figure 2) et le derme réticulaire (ou *stratum réticulaire*) en profondeur (Lai-Cheong and McGrath 2013). Il s'agit d'un tissu conjonctif qui contient des fibres de collagène et d'élastine, plongées dans une matrice de protéoglycanes. Il contient également des cellules : des fibroblastes en grande majorité, des macrophages ou encore lymphocytes en plus faible quantité. Enfin, il est le support des différentes annexes cutanées (vaisseaux sanguins et lymphatiques, terminaisons nerveuses permettant la perception tactile, follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares). Le rôle du derme et de ses constituants sur les propriétés surfaciques de la peau sera précisé dans le paragraphe I.4 de ce chapitre.

L'épiderme, séparé du derme par la jonction dermo-épidermique, est un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé, dont l'épaisseur varie entre 0,04 mm (paupières) et 1,6 mm (plante des pieds et paume des mains). Il est constitué en grande majorité par des kératinocytes (80% des constituants de l'épiderme), des mélanocytes (8%), des cellules de Langerhans (3 à 4%) et des cellules de Merkel (1%), qui sont des mécanorécepteurs sensibles aux pressions mécaniques. L'épiderme est subdivisé en plusieurs couches, caractérisées par la différenciation des kératinocytes, un phénomène continu et ascendant durant lequel les kératinocytes migrent vers la surface. Au fur et à mesure, ces kératinocytes se déshydratent, s'enrichissent en kératine de haut poids moléculaire qui les rend de plus en plus résistants. Ces différentes couches de cellules sont présentées ci-dessous :

- La couche basale ou germinative (*stratum germinativum*). C'est la couche la plus profonde de l'épiderme, qui forme la jonction dermo-épidermique. La différenciation des kératinocytes s'initie dans cette couche. Elle contient également les mélanocytes, qui sécrètent la mélanine, responsables de la pigmentation de la peau.
- La couche épineuse (*stratum spinosum*). Les cellules de cette couche épineuse vont notamment synthétiser des protéines essentielles pour la formation de l'enveloppe cornifiée des cellules du *stratum corneum*.
- La couche granuleuse (*stratum granulosum*), qui constitue la séparation entre l'épiderme viable et les couches de cellules mortes. Les corps lamellaires présents dans cette couche granuleuse vont sécréter les précurseurs des lipides du ciment intercellulaire du *stratum corneum*.
- La couche de transition ou couche claire (présente uniquement dans les épidermes épais).
- Enfin, la couche cornée (*stratum corneum SC*), la plus externe de la peau, joue un rôle fondamental dans sa fonction barrière (Bommannan, Potts, and Guy 1990; Elias

2005; Proksch, Brandner, and Jensen 2008; van Smeden et al. 2014). D'un point de vue surfacique, c'est le SC qui sera en contact direct avec les polluants ou les produits cosmétiques et qui sera donc notre principal objet d'étude.

La formation de la couche cornée (SC) est la dernière étape dans la différenciation épidermique (Peter and Elias 1983). Les kératinocytes ont perdu complètement leur noyau et leurs organites et deviennent des cornéocytes complètement kératinisés. La couche cornée est constituée de 10 à 20 rangées de cornéocytes, dont la cohésion est assurée par les cornéodesmosomes (points d'attaches entre les cornéocytes) et le ciment intercellulaire. Ainsi, le SC est généralement schématisé par le modèle de « briques et ciment », où les briques correspondent aux cornéocytes et le ciment à l'ensemble des lipides intercellulaires (Figure 3). Ce ciment contient des acides gras polyinsaturés de longueur de chaîne comprises entre 12 et 24 carbones (majoritairement des C16 et C18), du cholestérol et des céramides (Lampe et al. 1983; Schreiner et al. 2000; Proksch, Brandner, and Jensen 2008), qui sont sécrétés par les corps lamellaires de la couche granuleuse. Ces lipides cutanés forment des couches parallèles aux membranes des cornéocytes (Figure 3) dont l'organisation latérale et lamellaire sera présentée dans le prochain paragraphe.

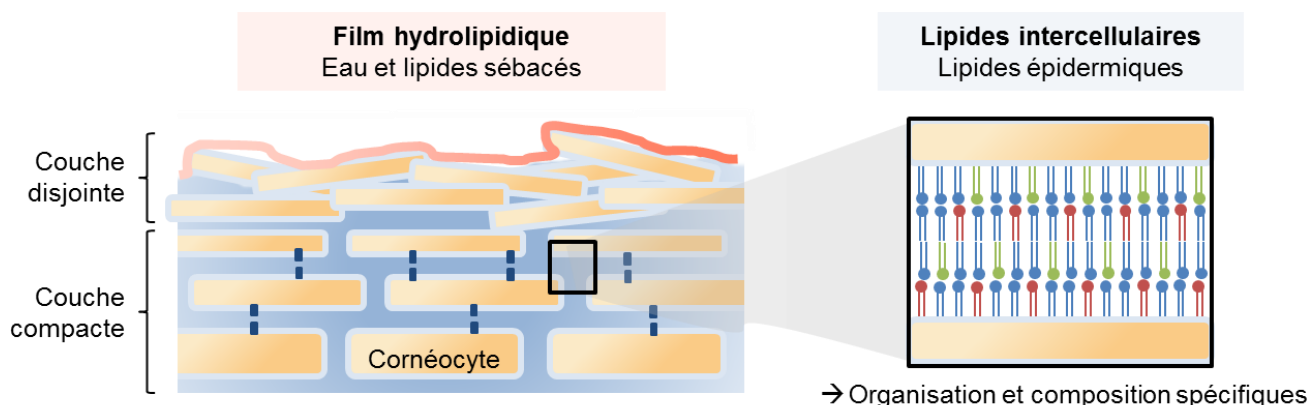


Figure 3. Schéma du SC, adapté de (Proksch, Brandner, and Jensen 2008).

Le SC est lui-même séparé en deux couches : une couche compacte, où les cornéocytes sont étroitement liés, et une couche disjointe, dans laquelle a lieu la desquamation (Figure 3). Cette desquamation permet d'éliminer les cellules mortes les plus superficielles pour laisser place au renouvellement cellulaire initié dans la couche basale. Elle est probablement régie par des enzymes dégradant le ciment intercellulaire et les cornéodesmosomes. Par perte de leur cohésion, les cornéocytes sont ensuite éliminés par simple frottement.

Le SC est la principale barrière de la peau contre les agressions chimiques, les UV, les bactéries ... Il est très résistant aux variations de température et de pH. Celui-ci est compris entre 4,2 et 6,8 (Wagner et al. 2003) permettant une protection antibactérienne et

antifongique. La teneur en eau du SC (de 10%) est maintenue grâce au NMF (Natural Moisturizing Factor), composé de plusieurs molécules hygroscopiques, capables de retenir l'eau au sein du SC, dont le détail de la composition sera donné dans la suite de ce manuscrit. Le film hydrolipidique qui recouvre le SC (microémulsion constituée d'eau provenant du derme et de l'environnement, de lipides épidermiques, de sébum et de sueur) permet également de maintenir l'hydratation (Figure 3). Ce film protecteur est essentiellement présent dans les zones de forte sécrétion sébacée, notamment le visage, le dos ou le cuir chevelu. L'épaisseur du film hydrolipidique est comprise entre 0,5 et 4 μm (Sheu et al. 1999), celui-ci étant considéré par certains auteurs comme la quatrième couche de la peau (Elkhyat et al. 2017). Enfin, le SC contient un système antioxydant constitué d'enzymes (catalase, peroxydase ...) et d'antioxydants de faibles poids moléculaires comme la vitamine E ou la vitamine C (Kohen 1999). Ce système permet ainsi de lutter contre l'oxydation des différents constituants du SC et de l'épiderme (lipides et protéines).

1.2. Propriétés des lipides du stratum corneum et du sébum

La quantité de lipides à la surface de la peau varie en fonction de la zone du corps : elle est comprise entre 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ au niveau de la jambe et 34 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sur le dos (dans les zones à faible taux de sébum) et peut atteindre $189 \pm 42.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ sur le front, où la quantité de sébum est la plus importante (Sheu et al. 1999).

Deux familles de lipides peuvent être retrouvées à la surface du SC : les lipides épidermiques provenant des corps lamellaires qui constituent le ciment intercellulaire et les lipides du sébum, sécrétés par les glandes sébacées et formant le film hydrolipidique. Ces deux familles de lipides présentent des compositions et des fonctions différentes.

Les lipides épidermiques

La composition de ce mélange est présentée dans le Tableau 1. Les lipides épidermiques constituant le ciment intercellulaire du SC sont essentiellement des lipides neutres contenant une proportion importante de stérols non estérifiés, d'acides gras libres et de céramides (Peter and Elias 1983). Les lipides polaires (essentiellement des phospholipides) sont peu présents au sein des lipides épidermiques (Lampe et al. 1983).

Tableau 1. Composition des lipides épidermiques, adapté de (Peter and Elias 1983)

Lipides	Longueur(s) de chaîne majoritaire(s)	Teneur dans le SC de l'abdomen (%)
Lipides polaires	/	4,9 \pm 1,6
Sulfate de cholestérol	/	1,5 \pm 0,2
Lipides neutres		77,7 \pm 5,6

Stérols libres	/	14,0 ± 1,1
Acides gras libres	C16 ; C18 (saturés et insaturés)	19,3 ± 3,7
Triglycérides	C18 :1	25,2 ± 4,6
Esters cireux	C16 :0 ; C18 :0 ; C18 :1 ; C18 :2	5,4 ± 0,9
Squalène	/	4,8 ± 2,0
Alcanes linéaires	C19-C34	6,1 ± 2,6
Sphingolipides		18,1 ± 2,8
Glucosylcéramides	/	Trace
Céramides	C22 :0	18,1 ± 0,4

L'organisation de ces lipides au sein du SC a fait l'objet de nombreuses études, notamment par fixation de colorants, par microscopie électronique, diffraction des rayons X aux petits angles, par calorimétrie différentielle à balayage ou encore par spectroscopie infrarouge (Bouwstra et al. 1991; Sheu et al. 1999; Mendelsohn, Flach, and Moore 2006; Martini 2011). L'utilisation de colorants fluorescents a permis de visualiser la répartition des lipides sur la surface de la peau. On observe deux structures particulières :

- Dans les couches compactes les plus profondes du SC, les lipides polaires et neutres sont répartis régulièrement et linéairement à travers les régions inter membranaires.
- Dans la couche disjointe plus superficielle, cette répartition est moins régulière : on observe des plaques et des zones de plus forte concentration en lipides (Sheu et al. 1999).

La bonne organisation de ces lipides est indispensable pour maintenir une fonction barrière efficace (Verdier-Sévrain and Bonté 2007). Ceux-ci sont répartis en bicouches lamellaires similaires à celles des cristaux liquides, constituées des trois principaux lipides (acides gras libres, cholestérol et céramides) (Figure 3) (Bouwstra et al. 2002). En plus de cette organisation lamellaire, les lipides épidermiques possèdent une organisation latérale bien définie, pouvant être orthorhombique, hexagonale ou désordonnée (Figure 4). Cette organisation peut notamment être caractérisée par spectroscopie infrarouge, technique qui sera présentée dans la partie Matériels & Méthodes. Elle permet de déterminer la fonction physiologique de ces lipides (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006) : plus les lipides sont organisés de façon compacte, plus ils apportent au SC une fonction barrière efficace, notamment contre la perte en eau. Ainsi, à l'extrême surface du SC les lipides sont généralement présents sous forme liquide désorganisée. Plus en profondeur dans le SC, où résident ses propriétés barrières, les lipides sont organisés de façon orthorhombique et compacte, contribuant de façon efficace à la barrière cutanée. A la frontière entre le SC et l'épiderme viable, les lipides sont présents sous forme désordonnée, ce qui est

caractéristique des membranes biologiques. L'organisation de ces lipides reflète également la teneur en lipides saturés et insaturés (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006). Cette organisation des lipides peut donner des informations quant à l'état de santé et à l'âge de la peau : une peau atopique, par exemple, présente une structure latérale désorganisée, caractéristique d'un dysfonctionnement de la barrière cutanée (Schreiner et al. 2000; Haftek 2016).

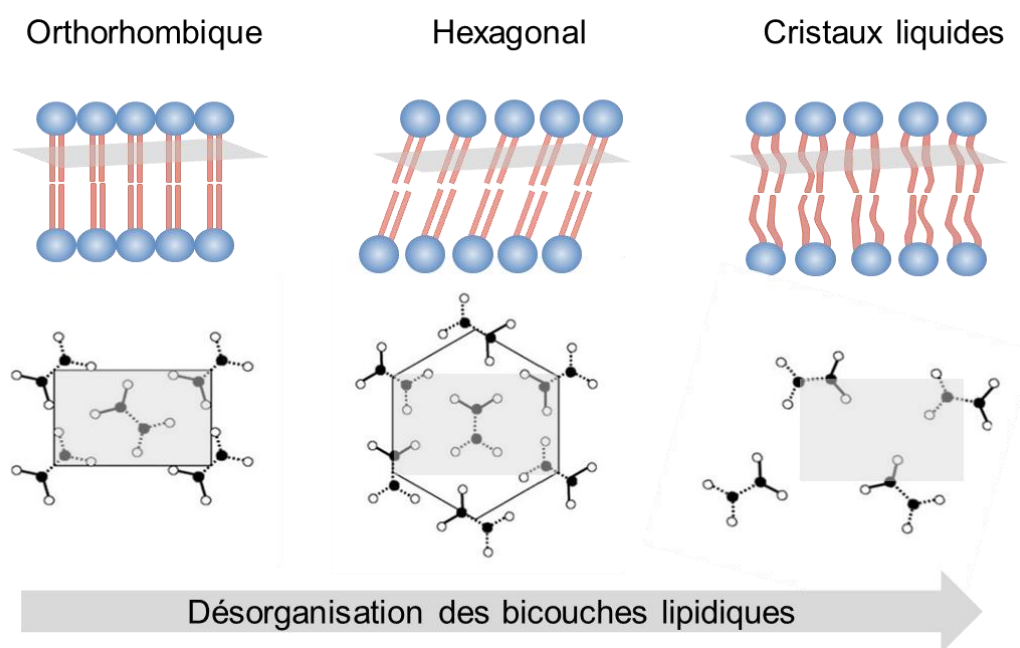


Figure 4. Organisation latérale des lipides (adapté de (Boncheva 2014; Mendelsohn, Flach, and Moore 2006)).

Les lipides sébacés

Les lipides sébacés sont constitués majoritairement de mono-, di- et triglycérides (57.5%) mélangés à des acides gras (10-25%), des cires et esters (26%), du squalène (12%), du cholestérol (estérifié 3% et libre 1.5%) (Martini 2011). Comme dans le cas des lipides épidermiques, les acides gras et leurs dérivés présents dans le sébum possèdent essentiellement des chaînes C16/C18, pouvant être saturées ou insaturées (Camera et al. 2010). Après leur sécrétion, les lipides sébacés sont dégradés en surface de la peau, en particulier, une grande partie des glycérides sont hydrolysés en acides gras libres (Brancaleon, Bamberg, and Kollias 2000), augmentant ainsi fortement la teneur en acides gras libres présents sur la surface de la peau.

Le sébum possède plusieurs fonctions : il sert à la lubrification du poil ainsi qu'à maintenir l'acidité du pH du SC grâce à ses acides gras, ce qui apporte au SC sa protection antibactérienne. Il apporte également souplesse et hydratation à la peau en formant le film hydrolipidique protecteur de la peau, sous forme d'une microémulsion eau/huile qui s'étale

sur la surface du SC (Mavon et al. 1997). Ce film hydrolipidique joue un rôle fondamental dans les propriétés physico-chimiques de la peau.

Néanmoins, la présence de lipides sébacés peut perturber l'organisation des lipides épidermiques. En effet, il a été montré qu'en présence de sébum, l'organisation hexagonale des lipides épidermiques devient beaucoup plus fréquente, synonyme d'une désorganisation des bicouches lipidiques (Pilgram et al. 2001) et donc d'une plus grande perméabilité du SC. Ces résultats sont confirmés par une étude réalisée par Guo et al (Guo et al. 2015) après application topique de sébum humain sur des souris : la présence de sébum a fortement augmenté la perméabilité du SC et provoqué des réactions inflammatoires.

Cette organisation et cette composition lipidiques apportent au SC des propriétés de surface spécifiques, notamment en termes de composition chimique, propriétés mécaniques, physiologiques et physico-chimiques. Certaines de ces propriétés sont décrites ci-dessous. L'aspect physico-chimique qui sera essentiel dans ces travaux est détaillé dans le chapitre 2 de cette synthèse bibliographique.

1.3. Intégrité de la fonction barrière et hydratation de la peau

Intégrité de la fonction barrière

L'une des principales fonctions de la peau pour l'organisme est de le protéger contre les agressions extérieures. Cette « barrière » peut être à la fois une barrière chimique, une barrière physique, une barrière thermique ou encore une barrière microbienne. Si l'ensemble des constituants de la peau joue un rôle important dans cette fonction barrière, le SC en est le principal acteur, notamment pour ce qui est des contacts avec les stimuli environnementaux (Figure 5).

Chacune des propriétés barrières du SC est localisée soit dans les cornéocytes, soit dans le domaine extracellulaire (ciment lipidique) (Tableau 2). Ainsi, une perturbation de la structure du SC entraîne inévitablement un dérèglement de la fonction barrière de la peau.

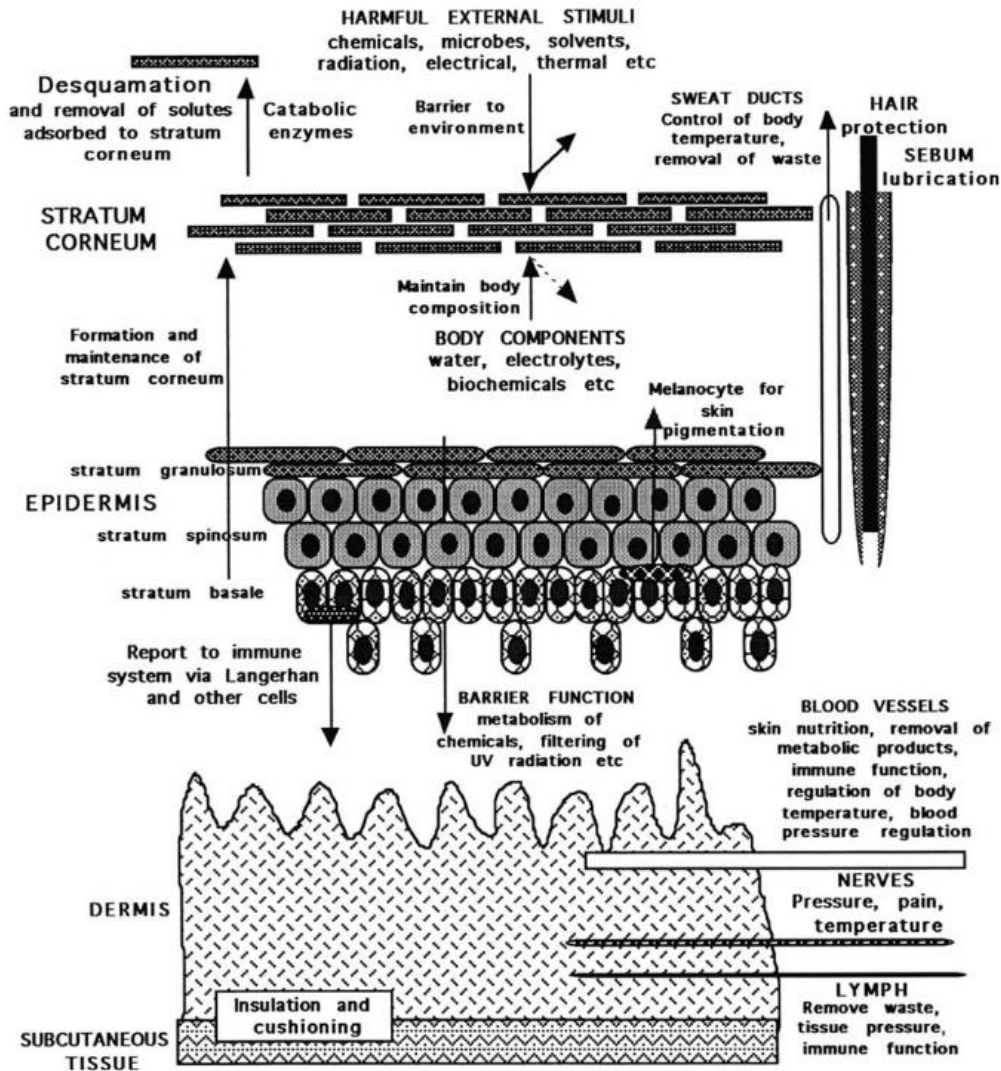


Figure 5. Fonction barrière de la peau, extrait de (Netzloff et al. 2005)

Tableau 2. Localisation des propriétés barrières au sein du SC (adapté de (Elias 2005))

Fonction	Localisation
Perméabilité	Extracellulaire
Intégrité	Extracellulaire
Barrière immunitaire	Extracellulaire
Barrière mécanique	Cornéocytes
Barrière chimique	Extracellulaire
Hydratation	Cornéocytes
Barrière contre les UVs	Cornéocytes
Inflammation	Cornéocytes

La barrière « chimique » de la peau est à double sens (Figure 6). Elle permet de la protéger contre la perte excessive en eau (barrière intérieur → extérieur) et contre la

pénétration de substances toxiques (barrière extérieur → intérieur). Le rôle de barrière chimique de la peau est essentiellement joué par les lipides de surface et leurs organisations lamellaire et latérale.

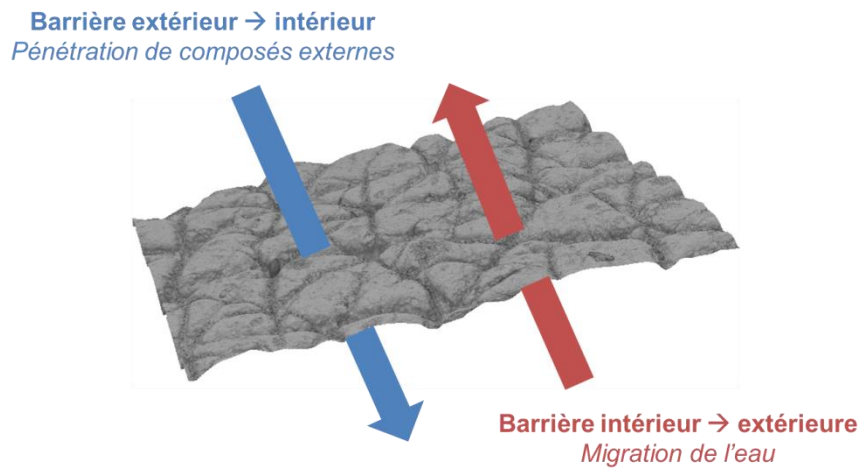


Figure 6. Illustration de la barrière « chimique » à double sens de la peau

Afin de caractériser l'état de la fonction barrière cutanée, il est important de prendre en compte ces deux composantes : la barrière intérieur → extérieur et la barrière extérieur → intérieur. Celles-ci ne sont généralement pas caractérisées de la même façon, et ne sont pas toujours corrélées. Dans certains désordres cutanés, seule l'une des composantes est altérée (Proksch, Brandner, and Jensen 2008).

Pour étudier cette barrière « chimique », la plupart des dermatologues et cosmétologues se basent sur la mesure de la Perte Insensible en Eau (PIE ou TEWL Trans Epidermal Water Loss). La valeur de PIE caractérise la vitesse à laquelle l'eau migre depuis le derme jusqu'à l'environnement extérieur, en passant par le SC (Berardesca and Maibach 1987). Cette méthode permet donc d'évaluer la barrière intérieur → extérieur. Pour déterminer l'état de la composante extérieur → intérieur, il est nécessaire de réaliser des études de pénétration (Proksch, Brandner, and Jensen 2008). Néanmoins, la mesure de PIE reste une valeur de référence pour caractériser l'intégrité de la fonction barrière de la peau (Berardesca and Maibach 1987). Elle peut être mesurée à l'aide d'un Tewamètre®, d'un Evaporimètre® ou d'autres appareils similaires. Cette technique sera détaillée dans la partie Matériels & Méthodes.

Afin de mettre en évidence le lien entre barrière « chimique » et PIE, plusieurs auteurs ont tenté de dégrader le SC par différents traitements : traitement chimique (chloroforme, méthanol, tensioactifs irritants), traitement mécanique (tape stripping, abrasion ...), et ils ont déterminé l'effet de ces traitements sur la PIE (Nangia et al. 1998; Fluhr et al. 2002; Elkeeb et al. 2010). Il s'avère, d'après les résultats de leurs études, que la PIE est bien corrélée à

l'état du SC et de sa barrière « chimique » et peut donc être une valeur pertinente pour caractériser l'impact de facteurs environnementaux tels que les polluants atmosphériques sur la fonction barrière cutanée (Berardesca and Maibach 1987).

L'intérêt de cette mesure de PIE par rapport à l'évaluation de la pénétration de molécules comme l'eau titrée ou la caféine est qu'elle n'utilise pas de solvant qui peuvent induire une hydratation du SC et donc modifier l'intégrité de la fonction barrière. De plus, cette technique est facile et rapide à réaliser, et adaptée à la fois aux mesures *in vivo* et *ex vivo* (Elkeeb et al. 2010).

Hydratation

L'eau est indispensable au bon fonctionnement de notre corps, et donc de notre peau. Le SC a pour rôle de maintenir la teneur en eau dans la peau et d'éviter une perte insensible trop importante. Cette rétention de l'eau au sein du SC et de la peau dans sa totalité est due à deux éléments (Verdier-Sévrain and Bonté 2007) :

- Le facteur d'hydratation naturel (Natural Moisturizing Factor, NMF), qui correspond à l'ensemble des molécules hygroscopiques présentes naturellement au sein de la peau (Tableau 3). Ce NFM est essentiellement contenu dans les cornéocytes et est constitué des produits de dégradation de la filaggrine.
- Les lipides intercellulaires qui forment une barrière contre la PIE, grâce à leur structure lamellaire permettant de maintenir l'eau sous forme liée (Imokawa, Kuno, and Kawai 1990) mais aussi de limiter la mobilité de l'eau en formant une membrane semi-perméable (Rawlings and Matts 2005).

Tableau 3. Composition du NMF (Verdier-Sévrain and Bonté 2007)

Composé(s)	Pourcentage
Aminoacides	40
Acide pyrrolidone carboxylique	12
Lactate	12
Sucres	8,5
Urée	7
Chlorure	6
Sodium	5
Potassium	4
Ammonium, acide urique, glucosamine, créatine	1,5
Calcium	1,5
Magnésium	1,5

Phosphate	0,5
Citrate et formate	0,5

La teneur en eau, intimement liée à la PIE et à la fonction barrière, est essentielle pour la maturation du SC et pour la desquamation des cornéocytes (Verdier-Sévrain and Bonté 2007). Dans des conditions normales, l'hydratation du SC varie de 5-10% en surface à 30% au niveau de la transition avec l'épiderme viable. L'eau liée associée aux protéines et lipides correspond à 20-30% du volume d'eau total présent dans le SC.

Si la teneur en eau du SC diminue, les enzymes permettant la desquamation ne sont plus efficaces, ce qui conduit à une adhésion et une accumulation des cornéocytes à la surface. Cette accumulation correspond aux signes visibles de la peau sèche, c'est-à-dire les squames, la rugosité et les écailles modifiant ainsi la sensorialité de la peau.

1.4. Propriétés mécaniques

La peau est un matériau complexe et multicouche qui présente des propriétés mécaniques viscoélastiques, anisotropiques et quasi-incompressibles (Derler, Schrade, and Gerhardt 2007; Xu, Lu, and Seffen 2008; Delalleau et al. 2008).

L'essentiel des propriétés viscoélastiques de la peau réside dans le derme, à travers ses différents composants (fibres de collagène et d'élastine, matrice de protéoglycanes). L'épiderme viable contribue assez peu aux propriétés mécaniques de la peau. Le SC possède un module d'Young très élevé mais étant de très faible épaisseur, il ne contribue pas non plus à la rigidité de la peau (Wilkes, Brown, and Wildnauer 1973; Manschot, Wijn, and Brakkee 1982; Pailler-Mattei et al. 2007).

La peau *in vivo* possède la particularité d'être en légère tension naturellement, lorsqu'elle recouvre l'organisme. Cette propriété a été mise en évidence par plusieurs auteurs, notamment Langer en 1978 (Langer 1978). Lorsque l'on sectionne la peau par une lame circulaire, les fragments de peau se contractent et le diamètre de la plaie augmente (Figure 7). Cette expérience a permis de mettre en évidence cette pré-tension de la peau. De plus, les fragments de peau et la plaie prennent une forme ellipsoïdale, ce qui caractérise son anisotropie. Cette propriété de pré-tension est importante à prendre en compte lorsque l'on compare des résultats de tests réalisés *in vivo* et *ex vivo* (Jacquet et al. 2008).

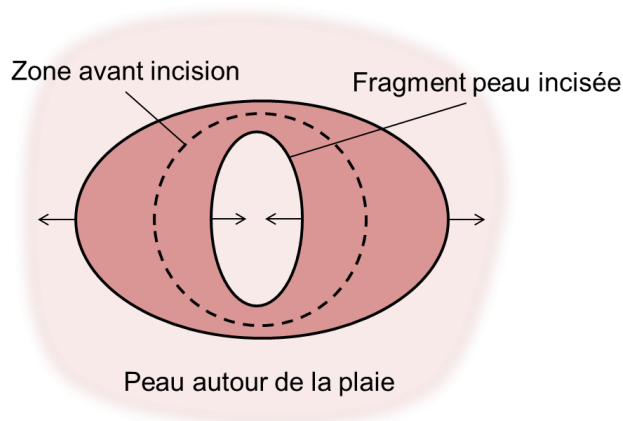


Figure 7. Mise en évidence de l'état de pré-tension de la peau *in vivo* (adapté de (Remache 2013))

Cette pré-tension aura un impact important sur la topographie de surface de la peau. En effet, la surface de la peau *in vivo* n'est pas totalement lisse : elle présente un microrelief ayant une signification physiologique (Figure 8). Ce relief de la peau est formé par une association de sillons, d'orifices folliculaires et de pores, et de quelques cornéocytes protubérants. Les sillons permettent à la peau d'exprimer ses propriétés mécaniques (Geerligts 2006) en se dépliant partiellement lors de sollicitations. Leur répartition sur le corps reflète la direction des contraintes mécaniques naturelles de la peau (Geerligts 2006).

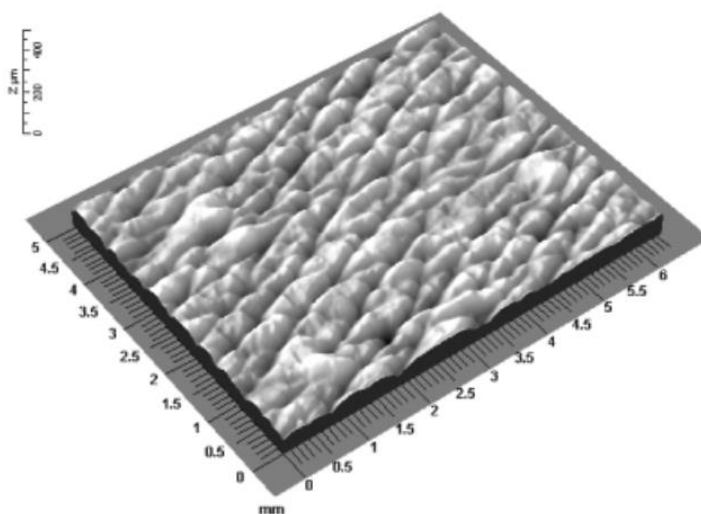


Figure 8. Microrelief cutané (extrait de (Lagarde, Rouvrais, and Black 2005))

A partir de ces connaissances sur la peau, ses propriétés et son rôle dans la protection de notre organisme, il semble pertinent de déterminer comment des composés hautement toxiques tels que les polluants atmosphériques peuvent interagir avec la peau et comment ils peuvent en modifier ses propriétés. Ainsi, la deuxième partie de ce chapitre explicitera l'impact des polluants sur la peau à travers une analyse de la littérature, et mettra en évidence la difficulté de ce type d'étude et le manque d'informations permettant de développer des produits cosmétiques anti-pollution adaptés.

II. La pollution urbaine : un stress environnemental majeur pour la peau

II.1. Contexte actuel

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, la pollution de l'air correspond à la contamination de l'environnement par un agent chimique, physique ou biologique, qui modifie les caractéristiques naturelles de l'atmosphère (OMS 2016). De nombreux facteurs peuvent engendrer cette pollution, comme par exemple la combustion de matières organiques, les véhicules automobiles ou les usines.

On distingue la pollution intérieure de la pollution extérieure. La pollution intérieure désigne les modifications de l'air à l'intérieur des habitations, induites notamment par la combustion de la biomasse pour le chauffage et les produits chimiques relargués entre autre par les peintures et vernis. La pollution extérieure désigne elle les modifications de l'atmosphère de façon plus globale, dans les zones rurales ou urbaines.

De nombreuses directives ont été décidées par l'OMS afin d'améliorer la qualité de l'air, et ce dans le monde entier. Si les taux de polluants ont plutôt tendance à diminuer en France grâce à l'application de nouvelles réglementations, à l'amélioration des techniques et au renouvellement de matériels (Airparif 2015), ce n'est pas le cas dans tous les pays du monde, notamment en Chine, où la population s'urbanise à un rythme inégalé dans l'Histoire. Cette urbanisation s'accompagne d'une forte augmentation du taux de polluants dans l'atmosphère, rendant l'air respiré nocif pour les trois quarts de la population urbaine chinoise (Guinot 2008). La pollution de l'air présente donc un risque environnemental majeur pour la santé (OMS 2016; Vierkötter, Krutmann, and Schikowski 2018). En effet, en 2012, la pollution de l'air extérieur dans les zones urbaines et rurales a provoqué la mort prématurée de 3,7 millions de personnes dans le monde. 80% des décès provoqués par la pollution ont été causés par un problème cardiaque ou un AVC (Accident Vasculaire Cérébral), 14% ont été provoqués par des infections respiratoires et 6% sont dus à un cancer des poumons.

Si l'impact négatif des polluants sur le système respiratoire est fortement étudié et reconnu, il est légitime de se demander quel est l'impact de la pollution sur notre peau. En effet, celle-ci, de par son étendue et sa fonction protectrice, est une cible majeure pour les agressions extérieures (Krutmann et al. 2014). De plus, on observe aujourd'hui, essentiellement en Asie, une forte augmentation des symptômes de peaux sensibles, de dermatites atopiques ... Ces désordres cutanés sont liés à un dysfonctionnement de la fonction barrière de la peau. Il apparait donc essentiel de protéger notre peau contre ces polluants et d'étudier les possibles liens entre la qualité de l'air et les désordres cutanés.

Une meilleure compréhension de l'impact des polluants et de leur mécanisme d'action est donc primordiale pour permettre aux industries cosmétiques et pharmaceutiques de créer des produits efficaces permettant de contrer ou prévenir les effets néfastes de la pollution. Plusieurs études ont été menées à ce sujet, et seront présentées dans la suite de ce chapitre, après une brève introduction concernant les différents types de polluants présents dans l'atmosphère.

II.2. Les principaux polluants atmosphériques

Il existe deux grandes familles de polluants atmosphériques : les polluants primaires et les polluants secondaires. A cela s'ajoute la fumée de cigarette, constituée d'une multitude de molécules, dont l'effet sur la santé a été beaucoup étudié.

Les polluants primaires

Les polluants primaires (Airparif 2016) sont les polluants rejetés directement dans l'atmosphère. Ils sont essentiellement issus du trafic routier ou de la combustion. Il s'agit notamment :

- Des oxydes de carbone type CO, CO₂ ...
- Des oxydes d'azote NOX
- Des oxydes de soufre SOX
- Des hydrocarbures légers
- Des composés organiques volatils (COV) dont notamment les aldéhydes et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)
- Des particules de matière (Particulate Matter PM)
- Des métaux lourds type plomb, cadmium, mercure ...

De nombreux polluants primaires sont aujourd'hui réglementés (Airparif 2016) car ils présentent des risques pour la santé humaine. C'est le cas notamment des NOX, SOX, COV (irritants pour la peau et les muqueuses), du CO (toxique à forte concentration), des métaux lourds qui peuvent s'accumuler dans l'organisme et des PM, récemment classées comme carcinogènes pour l'homme, selon l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (CIRC 2011).

Selon leur taille, les PM sont capables de pénétrer au sein du système respiratoire et provoquent des irritations et inflammations (Nemmar et al. 2013). Ces polluants ont une composition complexe et proviennent de sources différentes : usines, incinérateurs, automobiles, poussières naturelles ... Les PM, souvent constituées d'un cœur en carbone, transportent des molécules toxiques adsorbées à leur surface, comme des HAP (notamment

du benzo(a)pyrene), des métaux lourds ou des gaz irritants (Kampa and Castanas 2008; Drakaki, Dessinioti, and Antoniou 2014). On les classe en trois grandes catégories selon leur diamètre aérodynamique :

- Les particules grossières ($d > 1 \mu\text{m}$)
- Les particules fines ($d < 1 \mu\text{m}$)
- Les particules ultrafines ($d < 0,1 \mu\text{m}$)

Elles peuvent également être classées selon leur profondeur de pénétration au sein du système respiratoire : les PM_{2.5} ($d < 2,5 \mu\text{m}$) peuvent atteindre les alvéoles tandis que les PM₁₀ ($d < 10 \mu\text{m}$) n'atteignent que les voies respiratoires supérieures (Vierkötter, Krutmann, and Schikowski 2018).

Les polluants secondaires

Les polluants secondaires (Airparif 2016) ne sont pas rejetés tels quels dans l'atmosphère. Ils proviennent de réactions entre les polluants primaires et les UV, la chaleur, les IR ... Ce sont notamment l'ozone, le dioxyde d'azote, les nitrates de peroxyacétyles (PAN), des aldéhydes, cétones, et des particules secondaires.

Le principal polluant secondaire réglementé est l'ozone. Lorsqu'il est présent au niveau de la troposphère, ce gaz est irritant pour les yeux et le système respiratoire. Il est également néfaste pour les végétaux. L'exposition à l'ozone est surtout problématique en été, puisqu'étant un polluant secondaire, il nécessite une forte chaleur et l'action des UVs pour être formé.

La fumée de cigarette

La fumée de cigarette est un aérosol complexe constitué d'une multitude de molécules (jusqu'à 4700), représentant la quasi-totalité des familles de composés organiques et contenant environ 300 substances cancérigènes, des polluants cités précédemment : des gaz toxiques (CO, NO), des HAPs (benzo(a)pyrène ...) et des métaux lourds (cadmium, nickel, plomb ...) (Freiman et al. 2004; Borgerding and Klus 2005; Valacchi et al. 2012).

Cette fumée de cigarette peut provenir de plusieurs sources : la fumée dite principale est celle ressortant de la bouche après inhalation, qui a donc été filtrée par les voies respiratoires. La fumée secondaire est celle qui émerge à partir de l'extrémité de la cigarette, entre deux bouffées. Ces deux types de fumées diffusent et se diluent ensuite dans l'atmosphère. Elles peuvent, dès lors, réagir avec d'autres espèces chimiques de l'environnement et deviennent ainsi ce que l'on appelle la fumée de tabac environnementale.

La fumée principale est à l'origine de 15 à 43% des particules de matières présentes dans la fumée de tabac environnementale (Borgerding and Klus 2005). De très nombreuses études se sont focalisées sur les propriétés chimiques et physiques de ces deux natures de fumée (Borgerding and Klus 2005). Les molécules contenues dans la fumée principale et la fumée secondaires sont similaires, mais leurs ratios peuvent différer et dépendent du type de cigarette considéré. Quelques différences peuvent être notées. Notamment, la fumée principale est plutôt acide tandis que la fumée secondaire est plutôt alcaline. Les PM présentes dans la fumée principale fraîche ont un diamètre moyen de 0,2 μm tandis que celles de la fumée secondaire sont légèrement plus petites, avec un diamètre moyen entre 0,1 et 0,2 μm . De plus, les proportions entre phase gazeuse et phase particulaire sont différentes.

Les propriétés physico-chimiques des fumées dépendent de la cigarette (quantité de tabac, dimensions, type de papier, arôme ...), de la façon dont est générée la fumée (design de la « smoking machine », volume et fréquences des bouffées, condition de température et d'humidité ...) mais aussi des techniques d'extraction et d'analyse utilisées. L'étude de la fumée de cigarette est donc un domaine très complexe.

Cette fumée de cigarette contribue fortement à la pollution intérieure de l'air (Girman et al. 1982; Nazaroff and Singer 2004; Semple et al. 2011) et peut constituer un modèle de pollution intéressant et facile à mettre en place.

II.3. Mise en évidence expérimentale de l'impact de polluants sur la peau

De nombreuses études (dont les principales sont récapitulées dans l'annexe 1) ont été menées afin de mettre en évidence l'impact des polluants sur la peau humaine. Ces études ont été réalisées essentiellement *in vitro*, *in vivo* sur modèle animal, ou via des études épidémiologiques basées sur l'observation de cohortes. Ces études se sont focalisées sur un ou plusieurs polluants décrits précédemment, ayant un effet délétère sur la peau, notamment : l'ozone, les PM, les HAP et la fumée de cigarette (Baudouin et al. 2002; Katsouyanni 2003; Kampa and Castanas 2008; Drakaki, Dessinoti, and Antoniou 2014).

Les méthodes d'exposition aux polluants diffèrent selon les études. Pour ce qui est des études épidémiologiques, les volontaires sont exposés en conditions réelles. La détermination de la teneur en différents polluants a pu être réalisée par des mesures directes dans l'atmosphère des zones d'études (Schäfer et al. 1996; Larrieu et al. 2009; Vierkötter et al. 2010; Song et al. 2011) et/ou grâce à des procédures de modélisation basées sur des mesures directes (Krämer et al. 2009; Vierkötter et al. 2010). La teneur en polluants atmosphériques a également été obtenue par estimation de l'exposition en fonction des

conditions de vie (Morgenstern et al. 2008), ou, dans le cas particulier de l'étude de la fumée de cigarette, par la quantification du nombre de cigarettes fumées par jour (Yin, Morita, and Tsuji 2001).

Pour les études *in vivo* et *in vitro*, les conditions d'exposition s'éloignent nécessairement des conditions réelles d'exposition. Dans le cas de l'ozone, l'exposition, réalisée pendant une durée contrôlée (2h, 6h, répétée ou non), est très souvent effectuée dans des chambres hermétiques dans lesquelles la teneur en ozone est contrôlée et peut être modulée (souvent entre 1 et 10 ppm pour des expositions aiguës, entre 0 et 1 ppm pour des expositions répétées) (Thiele, Traber, Polefka, et al. 1997; Thiele, Traber, Podda, et al. 1997; Weber et al. 1999; Valacchi et al. 2003; He et al. 2006). Dans le cas des PM, quelle que soit leur nature, les applications sont généralement réalisées de façon topique, grâce à l'utilisation de solvants ou d'excipients (Baroli et al. 2007; Ejaz et al. 2009), ou directement via l'ajout de dispersion de polluants dans le milieu de culture cellulaire (Ushio, Nohara, and Fujimaki 1999; Yin, Morita, and Tsuji 2000; Choi et al. 2011).

Les études *in vivo* et *in vitro* sont donc peu représentatives des vraies conditions d'exposition à la pollution de la peau humaine. Notamment, les applications topiques de PM en solution ne sont pas réalistes. D'une part, le contact entre les cellules et les particules est excessif et d'autre part, l'utilisation de solvants ou d'excipients influence fortement l'interaction entre la peau et les polluants ainsi que la pénétration des particules. De plus, les modèles d'études ne tiennent, en général, pas compte de la complexité de la peau humaine et se limitent à des essais sur cultures monocellulaires. Les études réalisées sur animaux permettent de se rapprocher du niveau de complexité de la peau humaine. Cependant, il est aujourd'hui impossible, pour des raisons éthiques et légales, de réaliser des essais sur animaux dans le cadre du développement de produits cosmétiques. Il est donc difficile de faire le lien entre les résultats des études épidémiologiques et des études en laboratoire.

Ces études révèlent donc la difficulté d'évaluer l'impact des polluants sur la peau et de comprendre les mécanismes mis en jeu. Néanmoins, certains phénomènes ont d'ores et déjà pu être mis en évidence et sont détaillés dans le paragraphe suivant.

III. Conséquences des effets de la pollution sur la peau

III.1. Mécanismes d'action des polluants

Chaque type de polluant possède un mécanisme d'action et une voie de pénétration propre.

L'ozone et la fumée de cigarette

L'ozone et la fumée de cigarette ont un mécanisme d'action sur la peau assez similaire, lié à la génération d'un stress oxydatif. L'ozone est une molécule très réactive, elle ne peut donc pas pénétrer en profondeur dans les tissus (Pryor, Squadrito, and Friedman 1995b). Elle agit principalement au niveau de l'ultra surface du SC. Son action dans la profondeur de la peau est liée à un mécanisme en cascade (Mehlman and Borek 1987; Pryor, Squadrito, and Friedman 1995a, 1995b). L'ozone, comme la fumée de cigarette, réagit avec les lipides et les biomolécules du SC en contact avec l'air, générant ainsi des produits d'ozonation : lipides peroxydés et radicaux libres. Ces phénomènes ont été mis en évidence à travers différentes études menées *in vitro* et sur modèle animal (Thiele, Traber, Tsang, et al. 1997; Thiele, Traber, Polefka, et al. 1997; Thiele, Podda, and Packer 1997; Thiele, Traber, Podda, et al. 1997; Thiele et al. 1998, 1999; Weber et al. 1999). Les lipides peroxydés et les radicaux libres vont ensuite activer des lipases, provoquant notamment la synthèse de marqueurs pro-inflammatoires (Valacchi et al. 2012). Le système antioxydant de la peau est donc sa première défense contre l'action de l'ozone (notamment la vitamine E, la vitamine C, la glutathionne et l'acide urique). Ces phénomènes ont été confirmés par une étude *in vivo* sur volontaires. L'exposition à l'ozone peut également modifier la microflore cutanée des volontaires (He et al. 2006). D'autre part, la fumée de cigarette impacte les propriétés mécaniques de la peau, via une altération de ses fibres d'élastines (Francès. et al. 1991; Just et al. 2007), une altération de la matrice extracellulaire et du collagène (Yin, Morita, and Tsuji 2000) et une augmentation des sillons du microrelief cutané (Yin, Morita, and Tsuji 2001).

Les particules fines

Récemment, en 2015, (Pan et al. 2015) ont démontré, sur modèle animal, que l'exposition à des particules polluantes standards (1648a et 1649b commercialisées par l'Institut National des Standards et Technologies NIST) pouvait perturber le SC et sa fonction barrière : les protéines impliquées dans la fonction barrière étaient dégradées, la viabilité cellulaire était diminuée, ce qui induit notamment une augmentation de la perte insensible en eau. On peut donc supposer que les PM altèrent l'état de la peau humaine.

Les PM vont avoir un mode d'action quelque peu différent. En effet, la toxicité des PM est essentiellement liée au transport de molécules adsorbées à leur surface. Comme dans le cas de l'ozone et de la fumée de cigarette, certaines molécules véhiculées par les PM peuvent provoquer un stress oxydatif en surface de la peau (Vierkötter et al. 2010). Mais d'autres phénomènes sont également observés en présence de PM, notamment une hyperpigmentation de la peau (Vierkötter et al. 2010) et une réaction inflammatoire (Ushio, Nohara, and Fujimaki 1999; Choi et al. 2011), en raison de la présence de HAP adsorbés.

Ces molécules particulières, les HAP, sont en grande partie responsables des effets des PM. Ce sont des molécules très lipophiles, qui pénètrent facilement au sein de la peau (Krutmann et al. 2014). Ils induisent une hyperpigmentation par l'activation de la prolifération des mélanocytes (Vierkötter et al. 2010). La prolifération des mélanocytes est contrôlée par l'activation de leur récepteur cellulaire AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), sensible à la présence d'HAP (Jux et al. 2011). Ce récepteur va également être impliqué dans la réponse au stress oxydatif, provoquant ainsi une inflammation au sein de la peau.

L'étude des PM soulève également la question de leur pénétration à travers la peau. De nombreuses études ont été menées sur cette problématique. Plusieurs voies de pénétration peuvent être envisagées : la pénétration intracellulaire, la pénétration intercellulaire via les bicouches lipidiques et la pénétration via les annexes de la peau (follicules pileux, glandes sébacées et sudoripares) (George et al. 2014). Si la pénétration intra-folliculaire a longtemps été négligée de par sa faible superficie par rapport à la peau, elle se révèle finalement la voie de pénétration privilégiée des particules solides (Schneider et al. 2009). Des particules ultrafines de diamètre inférieur à 0,1 μm pourraient donc atteindre les follicules pileux et les cellules de l'épiderme viable et du derme (Vierkötter et al. 2010).

Ensuite, plusieurs facteurs vont contribuer à la pénétration des PM : leur taille, leurs propriétés physico-chimiques (coefficient de partition, polarité ...), leur forme, leur élasticité etc. mais également l'hydratation, l'âge, l'épaisseur et l'état de la peau, ce qui explique les résultats parfois contradictoires (Vierkötter et al. 2010). Les études portent généralement sur des particules de diamètres inférieurs aux PM_{2.5} et PM₁₀, et aucune étude de pénétration de ces PM_{2.5} et PM₁₀ ne semblent avoir été réalisée jusqu'à aujourd'hui (Vierkötter, Krutmann, and Schikowski 2018). Leur granulométrie étant très dispersée, il est possible de trouver des particules ultrafines ($d < 0,1 \mu\text{m}$) ou nanoparticules dans leur composition. La pénétration de ces particules ultrafines incluses dans les PM_{2.5} et PM₁₀ pourrait donc être à prendre en compte dans l'étude de l'effet des particules sur la surface cutanée.

Enfin, la dissolution et l'oxydation des particules sont deux phénomènes qui peuvent être importants à considérer, selon la composition des particules étudiées.

Les études précédentes ont permis de mettre en évidence l'effet de certains polluants sur la peau et ses différents constituants à l'échelle moléculaire. Ces phénomènes observés tels que le stress oxydatif ou l'activation du récepteur AhR ont des conséquences macroscopiques sur la peau humaine. Trois grandes catégories d'effets délétères peuvent être définies à partir de ces données :

- L'accélération du vieillissement cutané
- L'aggravation de désordres cutanés
- L'altération des paramètres physiologiques

Les signes visibles des effets des polluants sont décrits dans les paragraphes ci-dessous.

III.2. Accélération du vieillissement cutané

Il est déjà reconnu que l'exposition au rayonnement UV accélère le vieillissement cutané, on parle alors de photo-vieillissement. « Vieillissement environnemental » ou « vieillissement extrinsèque » sembleraient être des termes mieux appropriés puisqu'à l'issue des études menées sur l'effet de la pollution, il est possible d'affirmer que les polluants contribuent également à l'accélération du vieillissement cutané. Ce vieillissement prématuré est engendré par trois grands facteurs : la génération de radicaux libres, l'endommagement des télomères et l'activation du récepteur AhR (Vierkötter and Krutmann 2012) (Figure 9).

Ces facteurs de vieillissement sont induits à la fois par l'exposition aux UV et par la pollution. En effet, les études s'accordent sur le fait que l'ozone, la fumée de cigarette et les HAP induisent un stress oxydatif au sein de la peau. Ce stress oxydatif conduit à la formation de radicaux libres, responsables de l'oxydation de lipides et de protéines, qui peuvent également endommager l'ADN des cellules cutanées. La réponse cellulaire face à ces radicaux libres conduit à une diminution de la synthèse de collagène, essentiellement responsable de la formation de rides. De plus, les particules fines transportant des HAP activent le récepteur AhR qui va notamment provoquer une hyperpigmentation mais également être impliqué dans la dégradation du collagène. Cette hyperpigmentation se manifeste par l'apparition d'un plus grand nombre de taches pigmentaires (Vierkötter et al. 2010; Hüls et al. 2016), appelées lentigines, qui font parties des signes visibles de l'âge et contribuent à l'apparition de rides marquées (Vierkötter and Krutmann 2012).

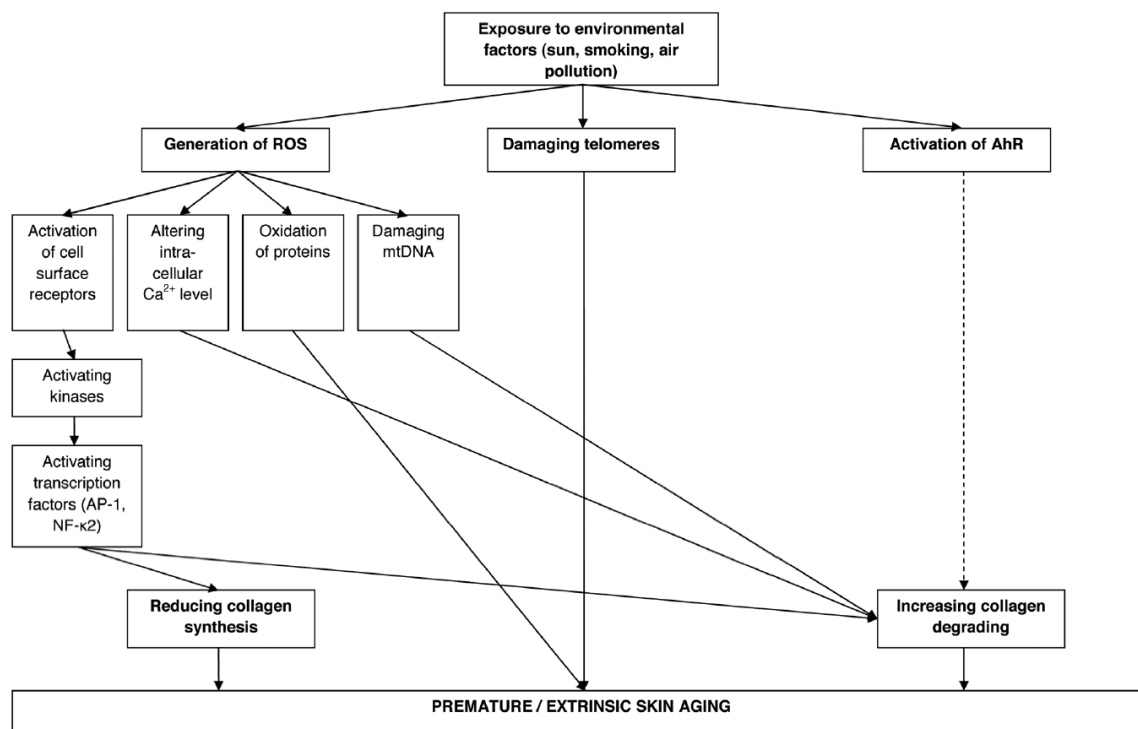


Figure 9. Conséquences de facteurs environnementaux sur le vieillissement prématuré de la peau (extrait de (Vierkötter and Krutmann 2012))

III.3. Aggravation des désordres cutanés

La pollution de l'air est également associée à l'aggravation des désordres cutanés tels que l'eczéma, la dermatite atopique ou les symptômes de peau sensible. En effet, plusieurs études cliniques et épidémiologiques ont montré un lien entre le niveau de pollution par des gaz irritants ou par des PM et les symptômes eczémateux ou atopiques, essentiellement chez les enfants (Schäfer et al. 1996; Morgenstern et al. 2008; Larrieu et al. 2009; Krämer et al. 2009; Song et al. 2011; Kim et al. 2013). Néanmoins, l'explication du lien entre la pollution et ces symptômes reste assez peu investiguée. Les PM peuvent perturber la fonction barrière de la peau, comme il a été montré par (Pan et al. 2015), ce qui pourrait expliquer ces phénomènes. Mais de nouvelles études semblent nécessaires pour réellement comprendre et approfondir l'impact des polluants sur la fonction barrière cutanée et sur le SC.

Le concept de peau sensible est de plus en plus étudié, notamment dans les pays industrialisés. Sa pathophysiologie n'est pas entièrement comprise, mais les symptômes de la peau sensible sont associés à un dysfonctionnement de la barrière cutanée, une augmentation de la perméabilité du SC et une réponse neurologique cutanée exacerbée (Farage and Maibach 2010; Krutmann et al. 2014). Ayant une barrière cutanée défectueuse, il est fortement probable que les personnes souffrant de peau sensible soient encore plus

touchées par la pollution, ce qui expliquerait que le nombre de personnes ayant une peau sensible soit plus élevé en Asie, où la pollution est très importante (Krutmann et al. 2014).

III.4. Altération des paramètres physiologiques

D'autres études cliniques ont mis en évidence l'effet de la pollution sur les paramètres physiologiques de la peau : hydratation, fonction barrière, pH, taux de sébum ... Les altérations observées sont le plus souvent localisées au niveau des régions découvertes de vêtements et exposées à l'air extérieur, ou au niveau des plis du corps, où les poussières s'accumulent sur les vêtements (Boisnic and Branchet 2005).

Deux études d'assez grande ampleur ont été réalisées par Lefebvre et al. (M-A. Lefebvre et al. 2015; M.-A. Lefebvre et al. 2015), l'une à Shanghai sur 159 sujets, l'autre à Mexico sur 180 sujets. Les auteurs se sont concentrés sur la mesure de paramètres physiologiques et sur l'aspect de la peau. Ils ont montré que la peau des sujets vivant en zone non polluée est plus hydratée, présente une plus faible PIE, leur quantité de vitamine E et de squalène est plus importante et la quantité d'acide lactique est plus faible. Ainsi, le squalène peut être utilisé en tant que marqueur de l'oxydation environnementale (Pham et al. 2015). Le taux d'excrétion de sébum est plus faible dans les zones non polluées, mais la quantité de sébum n'est pas significativement différente. L'utilisation de D-squames pour quantifier la sécheresse de la peau a montré des résultats significativement différents entre les deux zones : la desquamation est plus importante dans les zones polluées, indiquant une moins bonne hydratation de la peau.

Enfin, selon (Boisnic and Branchet 2005), une acidification de la peau peut être observée après exposition à la pollution. Leur étude confirme également les troubles de l'hydratation et l'augmentation de la PIE observés par Lefebvre et al. après exposition à la pollution. Cependant, peu d'explications concernant les mécanismes mis en jeu ont été proposées.

IV. Conclusion du chapitre

La peau humaine est un matériau multicouche et complexe. Les études de ses propriétés biologiques, chimiques ou mécaniques sont aujourd'hui très bien documentées. Elles mettent en évidence cependant la grande variabilité qu'il peut exister entre les individus, en fonction de leur âge, de leur sexe ou de leurs habitudes cosmétiques. De même, il existe une très grande variabilité intra-individuelle : les propriétés de la peau humaine ne sont pas identiques sur toutes les zones du corps, et ce en raison de fonctions spécifiques (protection face à l'environnement, aux microorganismes, fonction sensorielle du toucher ...).

La fonction barrière est une des propriétés fondamentales de la peau. Elle réside essentiellement dans le *stratum corneum*, à travers sa composition et son organisation très spécifiques. Les lipides cutanés (épidermiques ou sébacés) ont un rôle important dans le maintien de cette fonction barrière, contrôlant la pénétration de composés exogènes et la perte insensible en eau. Une détérioration de ces lipides ou de leur organisation peut perturber la fonction barrière et conduire à des symptômes comme la dermatite atopique ou l'eczéma. De ce fait, il est important de comprendre cette fonction barrière et de savoir comment et par quoi elle peut être perturbée afin de mieux la protéger.

En particulier, l'augmentation de la pollution urbaine, essentiellement en Asie, semble corrélée avec l'apparition plus fréquente de symptômes cutanés, liés à la perturbation de son SC. Il est donc fondamental d'appréhender les impacts que peuvent avoir les polluants sur la peau. Les études épidémiologiques et *in vitro* réalisées ont permis de mettre en évidence trois grands effets de la pollution (l'accélération du vieillissement cutané, l'augmentation des désordres cutanés et l'altérations de paramètres physiologiques), essentiellement liés à des mécanismes d'oxydation et d'inflammation. Néanmoins, les modèles d'études utilisés ne tiennent pas suffisamment compte de la complexité de la peau et se limitent généralement à l'étude d'un polluant particulier.

Il semble donc nécessaire d'approfondir les études réalisées en utilisant un modèle très proche de la peau *in vivo*, comme les peaux reconstruites ou les explants de peau, mais également en modélisant de façon réaliste l'exposition à un mix de polluants, tel que l'on pourrait le retrouver dans l'atmosphère. Ceci permettrait de mettre en évidence de potentiels effets synergiques, comme il a pu être observé dans le cas de l'ozone et des UV (Valacchi et al. 2000).

Le choix a été fait, dans ce projet de thèse, de se focaliser sur les propriétés de surface de la peau, ce qui jusqu'alors n'a jamais été réalisé. En effet, les études décrites précédemment concernent essentiellement des phénomènes biologiques et des réponses cellulaires. Dans l'objectif de développer des produits cosmétiques capables de protéger notre peau grâce des effets « barrière », « anti-adhésion » ou encore « bouclier », il est important de comprendre comment les polluants interagissent avec la surface de la peau. Parmi les différents paramètres de surface qui peuvent être étudiés, nous nous focaliserons essentiellement sur les lipides (leur composition et organisation) car ils sont essentiels pour la fonction barrière. L'étude de ces lipides sera réalisée en partie par une approche physico-chimique, dont les principes sont présentés dans le chapitre 2, sous forme d'une revue bibliographique sur la physico-chimie de la surface de la peau.

Chapitre 2 – Etude de la physico-chimie de surface de la peau

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue bibliographique, publiée dans le journal Advances in Colloid and Interface Science

L'objectif de cette revue bibliographique est de faire le point sur l'ensemble des articles de la littérature présentant des informations sur la physico-chimie de surface de la peau. Cette revue présente également de nouvelles perspectives pour la recherche cosmétique et pharmaceutique, basées sur l'utilisation de cette propriété essentielle pour caractériser les interactions entre la peau et des produits topiques ou avec son environnement.

Dans un premier temps, des rappels concernant le calcul de l'énergie libre de surface sont présentés, accompagnés de la présentation de certains paramètres physico-chimiques importants pour l'étude de la surface de la peau : la tension de surface critique, la polarité, l'hydrophobie, la « balance des composantes d'énergie libre de surface » ...

Ensuite, les valeurs déterminées dans la littérature pour l'énergie libre de surface de la peau et les différents paramètres présentés précédemment sont exposés et une discussion est menée pour mettre en évidence l'impact de la teneur en lipides ou encore de l'hydratation de la peau sur son énergie libre.

L'importance de la physico-chimie de surface de la peau pour la recherche cosmétique, pharmaceutique ou dermatologique est également soulignée. En effet, cette propriété est impliquée dans de nombreux phénomènes comme l'adhésion, la pénétration d'actifs et d'agents pathogènes, ou encore la perception tactile de la surface de la peau, comme cela a pu être démontré par différentes études. Une meilleure compréhension de cette propriété surfacique est donc indispensable pour développer des produits topiques en contrôlant leur efficacité (barrière, anti-adhésion ...).

Enfin, de nouvelles méthodologies d'étude de la physico-chimie de surface de la peau sont présentées. Celles-ci sont fondées sur l'utilisation de modèles de peau non-biologiques mimant les propriétés de surface de la peau. L'ensemble des surfaces et matériaux utilisés sont répertoriés, comparés et leur pertinence est discutée.

Certains nouveaux résultats viennent appuyer cette revue, notamment afin de comparer les différents modèles (biologiques et non-biologiques) avec la peau *in vivo* et valider leur possible utilisation pour étudier les interactions peau/produit topique et peau/environnement.

Skin surface physico-chemistry: characteristics, methods of measurement, influencing factors and future developments

EUDIER Florine, SAVARY Géraldine, GRISEL Michel* and PICARD Céline*

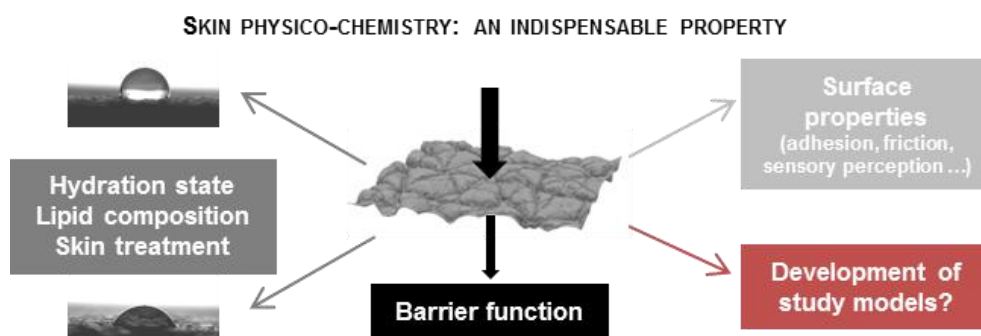
Normandie Univ, France; ULH, URCOM, F-76600 Le Havre, France; EA 3221, FR 3038
CNRS, F-76600 Le Havre, France

*Corresponding authors celine.picard@univ-lehavre.fr and michel.grisel@univ-lehavre.fr

Abstract

Physico-chemical properties such as surface free energy, polarity or hydrophobicity of solid surfaces have been largely studied in literature because they are involved in many physical phenomena: adhesion, friction, wetting ... Nowadays, the study of biointerfaces is of great interest for the medical, the pharmaceutical or the cosmetic field but also for material design researches, especially for the development of biomimetic surfaces. The present paper focuses on a particular biointerface, namely skin, which is the most extended organ of the human body. The different ways for the study of skin physico-chemistry are first reviewed, followed by their practical uses, from pharmaceutical to cosmetic science. Those properties depict the ways skin interacts with topical products, its lipid composition but also its hydration state. In addition, this article aims to present recent approaches using original model materials in order to mimic human skin; indeed, *in vivo* experiments are often limited by the inter and intra individual variability, the safety regulation and above all the time and the cost of such studies. Finally, further data clearly highlight the importance of skin surface properties for dermatological and pharmaceutical researches.

Graphical abstract



Highlights

- Methodologies for studying skin physico-chemistry are presented
- Influence of several factors on skin surface free energy is described
- The interest of physico-chemistry for skin researches is highlighted
- Relevance of skin models to study skin physico-chemistry is discussed

Keywords

Contact angle – surface free energy – skin – model – physico-chemistry

Contents of paper

Introduction	61
1. Methods for measuring surface physico-chemical properties	64
1.1. Surface free energy	64
1.2. Contact angle measurements and surface free energy calculation	66
1.3. Physico-chemical parameters interesting for skin studies: critical surface tension, polarity, hydrophobia	68
2. In vivo measurements of skin physico-chemical parameters	70
2.1. Skin surface free energy and physico-chemical parameters	70
2.2. Impact of lipids on skin surface physico-chemistry	74
2.3. Influence of skin hydration state	75
2.4. Comparison with ex vivo measurements	76
3. Relevant properties involved in diverse research areas: from tribology to cosmetic and sensory aspects	78
3.1. Impact of skin physico-chemistry on its adhesive behavior	79
3.2. Impact of ingredients on skin hydrophobia: pharmaceutical and cosmetic applications ...	79
3.3. Emollients and emulsion physico-chemistry: impact on sensory perceptions.....	81
4. Modeling of skin surface physico-chemistry: which interest for future developments?	84
4.1. Interest in modeling skin using non-biological surface	84
4.2. Existing models and uses.....	84
4.3. Characterization of two commercial skin models	88
4.4. Perspectives.....	91

Introduction

The skin is the external organ of the human body. With a surface area around 2m², weighing about 15% of the total body weight [1], it is also the heaviest and most extensive organ. Through its different layers and its appendages (hair, sweat glands, nails ...) it plays an

essential role for the protection against external aggressions (chemical compounds, mechanical damages, biological attacks, climatic variations ...). The uppermost skin layer, the *stratum corneum* (SC) (fig 1), plays a major role in skin barrier function [2]. This superficial layer is usually represented by the “bricks in mortar” model where the keratin-enriched corneocytes [2,3] are the bricks, embedded in the intercellular “mortar” made with neutral lipids essentially composed of ceramides, free fatty acids, cholesterol and organized in a lamellar structure [2,4,5]. This SC is recovered by a hydrolipidic film consisting of sebaceous lipids combined with water from sweat and environment. This film is considered by some authors as a spontaneous emulsion also referred as the “fourth skin layer” [6,7] (fig 1). Although, this spontaneous emulsion formation is still under debate, as no clear evidence can be brought [8,9].

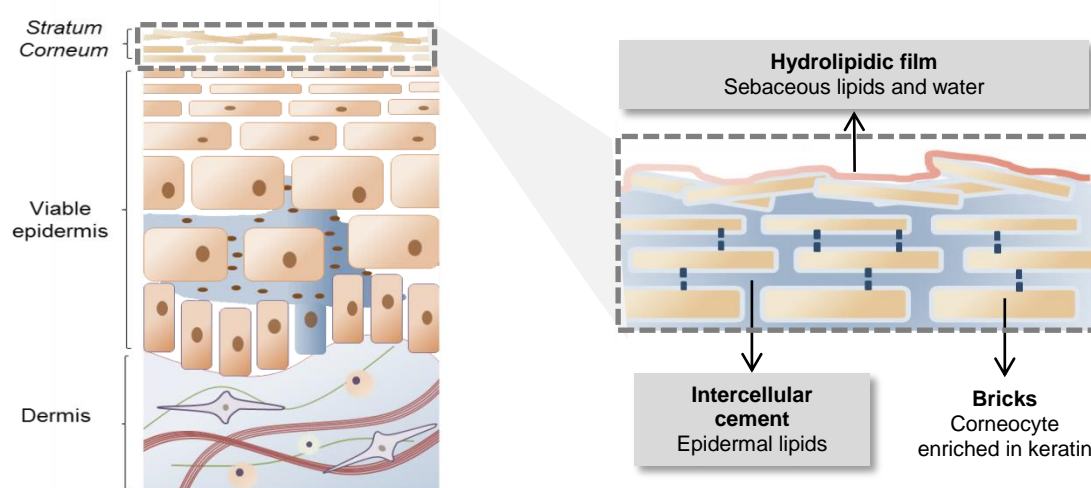


Fig 1: Schematic representation of skin structure, with an emphasis on its uppermost layer, the *stratum corneum*

The *stratum corneum* is involved in the modulation of skin permeability regarding chemicals and microorganisms, presents impressive mechanical resistance and controls the transepidermal water loss [2,4,5]. The chemical composition of SC lipids and their organization have been deeply studied [10–12]. Two lipids classes are present onto *stratum corneum* surface as reported in table 1: the epidermal lipids originating from viable epidermis and the sebaceous lipids, secreted by the sebaceous glands. The proportion between sebaceous lipids and epidermal lipids depends on the body site: sebaceous lipids are abundant and predominant on skin face whereas epidermal lipids are dominant on mostly other body sites [11].

Table 1: Lipid composition on skin surface, adapted from [10,13].

Lipid nature	Composition of epidermal lipid mixture (%)	Composition of sebaceous lipid mixture (%)
Cholesterol sulfate	1.3 – 1.7	/
Free sterols	12.9 – 15.1	1.0 – 9.5
Free fatty acids	15.6 – 23.0	2.3 – 38.3
Triglycerides	20.6 – 29.8	14.8 – 44.0
Wax esters and sterols	4.5 – 6.3	11.0 – 29.0
Squalene	2.8 – 6.8	3.3 – 20.0
n-alkanes	3.5 – 8.7	/
Glucosylceramides	Traces	/
Ceramides	17.7 – 18.5	/
Other polar lipids	3.3 – 6.5	/

According to the different lipids classes present onto human *stratum corneum*, surface properties can be highly variable. In addition, human skin is a living tissue, constantly evolving and renewing itself by constant lipids secretion [14]. So, such biological material is complex and its characterization is a genuine issue for dermatologists, cosmetologists or pharmacists. If both the skin chemistry and biology are now well studied, only very few studies focused on its physico-chemical properties, whereas they can be an indispensable approach for pharmaceutical or cosmetic studies.

Surface physico-chemistry plays a role as soon as a substance is put in contact with the skin. It can be either cosmetics, detergents or other topically applied agents, but also harmful agents or pollutants. These physico-chemical properties determine for example the adhesion of particles or the ease of spreading of a product onto the skin. These properties are essentially calculated from contact angle measurements, making it possible to determine various parameters such as surface free energy or critical surface tension. From the knowledge of skin surface physico-chemistry, it is obvious that a lot of work remains necessary to evaluate the impact of skin wettability on its permeability, the interactions with topical products and each of their components (oil phase, aqueous phase, surfactants, rheological modifiers, film forming agents...) but also on skin sensory properties. Nevertheless the difficulty to study a living and complex material such as human skin leads to a lack of information about its physico-chemical behavior. The aim of this review is consequently first to draw up an inventory of the data available in the literature concerning skin wettability by confronting results and presenting some guidelines for measurements. Then the influence of several factors on skin surface free energy will be presented and the importance of this field for dermatological and pharmaceutical researches will be highlighted. Finally, an opening on the future perspectives for skin research will focus on the development of synthetic model materials able to mimic skin surface properties. Those

models can help to relatively simplify studies by reducing their cost and time, and can avoid some toxicity issues raised by *in vivo* measurements.

1. Methods for measuring surface physico-chemical properties

1.1. Surface free energy

The intermolecular interactions at interface between two condensed phases (solid/solid; liquid/liquid; solid/liquid) or between a condensed phase and a gas (solid/gas; liquid/gas) are generally unbalanced and responsible for the surface energy or surface tension needed to maintain these interfaces. Surface free energy γ_s of a solid/gas interface is equivalent to surface tension parameter of a liquid γ_L and is defined as the energy needed to increase the area of a single phase surface by one unit [15].

Beyond covalent and electrostatic forces, several intermolecular forces either polar or apolar are involved in the interactions between two phases. The short-range Van der Waals forces play a key role in surface free energy. They consist of the orientation force (Keesom), the induction force (Debye) and the dispersion force (London). Additional forces are involved in intermolecular interactions such as the hydrogen-bonding (HB) also referred as the (Lewis) acid-base or the electron-acceptor / electron-donor interactions [16]; or the π systems interactions (π -interactions). Assuming that each interaction acts individually, it can be considered that all these components contribute additively to the surface free energy. Thus, as highlighted by Fowkes [17,18], it can be written:

$$\gamma_s = \gamma_{\pi\text{-interactions}} + \gamma_{\text{electrostatic}} + \gamma_{\text{Keesom}} + \gamma_{\text{Debye}} + \gamma_{\text{London}} + \gamma_{\text{HB}} \quad (1)$$

This expression may be simplified by gathering interactions according to their polar or apolar properties, thus reducing (1) to the expression:

$$\gamma_s = \gamma^d + \gamma^p \quad (2)$$

Where γ^d corresponds to the dispersive interactions (London force) and γ^p to the polar ones (Keesom and Debye forces, hydrogen bonding, acid/base interactions ...).

Several mathematical models coexist in literature to express interfacial energy according to the previous surface free energy parameters. In the case of only dispersive interactions (one-component model), it is possible to use the Fowkes expression described in [19]. However, skin interactions are quite complex thus making necessary the use of a model including the polar interactions (at least a two-components model). The two-components models used in skin research are therefore the Owens, Wendt, Rabel and Kaelble (OWRK) model and the Wu model. Both models are similar but the Wu model includes the harmonic mean [20] rather than the geometric mean for the expression of the interfacial energy:

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{\gamma_1^d \gamma_2^d} - 2\sqrt{\gamma_1^p \gamma_2^p} \quad (3) \quad (\text{OWRK model})$$

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 4 \left(\frac{\gamma_1^d \gamma_2^d}{\gamma_1^d + \gamma_2^d} + \frac{\gamma_1^p \gamma_2^p}{\gamma_1^p + \gamma_2^p} \right) \quad (4) \quad (\text{Wu model})$$

The Wu model appears as the most adapted one when studying low surface free energy materials such as polymers and human skin. However, using a two-components model, the acid and base properties of materials are not well described. Thus, the Van Oss model (three-components model) is finally more suitable and more precise.

Following the Van Oss approach [16,21], as the London force contribution largely dominates in the Van der Waals interactions regarding surface free energy, all three forces are combined in a single term called the “Lifshitz-Van der Waals parameter” which is considered as the apolar and additive component of surface free energy. Other interactions correspond to the polar part of the surface free energy also referred as the acid-base interactions which are non-additive and asymmetric. Consequently, equation (1) can be written as follow:

$$\gamma_s = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad (5)$$

Where γ_s^{LW} is the Lifshitz-Van der Waals component and γ_s^{AB} is the acid-base component according to the Lewis concept.

This acid-base component is expressed by the geometrical mean of two parameters: γ^+ (electron acceptor) and γ^- (electron donor):

$$\gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-} \quad (6)$$

This last component includes the hydrogen-bonding and the π -interactions. The determination of γ_s^+ and γ_s^- allows highlighting the monopolar or bipolar behavior of a surface. Indeed, if $\gamma_s^+ \neq 0$ and $\gamma_s^- \neq 0$ thus $\gamma_s^{AB} \neq 0$ and then surface is referred as bipolar. On the contrary, if $\gamma_s^+ = 0$ or $\gamma_s^- = 0$ thus $\gamma_s^{AB} = 0$ is referred as monopolar, which is different from any apolar material, for which both components are equal to zero. Indeed, a monopolar material can strongly interact with a bipolar substance and with a monopolar one with opposite sign, contrarily to any apolar surface [21]. Using this Van Oss model (5), the interfacial energy between a solid S and a liquid L can be written as follow:

$$\gamma_{SL} = \gamma_s^{LW} + \gamma_L^{LW} - 2\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2 \left(\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_s^-} - \sqrt{\gamma_s^+ \gamma_L^-} - \sqrt{\gamma_s^- \gamma_L^+} \right) \quad (7)$$

The use of the Van Oss model with three parameters ($\gamma_s^{LW}, \gamma_s^+, \gamma_s^-$) is of great interest to fully describe material such as skin. Indeed, monopolar behavior is frequently found for classical polymers and biopolymers such as gelatin, agarose, cellulose nitrate or

polymethylmetacrylate. Thus, equations consisting of only two parameters as used by Owens et al. [22] appears unsuitable as leading to a loss of information.

The determination of the solid surface free energy implies the evaluation of the intensity of each individual surface energy component; to this end the most common method for skin consists of contact angle measurements for reference liquids and, then, the resolution of the well-known Young equation.

1.2. Contact angle measurements and surface free energy calculation

Contact angle can be measured when a drop of a liquid is deposited on the horizontal and flat surface of a solid material. This technique is so-called the sessile drop method (fig 2). Once formed onto the surface, the drop can keep its shape or spread, increasing contact area.

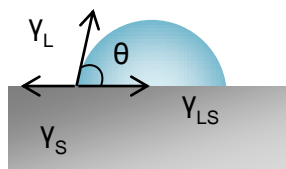


Fig 2: Definition of the contact angle θ ($^{\circ}$) between a solid (S) and a liquid (L)

When the drop reaches the equilibrium, the so called “Young equation” can be written as follow:

$$\gamma_S - \pi_e = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos \theta \quad (8)$$

Where π_e is the film pressure. This last parameter can be neglected in the case of low surface energy solids like the skin.

Using the expression of interfacial surface free energy γ_{SL} (7) given by Van Oss model, equation (8) can be written:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L = 2 \sqrt{\gamma_L^{LW} \gamma_S^{LW}} + 2 \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_S^-} + 2 \sqrt{\gamma_L^- \gamma_S^+} \quad (9)$$

Following this equation, the surface free energy of the solid surface can be determined with using at least three different liquids of known surface tension components. The choice of the three reference liquids may influence values of the three components, as it has been showed by several workers [23,24]. Among the five most used liquids (water, glycerol, formamide, diiodomethane and bromoform) it is recommended to select one weak monopolar liquid (e.g. diiodomethane or bromoform), and two polar liquids with quite distinct components (e.g.

water and formamide or water and glycerol). The use of liquids owning similar surface tension components is strongly discouraged [23]. The most usual reference liquid systems (a) and (b) used for skin studies are given in table 2, with the corresponding surface free energy component values.

Table 2: Surface free energy components of water, diiodomethane, formamide and glycerol, determined at 20°C.

Liquid	System	γ_L (mJ/m ²)	γ_L^{LW} (mJ/m ²)	γ_L^+ (mJ/m ²)	γ_L^- (mJ/m ²)
Water	(a) (b)	72.8	21.8	25.5	25.5
Diiodomethane	(a) (b)	50.8	50.8	0.7	0.0
Formamide	(a)	58.0	39.0	1.9	47.0
Glycerol	(b)	64.0	34.0	3.9	57.4

Theoretically, a single angle θ_{eq} is obtained for a given system. However, in a real system like skin, a variation of the contact angle values is observed due to surface heterogeneities. The higher value obtained is called advancing contact angle θ_a and corresponds to the maximum value of the contact angle when the drop volume is increased before the solid-liquid contact surface starts moving. Oppositely, the corresponding lower value is the receding contact angle θ_r . The difference between these two values corresponds to the hysteresis of the contact angle: $\theta_{hyst} = \theta_a - \theta_r$. In practice, all materials exhibit a contact angle hysteresis attributed to the roughness and heterogeneity of surfaces, among others. It also depends on the molecular composition of the liquid and the contact time between the phases. Additionally, other phenomena such as retention or sorption of the liquid can thus intervene in the phenomenon of hysteresis [25].

From a practical point of view, the advancing contact angle measurement is often preferred as more repeatable for low surface energy materials [26]. Indeed, when a drop is deposited onto a given surface, it is generally in a random metastable state where $\theta \neq \theta_{eq}$ [27]. Thus, the advancing contact angle approaching the maximum contact angle value, measurement errors are lowered and this advancing contact angle is less affected by surface heterogeneities or defaults [26].

Then, the Van Oss model has been defined for a smooth and homogeneous surface. Concerning the human skin, which is a rough and heterogeneous surface, the impact of roughness on contact angle measurements should be specified. The roughness coefficient as defined by Wenzel et al [28] should be used to adjust contact angle value:

$$\cos \theta^* = r \cos \theta$$

Where $r = \frac{\text{real surface area}}{\text{appearing surface area}} \geq 1$ the roughness coefficient, θ^* the measured contact angle, θ the real contact angle

Following this roughness coefficient defined by Wenzel et al. [28], for real contact angle higher than 90° , roughness tends to increase the measured contact angle values whereas for real contact angle lower than 90° , roughness decreases the measured values [29]. Nevertheless, different studies dealing with the effect of roughness on wettability of random surfaces like skin show that this coefficient does not correctly describe real contact angle measurement [30–32]. Consequently, in skin studies, the roughness parameter is generally not taken into account but can be an important source of variations. In particular, in order to compare different surfaces or skin areas, the influence of this parameter should not be neglected.

Temperature is another parameter influencing physico-chemical measurements, *in vivo* skin surface temperature lies between 30 and 35°C , according to the body site [32,33]. Indeed, it is known that both surface tension and surface free energy evolve following temperature variations. In particular, surface tension of liquids used as probe for contact angle measurements decrease with increasing temperature [34]. Due to the contact time between the liquid droplet and the surface and to its low volume (around $5 \mu\text{L}$), it is assumable that the liquid temperature evolves during measurement [32]. This liquid warming could then modify their surface tension parameters and induce calculation errors in the skin surface free energy parameters. However, for skin studies, this parameter is generally not taken into account especially when the aim of the study is to compare different skin types or body sites [32] as temperature only varies from few units. Nevertheless, small temperature variations may explain some differences observed between *in vivo* skin and biological or non-biological skin models, which will be discussed in the following paragraphs.

In addition, according to literature data reporting the impact of solid surface temperature on contact angle measurements, there is no clear evidence of the effect of temperature, which seems to depend on the hydrophobicity and the nature of the studied material [35].

1.3. Physico-chemical parameters interesting for skin studies: critical surface tension, polarity, hydrophobia

Surface free energy is a crucial physico-chemical parameter when studying surface physico-chemistry. Other characteristic coefficients have been defined in the literature and are relevant for skin studies.

Critical surface tension (CST) as defined by Zisman [36] is a parameter approaching the surface free energy. CST is defined on the following principle: any liquid whose surface tension is less than this CST totally wets the solid while a liquid owning a surface tension greater than the CST do forms a drop onto the solid surface [37]. Indeed, Zisman demonstrated that for low-energy surfaces, a linear relationship, so-called the Zisman plot, can be defined between $\cos \theta$ and the surface tension γ_L of the studied liquid:

$$\cos \theta = 1 - b(\gamma_L - \gamma_C) \quad (10) \text{ where } \gamma_C \text{ is the CST.}$$

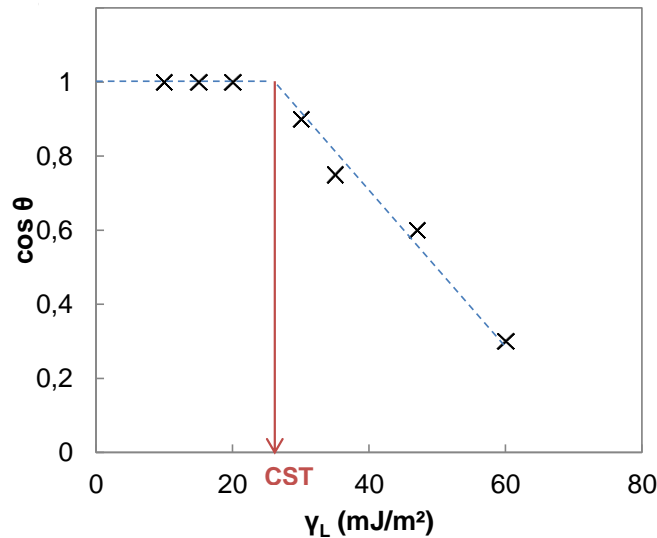


Fig 3: Example of Zisman plot, adapted from Elkhyat et al. [37]

Consequently, the CST is the limit surface tension such that $\cos \theta = 1$ means that $\gamma_L = \gamma_C$. Based on this relation, CST is accessible and can be graphically determined by plotting $\cos \theta = f(\gamma_L)$ using at least three liquids of known surface tension. An example of Zisman plot is presented on fig 3. This method is frequently performed using organic liquids; it is also valid for miscellaneous liquids and relevant for polymers studies [24].

Surface polarity (P) has been defined in [38] using the OWRK model (3) of surface free energy, such as [20]:

$$P = \frac{\gamma_S^P}{\gamma_S}$$

Polarity can be related to another useful parameter, the *surface hydrophilia* H_i which characterizes the ability for a surface to be wetted by water, a fundamental liquid in biological studies. According to Elkhyat et al [38], this parameter is of interest to simply quantify skin interactions with water; it is defined as follow:

$$H_i = \frac{\gamma_C}{\gamma_{H_2O}} \quad \text{where } \gamma_C \text{ is skin CST and } \gamma_{H_2O} \text{ is water surface tension.}$$

Its reciprocal, *surface hydrophobia* (H_o) is defined as $H_o = 1 - H_i$.

Finally, another parameter has been defined to characterize skin surface: the *SEB* “*Surface free Energy component Balance*” [39] which is the ratio $\gamma_S^{AB}/\gamma_S^{LW}$. This SEB should help to characterize the wetting properties of skin surface, quite similarly to the HLB (Hydrophilic-lipophilic balance) used to classify the functional properties of surfactants.

All parameters values for human skin will be reviewed and discussed in the following paragraphs.

2. In vivo measurements of skin physico-chemical parameters

2.1. Skin surface free energy and physico-chemical parameters

The first studies dealing with skin physico-chemistry were led by German workers in the 1950s [37,40,41]. They used water and oily liquids to evaluate both their contact angle and contact area on the skin surface. They were first establishing that skin “keratin” is hydrophobic, but were not able to determine surface free energy yet.

In 1968, Ginn et al. [42] evaluated the CST of dorsal index finger skin using acetone/water solutions of various ratios. According to the Zisman plot, they determined a CST of 26.8 mJ/m², indicating that human skin is a highly hydrophobic surface, with a behavior similar to polyethylene. This early study, limited to the hand skin, also highlighted many difficulties when studying skin surface, in particular: quite significant measurement errors, contact angle variations due to different test areas, inter individual differences and effect of skin roughness. In addition, they established the huge impact of skin pretreatment on contact angle values: indeed, non-treated skin showed a value of $58 \pm 2^\circ$, while once washed with soap, rinsed with water and dried with a towel, contact angle values increased to $104 \pm 3^\circ$.

Schott confirmed the huge inter individual variations of water contact angle measured on finger skin. For 13 subjects, θ_{water} varied between 60 and 91° [43]. He used a series of polar propylene glycol / water solutions to determine skin CST on two distinct anatomic sites: finger and forearm. Calculated CST were 24.7 mJ/m² and 29.4 mJ/m², respectively, which is consistent with the value reported by Ginn et al. [37]. However, according to Schott, when considering that CST value for 6.6-nylon is 46 mJ/m², values calculated for skin are surprisingly low. Indeed, skin surface is enriched in keratin, an abundant natural polymer, whose structure enriched in amide groups may be considered as roughly similar to 6.6-nylon. Owing numerous polar functions, skin surface should therefore show a CST at least as great as 6.6-nylon [43]. Nevertheless, in spite of the surface roughness impact on the contact angle values, this surface feature could not allow explaining the low CST observed.

Rosenberg et al. [44] in 1973 used the Good-Girafalco-Fowkes-Young equation and studied interaction forces involved in skin wetting. They concluded that skin develops very low polar interactions with test liquids, thus enhancing its hydrophobic behavior. To support this statement, they proposed that polar groups of α -keratin present on skin surface are oriented away from the interface as a result of coil conformation. This peculiarity allows explaining the differences between human skin and 6.6-nylon surface regarding CST. In addition, as pointed out by Dann [45] the use of polar liquids for CST determination leads to lower value than when using hydrocarbons, which own only dispersive components. The correction proposed by Rosenberg to counteract this point leads to a CST value of 37.0 mJ/m², which is consistent with the following work of El Shimi and Goddard [46]. These authors studied low energy surfaces using the Wu expression to determine polar and dispersive interactions. They obtained a value of 23.1 mJ/m² for skin dispersive interactions and 15.1 mJ/m² for polar interactions, which lead to a value of skin surface free energy of 38.2 mJ/m² as measured on the dorsal region of the index on two volunteers. Consequently, the polar interactions developed by human skin surface appear similar to the polar component of 6.6-nylon (15.8 mJ/m²), thus suggesting the presence of polar lipids onto the *stratum corneum*.

Kenney et al [47] also reported a non-negligible polar component for skin surface free energy as measured with water and methylene iodine following the Wu approach. They even highlighted that skin polarity P increased with rising temperature and sweating: from 13% at 23°C it reached 39% at 36°C, whereas the dispersive component remained constant whatever the temperature. Unfortunately, the measurement site was not mentioned in this work.

One of the first study led on another area than fingers and arm was performed in 1996 by Elkhyat et al. [37], who determined CST on volar forearm and forehead on 12 and 10 volunteers, respectively. They were also the first evaluating the physiological parameters impact on skin wettability. Mean CST measured using low surface tension liquids on the volar forearm was 27.5 ± 2.4 mJ/m², this being in very good agreement with previous data. This value seemed independent of both the age of the person and the measurement side (left or right). In addition, measured values are stable during time. Nonetheless, CST value greatly varied between volar forearm and forehead, and CST could not be calculated for this last surface as it was higher than the surface tension of liquids used. Elkhyat et al. pursued their study some years later by introducing the hydrophilia parameter Hi [38] with the aim to simply classify skin surface according to its affinity with water. Thus, before any treatment, forearm Hi was 38% (with using $\gamma_{H_2O} = 71.7$ mJ/m²) and skin polarity P was 27.5%.

Mavon et al. [32] finally studied skin surface physico-chemistry using the Van Oss approach to determine both the acidic and the basic interactions of human skin as reported in table 3. They performed measurements on two distinct skin areas differing from their sebum content (volar forearm and forehead, as for previous Elkhyat's study) for ten volunteers. Inter individual variations for advancing contact angle measurements remained high (standard deviation between 6% and 12%) but in accordance with previous works. Surface free energy components calculation did not show significant difference between the two sets of liquids used Water – Formamide – Diiodomethane (a) or Water – Glycerol – Diiodomethane (b). Surface energy components calculated on both skin areas with liquids system (a) are reported in table 3; these data remain the only data available in literature concerning the three components approach.

Table 3: Surface free energy components values determined by Mavon et al. using the liquids system (a)

	γ_s^{LW} (mJ/m ²)	γ_s^+ (mJ/m ²)	γ_s^- (mJ/m ²)	γ_s (mJ/m ²)
Volar forearm	35.6 ± 5.8	0.8 ± 0.7	4.2 ± 3.0	38.7 ± 6.4
Forehead	35.0 ± 3.1	0.5 ± 0.2	28.3 ± 11.5	42.5 ± 3.9

Differences observed between both areas mainly concern the basic component γ_s^- which markedly impacts the total surface free energy γ_s . Thus, volar forearm skin appears as a weakly monopolar basic surface whereas forehead skin behaves as a highly monopolar basic surface. These conclusions are quite important for understanding skin interactions, and do highlight the contribution of the Van Oss approach when compared to other approaches such as the two components one or the Zisman CST. Up to now, Mavon's work remains one of the lonely *in vivo* comprehensive studies of intrinsic skin physico-chemistry.

The acid/base properties of skin surface highlighted by Mavon et al. [32] also control the pH-dependence of the *stratum corneum*. As an illustration, Wagner et al. [48] performed contact angle titration on the *in vivo* forearm previously washed with soap and water and dried, using different KCl solutions whose pH was varied by adding HCl or KOH. They demonstrated that skin wettability is strongly influenced by the pH of probe solutions. Such modifications of skin wettability induced by pH were explained by the pK_A values of different skin lipids. At pH < 3, amides are protonated and thus positively charged. With increasing pH (4 < pH < 6), amides become deprotonated thus reducing the *stratum corneum* water affinity and increasing contact angle values. Then, for pH higher than 8, both carboxylic acids, owning pK_a higher than 8 [49], and alcohol functions became negatively charged thus increasing the affinity of

skin surface with water. Finally, solutions with $\text{pH} > 13$ almost completely wetted the skin. Those contact angle titrations are of high interest for studying skin lipids composition changings.

To sum up, previous studies using the Zisman plot all agree that skin surface behaves as a low energy, highly hydrophobic and apolar surface. However, El Shimi and Goddard [46] and Kenney [47] were able to detect polar interactions for skin with using the Wu approach. Finally, Mavon et al. demonstrated that skin is a monopolar rather than a polar surface. It has important consequences in terms of interactions because strongly monopolar materials can repel each other if belonging the same charge signs. A monopolar material may also strongly interact with polar materials, those last should be more correctly called "bipolar" instead of "polar" [21].

Authors also agreed that contact angle and surface free energy depend on body area, skin pretreatment and vary between individuals. Table A in annexe 1 reports all parameters calculated for skin.

We can also conclude from those works that human skin being a living tissue is a complex material to analyze due to its chemical and topographical heterogeneity. Consequently, there is not only one correct value for skin surface free energy, hydrophobia or polarity. Of course, evolution in theoretical means and instrumental performance lead to consider most recent works as more accurate. But some parameters no pointed out in reported studies could be taken into account to explain those variations. Indeed, as previously mentioned, temperature could impact skin surface free energy but also the properties of probe liquids. Reported values for skin are generally measured at ambient temperature between 20°C and 25°C but the droplet warming in contact with the skin has never been taken into account. It would deserve to be deepened. Then, the droplet size can also influence contact angle measurements. However, when the drop diameter is lower than 0.5 cm, the advancing contact angle does not depend on the diameter of the drop, which is generally the case when its volume is lower than $7\mu\text{l}$. In addition, the impact of the droplet size is more important on the receding contact angle than on the advancing one [50]. Thus it probably does not fundamentally impact the contact angle measurements performed on skin. However, this experimental condition should be mentioned to better compare the different studies.

As guideline for skin physico-chemical studies, it is important to standardize the measurements methods (same study area, same protocol, same pretreatment ...) and to always refer to a parameter calculated in the same conditions (temperature, droplet size ...).

2.2 Impact of lipids on skin surface physico-chemistry

As frequently reported in the literature, skin surface lipids strongly impact the skin surface physico-chemistry, thus explaining marked contact angle values variations depending on both the body sites and skin pretreatment.

Many authors have demonstrated that water contact angle increases as well as CST and / or surface free energy when extracting skin surface lipids using solvents such as ether, ethanol or surfactant-containing products, [32,37,38,42,43,51]. So from a general point of view one can conclude that skin surface lipids enhance skin wetting. This point was particularly studied by Mavon et al. [32,39] who observed that the difference between forearm skin (low sebum level) and the forehead skin (high sebum level) mainly relies on water and formamide contact angles. Thus, as previously mentioned, forearm skin is lipophilic and hydrophobic whereas forehead skin is lipophilic but hydrophilic. After ether treatment, both skin types show increased hydrophobicity. Consequently, skin lipids, more particularly sebaceous lipids markedly increase skin hydrophilicity. Regarding skin interactions, sebaceous lipids considerably increase the basic component γ_s^- whereas they do not impact the acidic γ_s^+ and the dispersive γ_s^{LW} ones. Mavon et al. [32] also noticed that there is surprisingly no clear correlation between the basic component and the amount of sebaceous lipids. This last observation clearly supports the fact that not only the amount but also the composition in lipids impact skin surface free energy.

The hydrophilicity increase is ascribed to amphiphilic or polar lipids, as also suggested by El Shimi and Goddard [46]. Human stratum corneum lipids are mainly composed of neutral lipids such as free sterols, free fatty acids (FFAs) with chain length from C12 to C24 (mainly C16 and C18), triglycerides, sterol and wax esters or n-alkane [4]. Regarding this composition, the probably most amphiphilic lipids are the FFAs resulting from the triglycerides hydrolysis; these last represent less than 20% of epidermal lipids. However, sebum is enriched in FFAs which represent almost 30% of sebaceous lipids [32]. FFAs exhibit carbonyl groups, able to form hydrogen bonding and which are enriched in electrons. Carbonyl groups can so increase interactions with water and enhance the surfaces monopolar basic behavior [21]. The amount of FFAs can consequently be related to the skin surface free energy basic component, although no correlation has been defined yet. FFAs should also be able to interact with basic compounds, thus increasing the skin surface acidic behavior. However, γ_s^+ remains very low even with a high amount of sebaceous lipids. Good and Van Oss [52] explained the low acidic behavior of several solid surfaces by their hydration. Indeed, water molecules are strongly bound to hydrated surfaces and difficult to desorb, thus hiding the Lewis acidic character of underlying groups. Consequently, water

molecules present on skin surface originated from transepidermal water loss or sweat may be responsible for the monopolar instead of bipolar behavior.

To deepen the role of sebaceous lipids on skin physico-chemistry, Mavon et al. [39] studied three different skin types, namely: normo-seborrheic (NS) (casual sebum level on the forehead of around 139 AU as measured using a Sebumeter®); hyper-seborrheic (HS) (casual sebum level around 211 AU) and oligo-seborrheic (OS) (casual sebum level around 70 AU) also called “dry skin”. Before any treatment, γ_s^{LW} is almost equal for all three skin types (37.6 mJ/m² at the baseline), meaning that dispersive interactions are independent of the sebum level. When washing skin, authors observed only a slight decrease of this dispersive component by 4 mJ/m² from the baseline. In addition, γ_s^{LW} measured on the forehead (mainly composed of sebaceous lipids) and on the forearm (mainly composed of epidermal lipids) were found identical, meaning that both epidermal lipids and sebaceous lipids lead to the same dispersive interactions. Between the three skin types, the major difference concerns the basic component, whose value is around 21 mJ/m² for NS and HS and 11 mJ/m² for OS. Between NS and HS, even if their sebum levels are different, their basic components remain the same, meaning that sebum level does not influence γ_s^- value. Authors explain this last result by the FFAs content, as hypothesized previously, which is lower for OS than for HS. Consequently, HS and NS should present the same FFAs amount. Finally, after washing, the basic component level is restored later than the sebum level for all skin types, which can be due to the time needed for the hydrolysis of the native sebaceous triglycerides into FFAs. This last phenomenon illustrates how a living tissue such as human skin constantly evolves, thus underlying all its complexity.

Regarding those studies, many questions remain unexplored. For instance, if the effect of FFAs on skin surface free energy appears well demonstrated, others important lipids should be studied, especially the amphiphilic ceramides involved in skin barrier function and representing an important portion of the epidermal lipids [10,53]. In addition, the influence of skin surface pH on its hydrophobia could be deepened, in the view of the work from Wagner et al. [48]. Such studies may undoubtedly help to better understand the influence of lipid composition on skin interactions and surface properties.

2.3. Influence of skin hydration state

Only a small number of studies dedicated to the impact of skin hydration on its physico-chemistry are available. In addition, conclusions obtained are somewhat contradictory. First, Elkhyat et al. [37] demonstrated that skin occlusion, performed using a polyethylene sheet, decreased its CST (CST after occlusion being of 21.6 ± 3.4 mJ/m² as measured on 4 volunteers). Occlusion, which is known to increase skin hydration by reducing transepidermal

water loss [54], thus conducts to an increase of skin hydrophobia. However, in another study [55] Elkhyat et al. demonstrated that applying a thermal water increased skin hydration and decreased skin hydrophobia. Thus, no clear conclusion can be drawn about the influence of skin hydration state from CST calculations. Moreover, those methods used to “hydrate” human skin may strongly modify its surface state. In the case of occlusion for example, many studies have been performed to evaluate its effect on skin permeation or hydration, but skin surface free energy and skin interaction with occlusive material have never been clearly taken into account. Otherwise, in the case of the application of a hydrating product, the residue remaining on skin surface after penetration and evaporation may significantly modify its surface free energy, whatever it presents a hydrating effect or not.

Interestingly, Mavon et al. [39] proposed a new approach to evaluate skin hydration, based on the SEB calculation. This SEB value represents the amount of hydrophilic components on skin surface: the higher SEB, the higher skin wettability. SEB thus depends on both the amount of FFA, as discussed previously, and the amount of water bind onto skin surface. In this study, OS skin exhibited a much low SEB value. OS was therefore considered as dry skin surface due to a deficit in hydrophilic compounds and less water bound at the interface and is consequently more hydrophobic.

2.4. Comparison with ex vivo measurements

The first *ex vivo* studies dealing with skin wettability date from 1973 and have been led by Rosenberg et al. [44]. Frozen breast skin was used as excised skin and contact angle measurements were compared with *in vivo* measurements performed on finger skin. Authors demonstrated that living and excised skins were quite comparable regarding surface wetting. The great interest in excised skin is its easier manipulation and the possibility to use harmful liquids. They determined CST of excised skin thanks to the Zisman plot with using a series of water/acetone solutions, and determined a value equal to 27.5 mJ/m², similar to *in vivo* measurements [37].

In 2000, Lerebour et al. [56] calculated surface free energy of reconstructed human skin epidermis Episkin® and compared results obtained with the reference papers of Mavon et al. [32,39]. They obtained a non-negligible acidic character if compared to both forearm and forehead skins; they also observed a quite important hydrophilicity, with $\theta_{\text{water}} = 56.9^\circ$. Consequently, physico-chemical behavior of the Episkin® model seems highly different from *in vivo* skin, especially from forearm skin. However, they did not take into account the low surface roughness of the *in vitro* model [57] if compared to the *in vivo* one [58], which makes the comparison fairly difficult.

Despite all the interest to use *ex vivo* skins, there is no recent paper dealing with their surface characteristics, especially from their physico-chemical characteristics, whereas they are largely used to evaluate actives efficacy by skin penetration measurements for instance. Consequently, we recently used the Van Oss approach to determine the surface free energy of human living skin explants (BIO-EC, Longjumeau, France). Human living explants used were from 8 different donors, male and female, Caucasian or African types. They were placed in a specific support to maintain their mechanical pre-tension in order to accurately reproduce *in vivo* topography. Surface was then gently wiped off before advancing contact angle measurements with water, diiodomethane and formamide, whose droplet size were lower than $7\mu\text{L}$. Skin samples and reference liquids were used at ambient temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). At least 3 explants of each donor were analyzed and contact angle were performed for each liquid in triplicate. Results obtained for surface free energy parameters are presented in fig 4, and compared with data obtained *in vivo* by Mavon et al. [32].

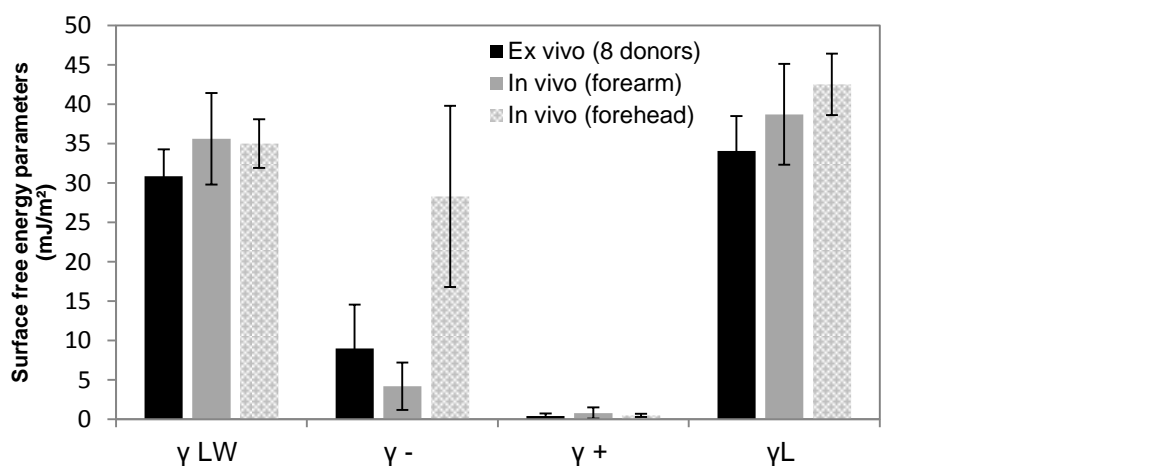


Fig 4: Surface free energy calculation performed on human living skin explants from eight different donors and comparison with *in vivo* reference data of Mavon et al. [32]

The first point to be highlighted is the good reproducibility of surface free energy parameters calculation between the 8 donors, for which measurements errors are comparable to previous works performed *in vivo*. Then, the dispersive component calculated *ex vivo* ($30.9 \pm 3.4 \text{ mJ/m}^2$) is slightly lower than for both *in vivo* forearm and forehead skin, even if, regarding error measurements of *in vivo* data, this value remains consistent. This difference could be explained by a smaller amount of epidermal lipids, essentially responsible for skin dispersive interactions as previously explained. It is important pointing out that sampling areas of explants were the breast and the abdomen, both parts owning a lipid composition fairly different from the forearm skin. Indeed, those body areas are less exposed to environment and sun radiation which undoubtedly modify their lipid composition and therefore may induce small differences in contact angle values. Then, data show that *ex vivo* skin presents a

monopolar basic behavior. This basic behavior is more pronounced than on the forearm skin but values remain similar, thus meaning that the amount of FFAs on skin explants is probably equivalent, and may be slightly higher than on *in vivo* skin forearm.

Overall, our results suggest that *ex vivo* skin samples behave in a very similar way as *in vivo* skin, this remaining true even if their surface temperature is different from *in vivo* skin. This point supports the fact that the temperature of the skin surface and the droplet warming do not impact significantly the measurements, considering all other possible variations sources (roughness, chemical composition, skin pretreatment ...).

They consequently appear strongly relevant to study skin properties such as surface interactions and permeation behavior. Those studies can therefore be of great interest from fundamental as well as industrial points of view in several research areas such as cosmetic, pharmacy or tribology. Those models can thus be a precious alternative to *in vivo* skin for physico-chemical studies which may deal with toxic compounds: diiodomethane or formamide for measurements, but also to study skin interactions with urban pollutants, harmful agents, bacteria ... The interest of such studies for dermatological research is presented below.

3. Relevant properties involved in diverse research areas: from tribology to cosmetic and sensory aspects

Skin surface is clearly the privileged substrate for topical application. That's why its surface properties, especially its surface physico-chemistry, are important to understand in order to improve knowledge about skin / products interactions.

The link between skin surface physico-chemistry and pharmaceuticals or cosmetics application is generally limited to the study of the emollients spreading onto skin. It is of course an important property for cosmetics or sunscreen products efficacy [59] but also for sensory perceptions [60]. However, surface physico-chemistry is a fundamental property involved in many other skin research issues, from skin adhesive behavior to sensory perception. Therefore, the link between skin surface physico-chemistry and dermatological applications is not restricted to the spreading behavior of liquids. An election of the most pertinent studies dealing with skin surface physico-chemical measurements for dermatologic, cosmetic or pharmaceutical applications is summarized below, with a particular emphasis on the remaining or raised issues, which have to be deepened in future works.

3.1. Impact of skin physico-chemistry on its adhesive behavior

Frictional and adhesive behavior of skin is involved in a numerous everyday life phenomenon: contact with textile, topic products, tactile perception... As an illustration, skin adhesive properties are widely studied at the macroscopic level for the development of medical bandages and dressing but also for transdermal drug delivery systems or medical devices attachment to skin [47,61]. Adhesion forces involved in the interactions between two solid are mainly influenced by their surface properties, especially their physico-chemistry [61], as shown by the Van Oss expression of the work of adhesion W_{12} (11) [62].

$$W_{12} = W_{12}^{LW} + W_{12}^{AB} = 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} + 2\sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+} \quad (11)$$

The relation between surface wettability and surface adhesion has been deeply studied in the case of biomaterials such as the dentin [63]. However, the effect of skin surface physico-chemical modifications on its adhesive behavior has not been investigated so far, thus it can be a very interesting topic to improve the performance of adhesive products.

In particular, surface physico-chemistry is a very important parameter involved in bacterial adhesion and transmission [57,64–66]. Many studies have been led regarding the impact of surface free energy and hydrophobicity on bacterial adhesion onto inert or synthetic materials [65–67]. However, only few studies strictly related to skin bacterial adhesion are available. Lerebour et al. [57] used the reconstructed skin model Episkin® to evaluate the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* according to their physico-chemical characteristics. Results indicate that the higher acid/base interactions developed by Episkin® seemed to induce higher adhesion of *S.aureus*, explained by its basic and hydrophilic character.

As several skin disorders such as psoriasis or seborrheic dermatitis are linked to a specific microbial disturbance [68], investigations concerning the implication or the consequences on skin physico-chemistry are undoubtedly of great interest to understand involved mechanisms and, above all, to develop innovative topical treatment for patients. Indeed, it may be possible to either reduce or induce bacterial adhesion by applying an appropriate skin surface treatment to reach a suitable surface free energy [57].

3.2. Impact of ingredients on skin hydrophobia: pharmaceutical and cosmetic applications

Expectedly, the application of raw materials or topical products on bare skin can greatly modify its surface free energy. It is consequently important to know and understand the different phenomenon involved in order to tune up adapted formulations for a specific use.

Elkhyat et al. [37] were the first focusing their research on skin care emulsions, these last representing standard topical products formulations. They evaluated skin CST after application of four different emulsions, either water in oil W/O and oil in water O/W ones, the composition of which remained unknown. Due to the low number of studied products, no clear conclusion could be drawn concerning the effect of emulsions type. However, the authors compared together the modifications induced on both the human skin and a glass surface. The important highlight of their work is that the impact of emulsions on skin is less marked if compared to the one of inert glass surface. They suggested that this could result from both the surface topography and chemical interactions differences. Obviously, when applied onto the skin, an emulsion strongly interacts with surface components (lipid bilayers, corneocytes, sebum ...) and also penetrates into the *stratum corneum*. Interactions depend on the nature and the composition of the emulsion: continuous phase, polar or apolar emollients, nature of surfactants, film forming or no film forming polymers, conservatives... Consequently, an extensive methodological work is required to allow fully characterizing those interactions and to understand the way emulsion composition induces skin physico-chemical modifications by its application. As an illustration, a former but interesting study was led by Ginn et al. [69] to evaluate skin - surfactants interactions. They studied skin wettability after washing with different surfactants solutions, intense rinsing and drying. They showed that cationic surfactants treatment drastically increased skin wettability even when used at low concentration; in addition, they observed that cationic surfactants are difficult to remove from skin surface when compared to anionic surfactants. This work proves that cationic surfactants are strongly bound onto skin surface, confirming that skin is able to strongly interact with acid compounds because of its monopolar basic behavior. Such an example clearly illustrates how skin physico-chemistry approaches is necessary for getting key information regarding the interactions between skin and surfactants as well as for any other given ingredients.

Several workers also used contact angle measurements to evaluate a particular property of their topical products. For instance, Millerioux et al [70] tried to evaluate the efficacy of formulations on skin as protective barrier against organophosphorous compounds. From *in vitro* experiment performed on silicon membranes, compounds permeation appears well correlated with contact angle measured after the application of barrier creams. The efficacy of the barrier cream against permeation was so linked to its residual film physicochemical properties. In the view of this study, it is surprising that the effect of skin physico-chemistry on compounds permeation is so little investigated, whereas this is of great interest for fields such as pharmaceutical actives permeation studies or cosmetic researches. However, the same study by Millerioux et al. also revealed that *in vitro* experiments on silicon membranes

were not in accordance with results obtained on pig skin, probably due to the skin/cream interactions and to the impact of creams on barrier function. This last restriction actually underlines the need to develop new surfaces or optimized existing ones to better mimic skin physico-chemical behavior.

Contact angle measurements and skin physico-chemistry can also be used to evaluate sunscreen product efficacy. Indeed, UV filters present in sunscreen formulation need to keep onto the uppermost skin layer to effectively protect skin from radiations; this property is strongly related to the water resistance of formulations. According to Hagens et al [71], the residual film wettability of sunscreens is one of the most important parameter to control its water resistance. In their study, they determined the equilibrium water contact angle on human skin before and after application of commercial sunscreen products on the volar forearm; they established that this technique was more accurate than classical method used to determine the water resistance, and therefore could undoubtedly represent a good alternative. Based on this example, no doubt that assessing all emulsion parameters involved in the residual film wettability could allow improving the development of sunscreens products. As an illustration, understanding the way a residual film is wetted, and thus how to formulate a sunscreen product for a better efficacy, are therefore properties to be investigated.

3.3 Emollients and emulsion physico-chemistry: impact on sensory perceptions

From a general point of view, the impact of topical products on skin surface wettability can be linked to their ability to limit the penetration of toxic compounds or to their water resistance. However, studies remain rare and these aspects need to be deepened. As previously evoked, the impact of emulsion properties on residual wettability has to be highlighted to improve and step on the process of product development. Further properties can also be investigated in link with skin wettability: particles adhesion, micro flora development, occlusive treatments... In addition, the study of the impact of the residual film physico-chemistry on its sensory properties can greatly help to better understand the skin feel after products application.

Indeed, the application of cosmetic products can modify skin aspect and tactile properties, as clearly shown by sensory tests carried out with human assessors. It is well established that many tactile attributes such as *stickiness*, *greasiness*, *shininess* or *softness* are influenced by topical product application. Consequently, understanding the mechanisms for sensory properties modifications induced by product application on the skin surface is a key issue.

A number of studies have been focusing on the impact of emollients or emulsions physico-chemical properties on their sensory perception: for instance, it has been established that spreading behavior of emollients is impacted by their surface tension [60,72,73]. However regarding residual properties after application, again very few studies have been published with regard to physico-chemistry. Parente et al [74] have established that spreadability and surface tension of emollients influence three residual film properties, namely *gloss*, *oiliness* and *residue*, but without giving any clear explanation. Here again, in the view of this poorly investigated field, further studies are needed to highlight and understand the link between skin physico-chemistry and sensory properties related to products application. This field of investigation represents a promising way to control the sensory perception of new products, which is very important for their acceptability by consumers.

To illustrate the interest in investigating the wettability of residual film to understand the sensory perception of topical products, we performed a study dealing with the residual stickiness after application (unpublished results). This property was evaluated on polypropylene sheets for ten different cosmetic products (gels, emulsions, aqueous solutions ...) as perceived by 21 assessors once applied onto the artificial surface. In parallel, we determined residual film wettability after application of those cosmetics products on the same polypropylene surface, by measuring water advancing contact angle. As illustrated on figure 5, the higher the water contact angle, the lower the stickiness sensation. One can reasonably hypothesize that the amount of water present in the product residual film strongly affects its wettability: the higher the water content the higher the surface wettability. Water present in the residual film formed onto the artificial surface can create capillary forces, as previously demonstrated [75]. In contact with assessor's fingers those capillary forces may consequently induce a stickiness sensation, explaining the association between stickiness sensory perception and residual film wettability. This study requires to be performed on *in vivo* surfaces in order to confirm this link between residual film wettability and stickiness perception.

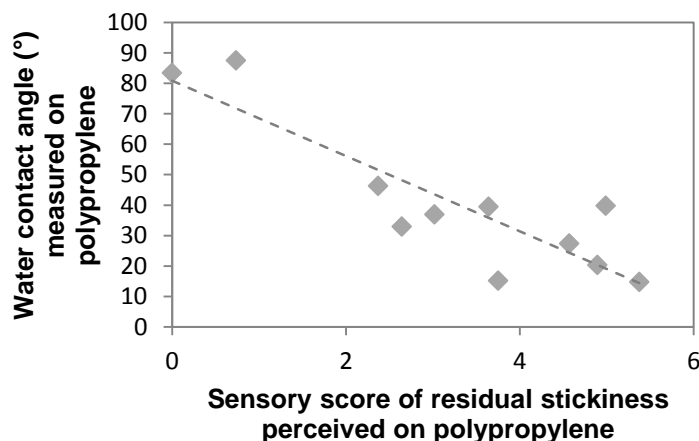


Fig 5: Relation between stickiness perception on residual film and the corresponding water contact angle

From a general point of view, even if skin surface physico-chemistry owns a great potential in a number of research areas (as illustrated in fig 6), studies focusing on this property are unfortunately not numerous. This may be at least partly explained by the huge complexity of this biological material, inducing important variability. In addition, *in vivo* studies involve heavy logistic (recruitment of volunteers, management of their availability, development of adapted measurements devices, high toxicity control of applied products ...) and can additionally be very time-consuming. Thus, the use of skin models rather than *in vivo* human skin may significantly make easier surface physico-chemical studies. The last part of this review focuses on those models, being either biological or non-biological, with highlighting their advantages and disadvantages.

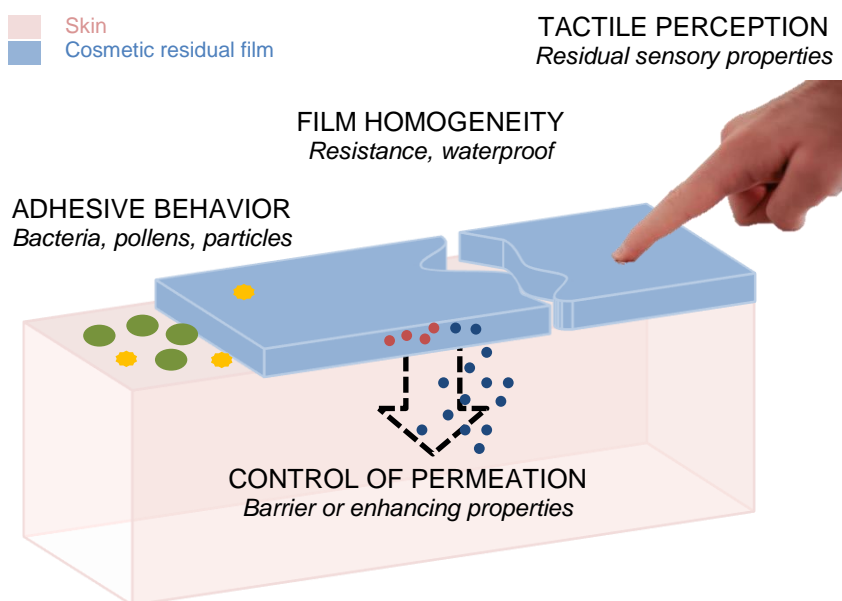


Fig 6: Potential interests of physico-chemistry in skin studies and for residual film characterization

4. Modeling of skin surface physico-chemistry: which interest for future developments?

4.1. Interest in modeling skin using non-biological surface

Different skin models can be envisaged for physico-chemical studies: biological models such as human skin explants (living or frozen) [42] and reconstructed skins [56], or inert materials such as glass or Teflon® [37,76].

From a general point of view, with the aim to perform reliable physico-chemical measurements, it is suitable to work with simple homogeneous surfaces for getting results good repeatability. Thus, biological models can be limiting because they generally remain as complex as *in vivo* human skin. In addition, they are not always easy to handle, they are quite expensive and they own short life duration, which can be restrictive for some studies. In addition, to study topical products properties, large surfaces are often needed for products applications, measurements and analyses. Thus, working with inert or non-biological surfaces can be of great interest because they own highly controlled and reproducible properties, are less expensive, are non-donor-dependent, and above all more easily affordable. Nevertheless, one of the biggest challenge when considering a reliable inert or non-biological surface is to ensure it behaves as real skin, with mimicking its physicochemical properties for either bare skin surface as well as after the application of any topical products. Consequently, in addition to the surface free energy properties, a list of criteria has to be considered for the selection of suitable skin models:

- Roughness similar from *in vivo* skin
- Chemical composition close to *in vivo* skin
- Mechanical properties close to *in vivo* skin
- Standardized surface
- Able to be hydrated or dehydrated
- Controlled permeability
- Controlled temperature

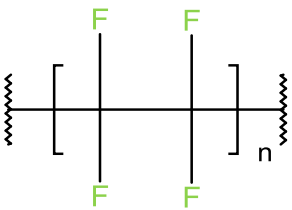
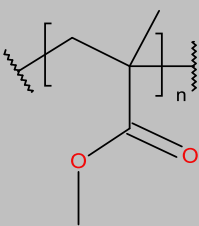
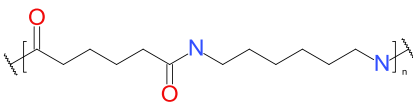
Based on both the literature and their market availability, a selection of the most prevailing models is presented below and their reliability is discussed.

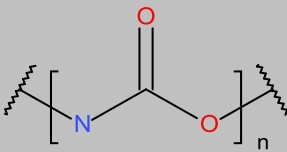
4.2 Existing models and uses

Several attempts have been made to set up a reliable model for skin surface properties, with a specific focus on skin physico-chemistry. Both the nature and the physico-chemical properties of the materials used for modeling skin surface are reported in table 4. Some of

these materials were characterized in our laboratory with the aim to determine their surface free energy (unpublished data).

Table 4: Skin models used for physico-chemical studies

Material and trade name (when available)	Surface chemical composition	Physico-chemical properties	Used in
Glass	Si-OH ; Si-O-Si	CST from 30 to 46 mJ/m ² depending on humidity level [77] CST = 27.5 ± 2.4 mJ/m ² [37]	[37,76]
Teflon® or PTFE		CST = 20.4 mJ/m ² $\gamma_{AB} = 0.4$ mJ/m ² [78]	[72,73,76]
PMMA		$\gamma_s^{LW} = 36.67$ mJ/m ² $\gamma_s^+ = 0.16$ mJ/m ² $\gamma_s^- = 10.01$ mJ/m ² $\gamma_s = 39.21$ mJ/m ² [79]	[60]
6.6-Nylon		$\gamma_s^{LW} = 36.48$ mJ/m ² $\gamma_s^+ = 0.25$ mJ/m ² $\gamma_s^- = 12.83$ mJ/m ² $\gamma_s = 40.26$ mJ/m ² [51]	[51]
Stainless Steel	Fe, C, Cr and other metals.	$\gamma_s^{LW} = 36.3$ mJ/m ² $\gamma_s^+ = 0.0$ mJ/m ² $\gamma_s^- = 20.5$ mJ/m ² $\gamma_s = 36.5$ mJ/m ² [57]	[57]
Polyurethane (Lorica Soft) coated with an artificial sebum	Lipid mixture containing triglycerides, wax esters, free fatty acid, cholesterol ester, free cholesterol and squalene	$\gamma_s^d = 22.3$ mJ/m ² $\gamma_s^p = 2.7$ mJ/m ² $\gamma_s = 25.0$ mJ/m ² [58]	[58]
Silicone membrane	Si-OH ; Si-O-Si	No information	[70]
Vitroskin® (IMS, Inc., Milford, CT)	No information	$\gamma_s^{LW} = 31.5$ mJ/m ² $\gamma_s^+ = 1.4$ mJ/m ² $\gamma_s^- = 5.1$ mJ/m ² $\gamma_s = 35.8$ mJ/m ² (unpublished data)	[72]
Bio Skin Plate #30 (Beaulax, Co. Ltd, Tokyo)	Polyurethane elastomers [80]	$\gamma_s^{LW} = 27.1$ mJ/m ² $\gamma_s^+ = 0.5$ mJ/m ² $\gamma_s^- = 1.0$ mJ/m ²	[81]

		$\gamma_s = 28.5 \text{ mJ/m}^2$ (unpublished data)	
Dragon skin (Smooth On, Inc., Easton, PA)	Si-OH ; Si-O-Si	$\gamma_s^{LW} = 15.1 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 1.8 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 3.2 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 19.7 \text{ mJ/m}^2$ (unpublished data)	[82]
Gelatin plasticized by glycerol, polysaccharides and a lipid mixture	C-OH ; COOH ; NH	$\theta_{\text{water}} = 94 \pm 8^\circ$ [82]	[82]
Gelatin with a lipid-like substance and an adjustable amount of water	C-OH ; COOH ; NH	CST = 33.4 mJ/m ² [83]	[83]

Based on the data available, one can observe that almost all materials used in literature own a surface free energy or a CST close to *in vivo* skin. Some models characteristics appear close to forearm skin properties (polyurethane coated with lipids, Vitroskin®, Bio Skin Plate #30 or Dragon Skin) whereas some are closer to forehead skin (PMMA, 6.6-Nylon, stainless steel, gelatin containing surfaces). However, only very little information is published dealing with the behavior of the materials once any product is applied. Indeed, as shown by El Khyat et al. [37], when applying an emulsion onto a glass surface, resulting water contact angles are significantly much lower if compared with the ones after *in vivo* application, thus illustrating an overestimation for the wettability change in the case of glass surface. As previously described, such differences can be explained by the different chemical interactions between emulsions and skin surface or glass surface. In addition to the surface properties effect, permeation through *in vivo* skin plays a key role on the evolution of the residual film after product application. Thus, any material owning no or weak permeation properties may not be a good model, even if its bare surface free energy is similar to *in vivo* skin. It therefore seems suitable to consider the porosity when choosing a material so the penetration properties of formulations are close to the ones of human skin. Among the other skin models available, the Dragon Skin made of silicon polymer and the gelatin based model developed by Lir et al. [84] have been studied by Bhushan and Tang [82] using contact angle measurements and AFM. They showed that both surfaces behave like their reference biological model (rat skin) after application of different creams, regarding their wettability, film thickness, friction coefficient... Difference between the two models lies on their mechanical

properties. To our knowledge, until now no study has been led concerning the behavior during application for the other skin models listed in Table 4.

Regarding their surface chemistry, all materials are not equivalent and relevant. As an illustration, both Stainless steel and PTFE own chemical compounds and functions very different from skin. This can induce difference in terms of interactions, as highlighted by Capra et al. [76]. In their work, they compared glass and Teflon® regarding their interactions with cosmetic emulsions and ingredients to evaluate the corresponding pertinence as skin model. They highlighted significant difference between the two inert surfaces, mainly due to different surface chemical composition. The hydroxyl groups present on glass surface induced interactions with hydrophilic molecules, while Teflon®, being purely hydrophobic, do not interact with in the same way than glass. According to their work, glass seemed closer to skin than Teflon®. However, we already mentioned earlier in this review that glass was not well-adapted. So, whether it is glass, PTFE or stainless steel, it seems that none of these materials are adapted to mimic skin surface physico-chemistry. Consequently, to obtain a reliable model material, its chemical composition should be similar to *in vivo* skin. This is the case for some of the models presented in table 4: 6.6-Nylon, Polyurethane coated with lipid mixture and, finally, the two gelatin based surfaces. Moreover, as highlighted previously, skin surface lipids and sebum play an essential role in its physico-chemistry. Thus, the use of a model containing a lipid mixture or lipid coated seems to be an interesting way for modeling skin surface.

Finally, a very important parameter for physico-chemical studies is the surface roughness as it impacts contact angle values, and may also impact the way an emulsion spread onto skin and, consequently, the homogeneity and thickness of residual film. Some of the previously reported models take into account this important parameter, namely: PMMA of control roughness, Polyurethane (Lorica Soft) coated with lipids, Vitroskin® and, finally, the two gelatin based models, mold from an *in vivo* skin print. As the Bio Skin Plate #30 is a pertinent model to mimic skin softness [85], its roughness could also be interesting. However, up to now, no depth study has ever been performed with the aim to compare the roughness of all the cited surfaces, by taking into account the whole shape of the micro relief instead of the simple and incomplete mean roughness parameter.

To summarize, among cited models, there is no complete characterization of their surface properties, especially their behavior in contact with topical products. Then, it is obvious that there exist no model specifically developed with the aim to fully mimic skin surface properties. All criteria being not completed together, thus the choice of one model surface should be adapted according to the objectives of a given study depending on its objectives.

4.3. Characterization of two commercial skin models

To improve knowledge about the different skin models described above, with a focus on the commercially available ones, the Vitroskin® and the Bio Skin Plate #30 models were studied in our laboratory. Those models have been selected as they are easy to handle, easily affordable and above all because they have already been used for cosmetic researches [72,86–89]. A better characterization of their surface properties is thus useful. The following part of this paper aims to discuss the relevance of those two models, regarding the criteria defined previously.

On the one hand, Vitroskin® was used as substrate to mimic skin surface free energy, its pH and its ionic strength; on the other hand, Bio Skin Plate #30 was used to mimic skin mechanical and optical properties. Bio Skin plate #30 was used as received, without any particular handling, whereas Vitroskin® requested hydration following a proper protocol described by its manufacturer prior to use. First, surface free energy was determined using the Van Oss approach and the liquid system (a) whose results for the different surface free energy parameters are reported in table 4. Values obtained for Vitroskin® appear quite close to *in vivo* measurements performed on forearm [32]. This undoubtedly confirms that Vitroskin® well mimics bare skin surface free energy if compared to Bio Skin for which the basic component is too low. Nevertheless, both tested commercial surfaces belong to the low energy materials which can be pertinent for skin physico-chemical studies.

Regarding their roughness properties (fig 7), Bio Skin owns an arithmetic mean roughness ($S_a = 13.5 \mu\text{m}$) lower in comparison with Vitroskin® ($S_a = 15.4 \mu\text{m}$) and above all compared to human skin (S_a between 17 and 20 μm [58]). In addition to that, the major difference between the two tested surfaces and the *in vivo* skin concerns the shape of their microrelief, characterized by the skewness factor S_{sk} (0.648 for Vitroskin®; -0.263 for Bio Skin and -0.771 for human forearm skin replica). Among other topographic parameters, the skewness factor appears of high interest as it accurately characterizes the surface topography: a positive value indicates a flat surface with peaks and protuberance as shown on fig 7(a) whereas a negative value reflects a surface with furrows and trays as human skin (fig 7(c)). The Bio Skin shows an intermediary shape with a low negative value for its skewness factor (fig 7(b)). Anyway, whatever the commercial model used, the topography is not really comparable to *in vivo* human skin meaning that no model really satisfies this roughness criterion. Thus, surface free energy values measured on those two surfaces will be influenced by those different topographies, making the comparison with *in vivo* skin more questionable. This point underlines important discordances between those models and skin surface.

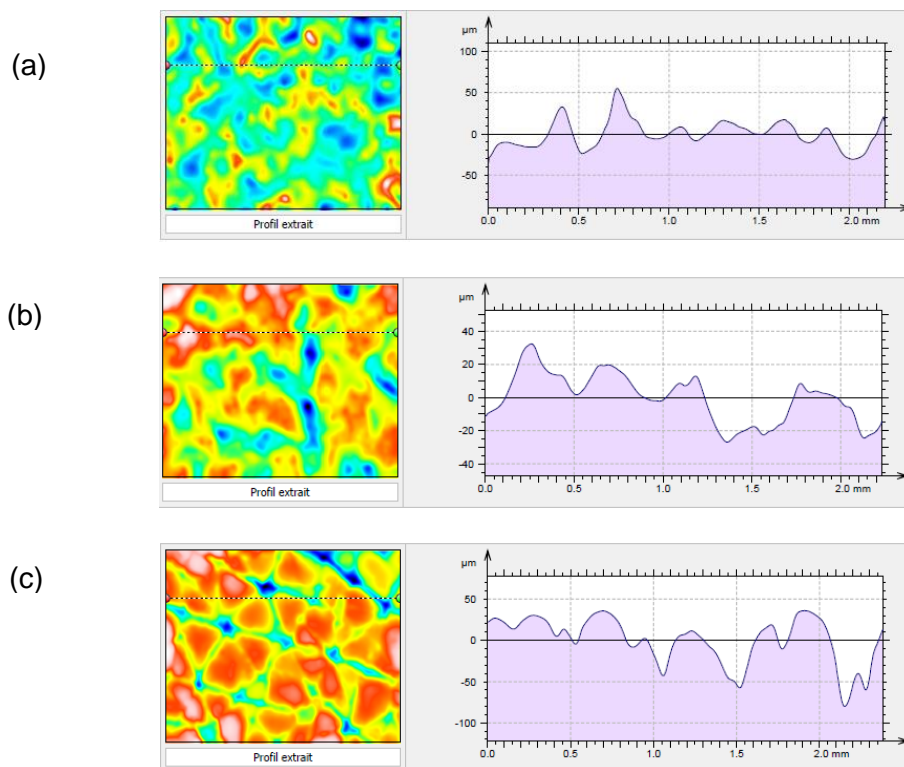


Fig 7: Topographical study of (a) Vitroskin® and (b) Bio Skin Plate #30 compared to (c) an *in vivo* skin replica (3D microscopy images analyzed with Mountains Map®)

Finally, despite their very different roughness, different physico-chemical measurements were performed to evaluate the interactions between those two models and topical ingredients and emulsions.

Firstly, surface wettability after a standardized application of 8 different emulsions was characterized. Fig 8 shows water advancing contact angle measured at 2 distinct times after the application of topical products (1 min and 3 min, respectively) measured on both surfaces and the tentative correlation with *in vivo* measurements on the forearm.

One can notice that 1 min after application of products, Vitroskin® behaves quite similarly to *in vivo* skin, as shown by the good correlation between both data ($R^2 = 0.917$): thus, residual film wettability on Vitroskin® well reproduces *in vivo* wettability when estimated in such conditions. Oppositely, for Bio Skin the correlation is low ($R^2 = 0.681$), showing that its interaction with products differ from *in vivo* skin.

Nonetheless, the situation is reversed 3 min after application as Bio Skin shows better results ($R^2 = 0.903$) than Vitroskin® ($R^2 = 0.767$) in comparison to *in vivo* data. This can be due to a difference regarding the penetration rate of emulsions through the surfaces resulting in different residual film properties. However, these results indicate that both surfaces give

rather good results and can be an interesting starting point to characterize residual films properties.

Then, an additional study performed on those two models was envisaged in order to evaluate contact angle of four different emollients (isohexadecane, cyclopentasiloxane, argan oil and propanediol dicaprylate) on those surfaces, in comparison with *in vivo* skin (fig 9). Such experiment is a way to compare the spreading behavior of liquids on those skin models with *in vivo* spreading.

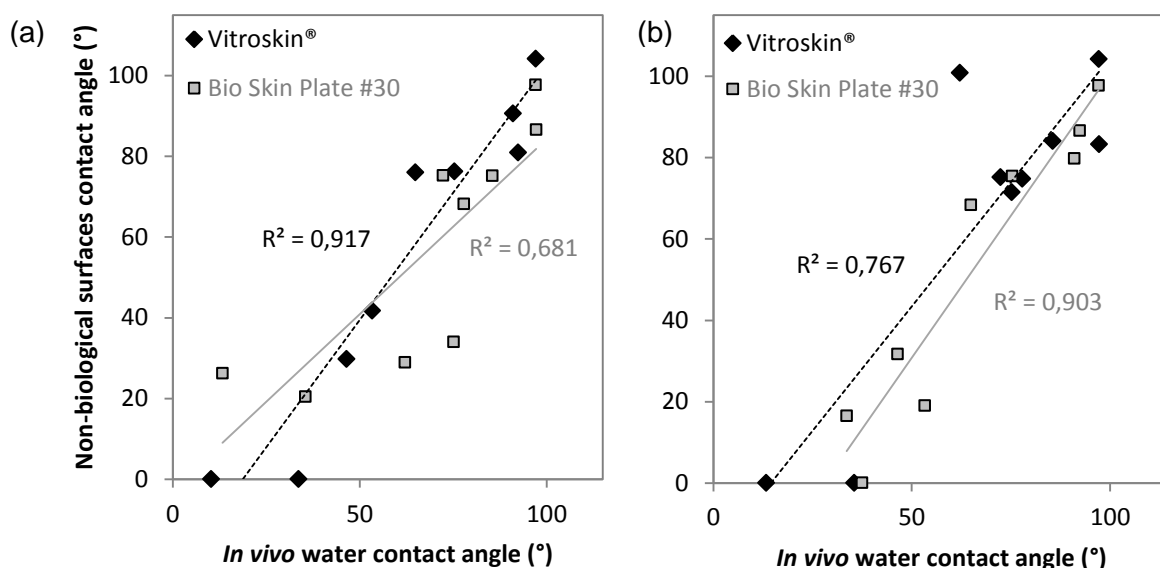


Fig 8: Water advancing contact angle measurements (a) 1 min and (b) 3 min after application of 8 different emulsions and on bare surface on Vitroskin® and Bio Skin Plate: Correlation with *in vivo* measurements.

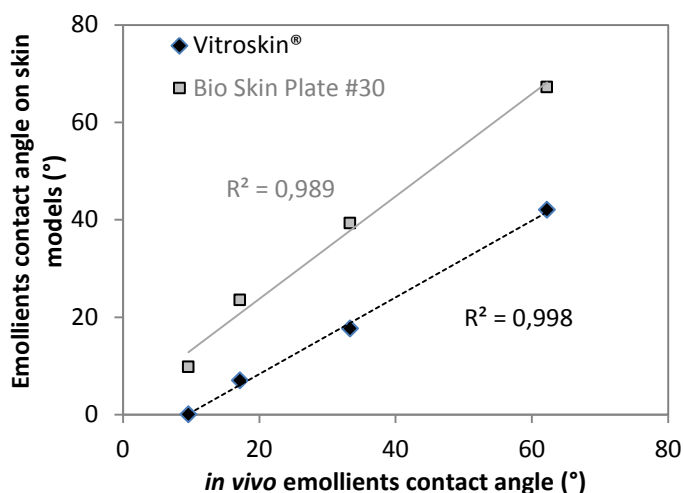


Fig 9: Emollients advancing contact angle with the two skin models and correlation with *in vivo* measurements.

According to those results, the correlations between *in vivo* measurements and Vitroskin® or Bio Skin are excellent ($R^2 = 0.998$ and $R^2 = 0.989$ respectively). However, the overall values obtained on Vitroskin® are lower if compared to *in vivo*: all emollients show an enhanced spreading behavior on Vitroskin® compared to *in vivo* ($\theta_{\max\text{-Vitroskin}^\circledast} = 42^\circ$ against 62° *in vivo*). In comparison, contact angle values measured on Bio Skin are closer to *in vivo* ones ($\theta_{\max\text{-Bioskin}} = 67^\circ$), thus each emollient interacts with Bio Skin in the same way than with *in vivo* skin. This second surface so appears more adapted than Vitroskin® for this study.

In conclusion concerning those two models, according to the results described above, both Vitroskin® and Bio Skin® can be envisaged for skin physico-chemical studies although no surface mimics all skin surface properties and no model meets all the criteria, especially concerning their roughness. In addition, despite their performing results, the chemistry of these models remains partly unclear and uncontrollable which can be limiting for a comprehensive study about the effects of lipid composition on skin wettability for instance.

4.4. Perspectives

Skin surface physicochemical characteristics is a highly crucial topic, in connection with many other skin properties such as skin adhesion, friction, permeation ... It characterizes the way skin interacts with both its environment and topical products. The full understanding of skin physico-chemistry is highly challenging as it may help innovation by developing optimized ingredients and products, owning specific spreading behavior, barrier properties or able to enhance skin permeation. However, comprehensive studies available in the literature remain rare and generally rather former. This is probably explained by the high difficulty to study a living and complex material, subject to large variability. In addition, *in vivo* studies are largely limited by both the inter and intra individual variability, and probably even more by the toxicity control, the cost and the time needed for such studies.

Thus, modeling skin surface is a real issue for pharmaceutical as well as cosmetic researches, from fundamental to industrial aspects. It would allow improving both the knowledge and the understanding of skin interactions with its environment, and would also help performing standardized measurements as well as solving the logistic and safety questions. However, using a non-biological material to mimic the human skin, a "living" material constantly renewing itself, is a genuine challenge.

Among available skin surface models, none is perfectly adapted. The development of a reliable, low cost and easily affordable skin model is therefore of great interest. To reach this purpose several characteristics have to be gathered. First, the surface needs to own topographic properties similar to *in vivo* skin, this key parameter being mainly neglected in

the models described before. Then, its chemical composition has to be close to *in vivo* skin, in order to mimic skin interactions. The use of a lipid mixture either inside the material or as coating may be an interesting approach for reaching these objectives. The composition of such a mixture may be adapted to reach a surface free energy mimicking skin one. As an illustration, Risovic et al. [90] recently demonstrated the possibility to reach the expected physico-chemical parameters thanks to a tuning of the lipid mixture composition. Finally, controlling the mechanical properties-and the material permeability is requested to lead to the development of a general non-biological skin model, usable for physico-chemical studies. Indeed, it has been demonstrated by Chen et al. [91] that the viscoelastic properties of soft materials can largely influence the measured contact angle values for materials with shear moduli $|G|$ between 0.2 and 510 kPa, which is the case for human skin [92]. It can consequently impact surface wettability, adhesive behavior but also its sensory properties. Thus, those viscoelastic properties have to be taken into account for estimating the pertinence of non-biological skin models.

At least, the surface temperature, even if it seems than its impact on skin physico-chemical measurements is not significant, could also be controlled to promote product spreading and evaporation in a similar way than *in vivo* skin.

Declarations of interest

None

Acknowledgments

The authors would like to gratefully thank Bio-EC laboratory (Longjumeau, France) for providing *ex vivo* skin samples.

This work has been led within the framework of the URBASKIN project, selected as Project of Excellence by the General Directorate for Competitiveness Industry and Services (DGCIS) in the 20th Appeal FUI (Fonds Unique Interministériel). It has been financed by BPI France and by Normandie, Val de Loire and Ile-de-France regions and supported by the Cosmetic Valley. The authors sincerely thank contributors and financers for their support.

References

- [1] Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine (Baltimore)* 2013;41:317–20. doi:10.1016/j.mpmed.2013.04.017.
- [2] van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* 2014;1841:295–313. doi:10.1016/j.bbalip.2013.11.006.
- [3] Denda M, Koyama J, Namba R, Horii I. Stratum corneum lipid morphology and transepidermal water loss in normal skin and surfactant-induced scaly skin. *Arch Dermatol Res* 1994;286:41–6. doi:10.1007/BF00375842.

- [4] Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, et al. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res* 1983;24:120–30.
- [5] Proksch E, Brandner JM, Jensen J-M. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17:1063–72. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
- [6] Elkhyat A, Fanian F, Abdou A, Amarouch H, Humbert P. Influence of the Sebum and the Hydrolipidic Layer in Skin Wettability and Friction. *Agaches Meas. Skin*, Springer, Cham; 2017, p. 191–202. doi:10.1007/978-3-319-32383-1_19.
- [7] Herrmann F, Prose PH, Sulzberger MB. Studies on the Ether-Soluble Substances on the Human Skin: III. The Effect of Sweat on the Quantity of Ether-Soluble Substances on the Skin*. *J Invest Dermatol* 1953;21:397–419. doi:10.1038/jid.1953.118.
- [8] Kligman AM. The Uses Of Sebum. *Br J Dermatol* 1963;75:307–19. doi:10.1111/j.1365-2133.1963.tb13567.x.
- [9] Eberhardt H. The regulation of sebum excretion in man. *Arch Dermatol Res* 1974;251:155–64. doi:10.1007/BF00560397.
- [10] Peter M, Elias MD. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *Elias* 1983;80.
- [11] Greene RS, Downing DT, Pochi PE, Strauss JS. Anatomical Variation in the Amount and Composition of Human Skin Surface Lipid. *J Invest Dermatol* 1970;54:240–7. doi:10.1111/1523-1747.ep12280318.
- [12] Martini M. Analyse biochimique des lipides épidermiques. *Pathol Biol* 2003;51:267–70. doi:10.1016/S0369-8114(03)00072-5.
- [13] Stefaniak AB, Harvey CJ, Wertz PW. Formulation and stability of a novel artificial sebum under conditions of storage and use. *Int J Cosmet Sci* 2010;32:347–55. doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00561.x.
- [14] Forslind B. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Derm Venereol* 1994;74:1–6.
- [15] Kloubek J. Development of methods for surface free energy determination using contact angles of liquids on solids. *Adv Colloid Interface Sci* 1992;38:99–142. doi:10.1016/0001-8686(92)80044-X.
- [16] Van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir* 1988;4:884–91. doi:10.1021/la00082a018.
- [17] Fowkes FM. Attractive Forces at Interfaces. *Ind Eng Chem* 1964;56:40–52.
- [18] Fowkes FM. Donor-Acceptor Interactions at Interfaces. *J Adhes* 1972;4:155–9. doi:10.1080/00218467208072219.
- [19] Fowkes FM. Determination of interfacial tensions, contact angles, and dispersion forces in surfaces by assuming additivity of intermolecular interactions in surfaces. *J Phys Chem* 1962;66:382–382. doi:10.1021/j100808a524.
- [20] Wu S. Calculation of interfacial tension in polymer systems. *J Polym Sci Part C Polym Symp* 1971;34:19–30. doi:10.1002/polc.5070340105.
- [21] Van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ. Monopolar surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 1987;28:35–64. doi:10.1016/0001-8686(87)80008-8.
- [22] Owens DK, Wendt RC. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Polym Sci* 1969;13:1741–7. doi:10.1002/app.1969.070130815.
- [23] Janczuk B, Chibowski E, Bruque JM, Kerkeb ML, Gonzalez Caballero F. On the consistency of surface free energy components as calculated from contact angles of different liquids : an application to the cholesterol surface. *J Colloid Interface Sci* 1993;159:421–8.
- [24] Hejda F, Solar P, Kousal J. Surface Free Energy determination by contact angle measurements - A comparison of various approaches., Praha: Matfyzpress; 2010.
- [25] Lam CNC, Wu R, Li D, Hair ML, Neumann AW. Study of the advancing and receding contact angles: liquid sorption as a cause of contact angle hysteresis. *Adv Colloid Interface Sci* 2002;96:169–91. doi:10.1016/S0001-8686(01)00080-X.
- [26] David R, Neumann AW. Contact Angle Patterns on Low-Energy Surfaces. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;206:46–56. doi:10.1016/j.cis.2013.03.005.
- [27] Yuan Y, Lee TR. Contact Angle and Wetting Properties. In: Bracco G, Holst B, editors. *Surf. Sci. Tech.*, vol. 51, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013, p. 3–34.
- [28] Wenzel RN. Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Ind Eng Chem* 1936;28:988–94. doi:10.1021/ie50320a024.

- [29] Rosales JI, Marshall GW, Marshall SJ, Watanabe LG, Toledano M, Cabrerizo MA, et al. Acid-etching and Hydration Influence on Dentin Roughness and Wettability. *J Dent Res* 1999;78:1554–9. doi:10.1177/00220345990780091001.
- [30] Oliver JP, Huh C, Mason SG. An experimental study of some effects of solid surface roughness on wetting. *Colloids Surf* 1980;1:79–104. doi:10.1016/0166-6622(80)80039-4.
- [31] Cazabat AM, Stuart MAC. Dynamics of wetting: effects of surface roughness. *J Phys Chem* 1986;90:5845–9. doi:10.1021/j100280a075.
- [32] Mavon A, Zahouani H, Redoules D, Agache P, Gall Y, Humbert P. Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: a study on two anatomical sites. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1997;8:147–55.
- [33] Burnham RS, McKinley RS, Vincent DD. Three Types of Skin-Surface Thermometers: A Comparison of Reliability, Validity, and Responsiveness. *Am J Phys Med Rehabil* 2006;85:553. doi:10.1097/01.phm.0000223232.32653.7f.
- [34] Zhao Q, Liu Y, Abel EW. Effect of temperature on the surface free energy of amorphous carbon films. *J Colloid Interface Sci* 2004;280:174–83. doi:10.1016/j.jcis.2004.07.004.
- [35] Villa F, Marengo M, Coninck JD. A new model to predict the influence of surface temperature on contact angle. *Sci Rep* 2018;8:6549. doi:10.1038/s41598-018-24828-8.
- [36] Zisman WA. Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution. In: Fowkes FM, editor. *Contact Angle Wettability Adhes.*, vol. 43, Washington D.C.: American Chemical Society; 1964, p. 1–51.
- [37] Elkhyat A, Mavon A, Leduc M, Agache P, Humbert P. Skin critical surface tension. *Skin Res Technol* 1996;2:91–6. doi:10.1111/j.1600-0846.1996.tb00066.x.
- [38] Elkhyat A, Agache P, Zahouani H, Humbert P. A new method to measure in vivo human skin hydrophobia. *Int J Cosmet Sci* 2001;23:347–52. doi:10.1046/j.0412-5463.2001.00108.x.
- [39] Mavon A, Redoules D, Humbert P, Agache P, Gall Y. Changes in sebum levels and skin surface free energy components following skin surface washing. *Colloids Surf B Biointerfaces* 1998;10:243–50. doi:10.1016/S0927-7765(98)00007-1.
- [40] Jacobi O. Neue Erkenntnisse über die hygroskopischen Eigenschaften und die Benetzbarkeit der Keratinsubstanz. *Kolloid-Z* 1949;114:88–103. doi:10.1007/BF01511408.
- [41] Schneider W, Schuleit H. Der Fettmantel der Haut und seine Bedeutung für die Benetzung. *Arch Für Dermatol Syph* 1951;193:434–59. doi:10.1007/BF00362042.
- [42] Ginn ME, Noyes CM, Jungermann E. The contact angle of water on viable human skin. *J Colloid Interface Sci* 1968;26:146–51. doi:10.1016/0021-9797(68)90306-8.
- [43] Schott H. Contact angles and wettability of human skin. *J Pharm Sci* 1971;60:1893–5. doi:10.1002/jps.2600601233.
- [44] Rosenberg A, Williams R, Cohen G. Interaction forces involved in wetting of human skin. *J Pharm Sci* 1973;62:920–2. doi:10.1002/jps.2600620612.
- [45] Dann JR. Forces involved in the adhesive process: I. Critical surface tensions of polymeric solids as determined with polar liquids. *J Colloid Interface Sci* 1970;32:302–20. doi:10.1016/0021-9797(70)90054-8.
- [46] El-shimi A, Goddard E. Wettability of some low energy surfaces. I. Air/liquid/solid interface. *J Colloid Interface Sci* 1974;48:242–8. doi:10.1016/0021-9797(74)90158-1.
- [47] Kenney JF, Haddock TH, Sun RL, Parreira HC. Medical-grade acrylic adhesives for skin contact. *J Appl Polym Sci* 1992;45:355–61. doi:10.1002/app.1992.070450218.
- [48] Wagner M, Mavon A, Haidara H, Vallat M-F, Duplan H, Roucoules V. From contact angle titration to chemical force microscopy: a new route to assess the pH-dependent character of the stratum corneum: From contact angle titration to chemical force microscopy. *Int J Cosmet Sci* 2012;34:55–63. doi:10.1111/j.1468-2494.2011.00681.x.
- [49] Kanicky JR, Shah DO. Effect of Degree, Type, and Position of Unsaturation on the pKa of Long-Chain Fatty Acids. *J Colloid Interface Sci* 2002;256:201–7. doi:10.1006/jcis.2001.8009.
- [50] Schrader ME, Loeb GI. Modern Approaches to Wettability n.d. (accessed January 5, 2016).
- [51] Krawczyk J. Surface free energy of the human skin and its critical surface tension of wetting in the skin/surfactant aqueous solution/air system. *Skin Res Technol* 2015;21:214–23. doi:10.1111/srt.12179.

- [52] Good RJ, Oss CJ van. The Modern Theory of Contact Angles and the Hydrogen Bond Components of Surface Energies. *Mod. Approaches Wettability*, Springer, Boston, MA; 1992, p. 1–27. doi:10.1007/978-1-4899-1176-6_1.
- [53] Bouwstra JA, Cheng K, Gooris GS, Weerheim A, Ponc M. The role of ceramides 1 and 2 in the stratum corneum lipid organisation. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab* 1996;1300:177–86. doi:10.1016/0005-2760(96)00006-9.
- [54] Zhai H, Maibach HI. Effects of Skin Occlusion on Percutaneous Absorption: An Overview. *Skin Pharmacol Physiol* 2001;14:1–10. doi:10.1159/000056328.
- [55] Elkhyat A, Courderot-Masuyer C, Mac-Mary S, Courau S, Gharbi T, Humbert P. Assessment of spray application of Saint GERVAIS® water effects on skin wettability by contact angle measurement comparison with bidistilled water. *Skin Res Technol* 2004;10:283–6. doi:10.1111/j.1600-0846.2004.00084.x.
- [56] Lerebour G, Cupferman S, Cohen C, Bellon-Fontaine MN. Comparison of surface free energy between reconstructed human epidermis and in situ human skin. *Skin Res Technol* 2000;6:245–9. doi:10.1034/j.1600-0846.2000.006004245.x.
- [57] Lerebour G, Cupferman S, Bellon-Fontaine MN. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* to the Episkin® reconstructed epidermis model and to an inert 304 stainless steel substrate. *J Appl Microbiol* n.d.;97:7–16. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02181.x.
- [58] Gerhardt L-C, Schiller A, Müller B, Spencer ND, Derler S. Fabrication, Characterisation and Tribological Investigation of Artificial Skin Surface Lipid Films. *Tribol Lett* 2009;34:81–93. doi:10.1007/s11249-009-9411-0.
- [59] Fageon L, Moyal D, Coutet J, Candau D. Importance of sunscreen products spreading protocol and substrate roughness for in vitro sun protection factor assessment. *Int J Cosmet Sci* 2009;31:405–18. doi:10.1111/j.1468-2494.2009.00524.x.
- [60] Savary G, Grisel M, Picard C. Impact of emollients on the spreading properties of cosmetic products: A combined sensory and instrumental characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;102:371–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.07.028.
- [61] Venkatraman S, Gale R. Skin adhesives and skin adhesion: 1. Transdermal drug delivery systems. *Biomaterials* 1998;19:1119–36. doi:10.1016/S0142-9612(98)00020-9.
- [62] van Oss CJ. Acid–base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 1993;78:1–49. doi:10.1016/0927-7757(93)80308-2.
- [63] Rosales-Leal JI, Osorio R, Holgado-Terriza JA, Cabrerizo-Vílchez MA, Toledano M. Dentin wetting by four adhesive systems. *Dent Mater* 2001;17:526–32. doi:10.1016/S0109-5641(01)00014-8.
- [64] Gusnaniar N, van der Mei HC, Qu W, Nuryastuti T, Hooymans JMM, Sjollem J, et al. Physico-chemistry of bacterial transmission versus adhesion. *Adv Colloid Interface Sci* 2017;250:15–24. doi:10.1016/j.cis.2017.11.002.
- [65] Hamadi F, Latrache H, Zekraoui M, Ellouali M, Bengourram J. Effect of pH on surface energy of glass and Teflon and theoretical prediction of *Staphylococcus aureus* adhesion. *Mater Sci Eng C* 2009;29:1302–5. doi:10.1016/j.msec.2008.10.023.
- [66] Liu Y, Yang S-F, Li Y, Xu H, Qin L, Tay J-H. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol* 2004;110:251–6. doi:10.1016/j.jbiotec.2004.02.012.
- [67] Dijk J van, Herkströter F, Busscher H, Weerkamp A, Jansen H, Arends J. Surface-free energy and bacterial adhesion. *J Clin Periodontol* n.d.;14:300–4. doi:10.1111/j.1600-051X.1987.tb01537.x.
- [68] Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev* 2011;9:244–53.
- [69] Ginn ME, Dunn SC, Jungermann E. Contact angle studies on viable human skin. II. Effect of surfactant ionic type in pretreatment. *J Am Oil Chem Soc* 1970;47:83–5.
- [70] Millerioux J, Cruz C, Bazire A, Polly V, Lallement G, Lefeuvre L, et al. Evaluation of in vitro tests to assess the efficacy of formulations as topical skin protectants against organophosphorus compounds. *Toxicol In Vitro* 2009;23:127–33. doi:10.1016/j.tiv.2008.09.014.
- [71] Hagens R, Mann T, Schreiner V, Barlag HG, Wenck H, Wittern K-P, et al. Contact angle measurement - a reliable supportive method for screening water-resistance of ultraviolet-protecting products in vivo. *Int J Cosmet Sci* 2007;29:283–91. doi:10.1111/j.1467-2494.2007.00380.x.
- [72] Douguet M, Picard C, Savary G, Merlaud F, Loubat-bouleuc N, Grisel M. Spreading properties of cosmetic emollients: Use of synthetic skin surface to elucidate structural effect. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017;154:307–14. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.028.

- [73] Chao C, Génot C, Rodriguez C, Magniez H, Lacourt S, Fievez A, et al. Emollients for cosmetic formulations: Towards relationships between physico-chemical properties and sensory perceptions. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 2018;536:156–64. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.07.025.
- [74] Parente ME, Gambaro A, Solana G. Study of sensory properties of emollients used in cosmetics and their correlation with physicochemical properties. *J Cosmet Sci* 2005;56:175–82.
- [75] Pailler-Mattei C, Nicoli S, Pirot F, Vargiolu R, Zahouani H. A new approach to describe the skin surface physical properties in vivo. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;68:200–6. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.10.005.
- [76] Capra P, Musitelli G, Perugini P. Wetting and adhesion evaluation of cosmetic ingredients and products: correlation of in vitro–in vivo contact angle measurements. *Int J Cosmet Sci* 2017;39:393–401. doi:10.1111/ics.12388.
- [77] Jupille J. Les surfaces du verre : structure et physico-chimie. *Comptes Rendus Académie Sci - Ser IV - Phys-Astrophys* 2001;2:303–20. doi:10.1016/S1296-2147(01)01170-2.
- [78] Jie- Rong C, Wakida T. Studies on the surface free energy and surface structure of PTFE film treated with low temperature plasma. *J Appl Polym Sci* n.d.;63:1733–9. doi:10.1002/(SICI)1097-4628(19970328)63:13<1733::AID-APP4>3.0.CO;2-H.
- [79] Janczuk B, Bialopiotrowicz T, Zdziennicka A. Some Remarks on the Components of the Liquid Surface Free Energy. *J Colloid Interface Sci* 1999;211:96–103. doi:https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5990.
- [80] Giron F, Ghiglione F, Flament F. Device for evaluating a product on application, 2016.
- [81] Sato N, Murata A, Fujie T, Takeoka S. Stretchable, adhesive and ultra-conformable elastomer thin films. *Soft Matter* 2016;12:9202–9. doi:10.1039/C6SM01242F.
- [82] Bhushan B, Tang W. Surface, tribological, and mechanical characterization of synthetic skins for tribological applications in cosmetic science. *J Appl Polym Sci* 2011;120:2881–90. doi:10.1002/app.33340.
- [83] Charkoudian JC. A model skin surface for testing adhesion to skin. *J Soc Cosmet Chem* 1988;39:225–34.
- [84] Lir I, Haber M, Dodiuk-Kenig H. Skin surface model material as a substrate for adhesion-to-skin testing. *J Adhes Sci Technol* 2007;21:1497–512. doi:10.1163/156856107782844783.
- [85] Nakatani M, Fukuda T, Sasamoto H, Arakawa N, Otaka H, Kawasoe T, et al. Relationship between perceived softness of bilayered skin models and their mechanical properties measured with a dual-sensor probe. *Int J Cosmet Sci* 2013;35:84–8. doi:10.1111/ics.12008.
- [86] Chen S, Bhushan B. Nanomechanical and nanotribological characterization of two synthetic skins with and without skin cream treatment using atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci* 2013;398:247–54. doi:10.1016/j.jcis.2013.02.026.
- [87] Hanson KM, Gratton E, Bardeen CJ. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1205–12. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.011.
- [88] Ikeda N, Miyashita K, Hikima R, Tominaga S. Reflection measurement and visual evaluation of the luminosity of skin coated with powder foundation. *Color Res Appl* 2014;39:45–55. doi:10.1002/col.21753.
- [89] Jachowicz J, McMullen R, Prettypaul D. Indentometric analysis of in vivo skin and comparison with artificial skin models. *Skin Res Technol* 2007;13:299–309. doi:10.1111/j.1600-0846.2007.00229.x.
- [90] Risović D, Penezić A, Čadež V, Šegota S, Gašparović B. Surface free energy tuning of supported mixed lipid layers. *RSC Adv* 2016;6:52475–84. doi:10.1039/C6RA04926E.
- [91] Chen L, Auernhammer GK, Bonaccorso E. Short time wetting dynamics on soft surfaces. *Soft Matter* 2011;7:9084. doi:10.1039/c1sm05967j.
- [92] Pailler-Mattei C, Bec S, Zahouani H. In vivo measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. *Med Eng Phys* 2008;30:599–606. doi:10.1016/j.medengphy.2007.06.011.

Annexe 1

Table A: Skin surface physico-chemistry.

Skin area	Parameter and approach	Skin pretreatment	Results	Authors
Index Finger	θ_{water}	Untreated	$58 \pm 2^\circ$	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	Washed with soap, rinsed with water and dried	$104 \pm 3^\circ$	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	30 min after hand cream application	0°	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	30 min after hand cream application then washed with soap, rinsed with water and dried	$56 \pm 4^\circ$	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	Soaked in dishwashing detergent solution, rinsed with water, air dried	$67 \pm 2^\circ$	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	Washed with soap and water, dipped in deionized water and air dried	$125 \pm 3^\circ$	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	Washed with soap and water, dipped in 95% ethanol and air dried	$121 \pm 4^\circ$	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	Washed with soap and water, dipped in acetone and air dried	$134 \pm 4^\circ$	Ginn et al. [42]
Index Finger	θ_{water}	Washed with soap and water, dipped in n-hexane and air dried	$139 \pm 5^\circ$	Ginn et al. [42]
Finger	θ_{water}	Untreated	$60 < \theta_{\text{water}} < 91^\circ$ Mean value 74°	Schott [43]
Finger	θ_{water}	Immersed 2 min in acetone, wiped with towels and air dried	$48 < \theta_{\text{water}} < 90^\circ$ Mean value 64°	Schott [43]
Index fingernail	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	$82 \pm 10^\circ$	Ginn et al. [42]
Back of index finger	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	$120 \pm 9^\circ$	Ginn et al. [42]
Side of index finger	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	$124 \pm 3^\circ$	Ginn et al. [42]
Palm side of index finger	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	$117 \pm 4^\circ$	Ginn et al. [42]
Back of middle finger	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	$119 \pm 9^\circ$	Ginn et al. [42]

Partie 1 – Synthèse bibliographique

Palm of hand	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	$120 \pm 4^\circ$	Ginn et al. [42]
Back of hand	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	$117 \pm 9^\circ$	Ginn et al. [42]
Wrist underside	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	114 ± 4	Ginn et al. [42]
Forearm underside	θ_{water}	Prewashed with soap, ethanol and deionized water	119 ± 3	Ginn et al. [42]
Index Finger	CST (polar liquids)	Untreated	26.8 mJ/m^2	Ginn et al. [42]
Finger	CST (polar liquids)	Untreated	24.7 mJ/m^2	Schott [43]
Finger	CST (polar liquids)	Acetone extracted	22.2 mJ/m^2	Schott [43]
Forearm	CST (polar liquids)	Untreated	29.4 mJ/m^2	Schott [43]
Forearm	CST (polar liquids)	Acetone extracted	30.6 mJ/m^2	Schott [43]
Excised skin (breast area)	CST (polar liquids)	Untreated	27.5 mJ/m^2	Rosenberg [44]
Excised skin (breast area)	CST (hypothetic nonpolar liquids)	Untreated	37.0 mJ/m^2	Rosenberg [44]
Index finger	θ_{water}	Washed with soap, rinsed under tap water, dried with towels and let 15 min air drying	75°	El Shimi [46]
Index finger	SFE (Wu approach, use of water and methylene iodine)	Washed with soap, rinsed under tap water, dried with towels and let 15 min air drying	$\gamma_s^d = 23.1 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^p = 15.1 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 38.2 \text{ mJ/m}^2$	El Shimi [46]
Finger	CST (polar liquids)	Washed with soap, rinsed under tap water, dried with towels and let 15 min air drying	27 mJ/m^2	El Shimi [46]
?	SFE (Wu approach, use of water and methylene iodine)	Untreated, at 23°C	$\gamma_s^d = 33 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^p = 5 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 38 \text{ mJ/m}^2$	Kenney et al. [47]
?	Polarity	Untreated, at 23°C	13%	Kenney et al. [47]
Volar forearm	CST (nonpolar liquids)	Untreated	$27.5 \pm 2.4 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [37]
Forehead	CST (nonpolar liquids)	Untreated	Higher than 50.7 mJ/m^2	Elkhyat et al. [37]
Volar forearm	CST (nonpolar)	Ether treatment	$21.6 \pm 2.5 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al.

	liquids)			[37]
Volar forearm	CST (nonpolar liquids)	Washed with soap, rinsed with water and dried	$23.7 \pm 1.0 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [37]
Volar forearm	CST (nonpolar liquids)	Occluding with a sheet of polyethylene during 1 hour	$21.6 \pm 3.4 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [37]
Forehead	CST (nonpolar liquids)	Ether treatment	$29.3 \pm 1.7 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [37]
Volar forearm	SFE (Van oss approach using liquid system (a))	Untreated	$\gamma_s^{LW} = 35.6 \pm 5.8 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 0.8 \pm 0.7 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 4.2 \pm 3.0 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 38.7 \pm 6.4 \text{ mJ/m}^2$	Mavon et al. [32]
Forehead	SFE (Van oss approach using liquid system (a))	Untreated	$\gamma_s^{LW} = 35.0 \pm 3.1 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 0.5 \pm 0.2 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 28.3 \pm 11.5 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 42.5 \pm 3.9 \text{ mJ/m}^2$	Mavon et al. [32]
Volar forearm	SFE (Van oss approach using liquid system (a))	Ether treatment	$\gamma_s^{LW} = 30.6 \pm 4.6 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 0.4 \pm 0.4 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 1.2 \pm 1.2 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 32.4 \pm 4.8 \text{ mJ/m}^2$	Mavon et al. [32]
Forehead	SFE (Van oss approach using liquid system (a))	Ether treatment	$\gamma_s^{LW} = 32.0 \pm 3.4 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 0.3 \pm 0.3 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 5.9 \pm 2.6 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 34.5 \pm 4.1 \text{ mJ/m}^2$	Mavon et al. [32]
Forearm	Hydrophobia (polar liquids)	Untreated	61.9 %	Elkhyat et al. [38]
Forearm	Hydrophobia (polar liquids)	Ether treatment	70.3 %	Elkhyat et al. [38]
Forearm	Hydrophobia (polar liquids)	Occlusion	66.8 %	Elkhyat et al. [38]
Forearm	Hydrophobia (polar liquids)	Washing	56.9 %	Elkhyat et al. [38]
Forearm	SFE (Owens approach using water and diiodomethane)	Untreated	$\gamma_s^d = 27.6 \pm 4.1 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^p = 10.6 \pm 1.1 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 38.5 \pm 3.5 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [38]
Forearm	SFE (Owens approach using water and diiodomethane)	Ether treatment	$\gamma_s^d = 21.1 \pm 2.7 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^p = 17.3 \pm 1.5 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 38.3 \pm 4.2 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [38]
Forearm	SFE (Owens approach using water and diiodomethane)	Occlusion	$\gamma_s^d = 25.1 \pm 0.5 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^p = 6.6 \pm 4.5 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 31.7 \pm 5.3 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [38]
Forearm	SFE (Owens approach using water and diiodomethane)	Washing	$\gamma_s^d = 20.3 \pm 3.7 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^p = 8.8 \pm 3.4 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 29.1 \pm 7.0 \text{ mJ/m}^2$	Elkhyat et al. [38]
Forearm	Polarity	Untreated	27.5 %	Elkhyat et al. [38]

Partie 1 – Synthèse bibliographique

Forearm	Polarity	Ether treatment	45.2 %	Elkhyat et al. [38]
Forearm	Polarity	Occlusion	20.8 %	Elkhyat et al. [38]
Forearm	Polarity	Washing	30.2 %	Elkhyat et al. [38]
Forehead normo-seborrheic	SFE (Van oss approach using liquid system (a)) and SEB	Skin unwashed during 8h	$\gamma_s^{LW} = 37.5 \pm 1.1 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 1.0 \pm 0.5 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 21.0 \pm 4.3 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 46.3 \pm 1.1 \text{ mJ/m}^2$ SEB = 0.23	Mavon et al. [39]
Forehead hyper-seborrheic	SFE (Van oss approach using liquid system (a)) and SEB	Skin unwashed during 8h	$\gamma_s^{LW} = 36.6 \pm 2.4 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 0.8 \pm 0.4 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 20.6 \pm 3.3 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 44.4 \pm 2.3 \text{ mJ/m}^2$ SEB = 0.22	Mavon et al. [39]
Forehead oligo-seborrheic	SFE (Van oss approach using liquid system (a)) and SEB	Skin unwashed during 8h	$\gamma_s^{LW} = 38.6 \pm 0.7 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^+ = 0.3 \pm 0.4 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s^- = 11.6 \pm 2.4 \text{ mJ/m}^2$ $\gamma_s = 41.8 \pm 2.4 \text{ mJ/m}^2$ SEB = 0.07	Mavon et al. [39]

Chapitre 3 – Conclusion générale et définition des objectifs de la thèse

I. Importance de l'approche physico-chimique dans la compréhension de l'impact des polluants atmosphériques sur la peau

Comme décrit dans le chapitre précédent, la physico-chimie de surface de la peau joue un rôle très important pour comprendre les interactions qu'elle peut développer avec des éléments externes, les polluants atmosphériques comme les produits appliqués de façon topique.

La physico-chimie intrinsèque de la peau *in vivo* est fortement reliée à sa composition lipidique. Ainsi, dans l'objectif d'évaluer l'impact des polluants sur les constituants de surface de la peau, en particulier ses lipides, cette approche physico-chimique paraît essentielle. Elle apportera, d'une part, des informations complémentaires sur la modification des lipides par rapport à une analyse chimique seule, grâce à des mesures de surface simples et rapides à mettre en œuvre. D'autre part, une étude physico-chimique de l'effet des polluants permettra de mettre en évidence des conséquences pour la peau jusqu'alors inexplorées : comment les polluants modifient-ils la mouillabilité de la peau ? Comment peuvent-ils modifier ses interactions ? Comment formuler des produits pour rétablir cet état de surface modifié par les polluants ?

Ensuite, le calcul de l'énergie de surface de la peau permet de déterminer avec quels composés la peau est susceptible d'interagir. Par exemple, les HAP hautement toxiques sont des composés très lipophiles, fortement apolaires, qui peuvent pénétrer aisément dans le SC (Krutmann et al. 2014). Ceci peut se justifier par la composition chimique du SC, riche en lipides, mais aussi par sa physico-chimie : sa composante d'énergie libre caractérisant les interactions « apolaires » de types Van der Waals est importante, ce qui signifie que la peau interagit fortement avec ce type de composés. A l'inverse, de par sa composante basique importante, la surface de la peau interagira peu avec des composés riches en électrons. Cette notion de physico-chimie est donc indispensable pour comprendre comment protéger la peau des polluants atmosphériques, pour en limiter les interactions, voir limiter leur adhésion. Ainsi, l'étude de la mouillabilité de la peau avant et après application de produits cosmétiques permettra de comprendre quels produits auront tendance à augmenter ou à diminuer l'intensité de ses interactions.

Ces nouvelles pistes d'investigation seront développées dans la suite de cette thèse. Néanmoins, comme soulevé dans le chapitre précédent, les mesures *in vivo* sont très

délicates à réaliser. De plus, la physico-chimie de surface étant influencée par de nombreux facteurs (lipides, hydratation, prétraitement), une première étape de caractérisation et de mise au point de protocoles précis pour obtenir des résultats répétables devra être mise en œuvre pour étudier à la fois l'effet des polluants mais aussi l'effet des produits cosmétiques sur la physico-chimie de surface de la peau.

II. Problématique du choix du modèle d'étude

Le chapitre 2 soulève également la problématique du choix du modèle de peau. Dans le cas présent, l'étude *in vivo* de l'effet d'un cocktail de polluants n'est pas réalisable en raison de leur grande toxicité. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser un substitut de peau ou un matériau capable de mimer la surface de la peau.

D'après la synthèse bibliographique concernant l'étude de l'effet des polluants sur la peau, il apparaît que les modèles de peau utilisés ne reflètent pas suffisamment la complexité de la structure de la peau *in vivo*, en particulier son SC et sa fonction barrière. L'utilisation d'un modèle animal étant interdite par la loi européenne depuis 2013 dans le cadre de la recherche cosmétique, il a été nécessaire d'envisager d'autres alternatives. Les peaux reconstruites et les explants de peau humaine semblent être les modèles les plus proches de la peau *in vivo* et les plus complets. En effet, ces modèles possèdent une organisation en trois dimensions et une structure multicouche très proche de la peau, même identique dans le cas des explants (Mathes, Ruffner, and Graf-Hausner 2014). Concernant leur composition cellulaire, les peaux reconstruites possèdent l'avantage d'être multicellulaires, contrairement à des modèles de cultures unicellulaires. Cependant, seuls les explants de peau présentent l'intégralité des constituants de la peau *in vivo*, pouvant ainsi parfaitement reproduire des phénomènes physiologiques (Cho et al. 2013). De plus, les explants, une fois préparés, peuvent être utilisés directement alors que les peaux reconstruites nécessitent un temps de culture beaucoup plus long et délicat à mettre en place (Cho et al. 2013).

Les explants de peau humaine sont le cœur de métier du laboratoire BIO-EC, porteur du projet Urbaskin. L'utilisation de ce modèle de peau se révèle parfaitement adaptée pour la présente étude. Il sera nécessaire, dans un premier temps, de valider ce modèle *ex vivo* d'un point de vue surfacique, afin de vérifier que les traitements subis lors de leur préparation ne modifient pas de manière significative leurs propriétés physico-chimiques et chimiques. Après validation de leurs propriétés et des protocoles de mesures, ceux-ci seront utilisés pour la caractérisation de l'effet des polluants.

Cependant, ce modèle *ex vivo*, qui reste un modèle coûteux, peut présenter une grande variabilité car les échantillons de peau étudiés proviennent de différents donneurs, pouvant avoir un âge différent, un historique cutané différent (exposition aux UVs, utilisation de produits cosmétiques ...). Ainsi, les comparaisons inter-donneurs des résultats obtenus ne sont que rarement pertinentes. Les comparaisons échantillon témoin / échantillon traité par les polluants devront être réalisées sur un même donneur, ce qui nécessitera de grandes surfaces de peau disponibles et limitera donc le nombre d'études réalisables. Ensuite, ce modèle est contraint dans le temps puisqu'il peut être maintenu en survie au maximum 10-12 jours. En tenant compte du transport entre le laboratoire BIO-EC à Paris et le laboratoire URCOM au Havre, la contrainte de temps augmente à cause de potentielles contaminations et détériorations de leur morphologie au cours du transport, hors de leurs conditions optimales de maintien en survie.

Dans un objectif de compréhension des phénomènes surfaciques, de screening et de développement méthodologique, il est apparu alors indispensable d'utiliser un autre modèle de peau, spécifique des propriétés de surface, peu coûteux, avec une grande surface d'analyse disponible et pouvant être stable dans le temps. De plus, outre un ensemble de méthodes de caractérisation instrumentales de l'effet des polluants, ce projet propose également une approche sensorielle. Les explants de peau humaine ne pouvant être utilisés lors de séances d'analyse sensorielle, le choix d'un autre modèle d'étude s'avère nécessaire.

Pour répondre à cet ensemble de contraintes, notre choix s'est tourné vers l'utilisation de modèles non-biologiques, présentant des propriétés standardisées et répétables, étant facilement disponibles et stables dans le temps. Le chapitre 2 présente différents modèles déjà utilisés dans la littérature pour mimer la physico-chimie de surface de la peau. Néanmoins, aucun des modèles décrits n'est totalement satisfaisant. Un nouveau modèle non-biologique a donc été mis au point, caractérisé et validé afin de s'adapter aux objectifs de cette étude. Le principe de ce modèle sera présenté dans la partie 2 de ce manuscrit.

III. Définition des objectifs de la thèse

Pour rappel, la problématique proposée par le projet Urbaskin est la suivante : quels sont les effets des polluants atmosphériques sur la peau humaine et comment la protéger de ces effets néfastes à l'aide de produits cosmétiques ?

Si certains effets ont déjà été mis en évidence grâce à des études épidémiologiques, la compréhension des mécanismes impliqués et leurs conséquences sont encore peu étudiées. Malgré cela, l'industrie cosmétique commercialise de plus en plus de produits avec des

revendications anti-pollution. Il apparaît donc nécessaire de définir dans un premier temps les paramètres cutanés modifiés par les polluants et de comprendre comment les polluants peuvent dégrader la surface de la peau humaine.

Pour cela, l'étude des propriétés de surface de la peau paraît être une approche judicieuse, qui n'a jusqu'alors été que peu abordée. Très peu d'études se sont en effet intéressées à l'évolution des propriétés de surface de la peau après exposition aux polluants atmosphériques, alors que le SC et sa surface en sont les premières cibles.

Cette approche sera également indispensable pour étudier les produits topiques protecteurs, destinés à être appliqués sur la surface du SC, et leurs interactions avec le SC, ses lipides et son film hydrolipidique (Dreher et al. 1997; Ge et al. 2014). Ceci permettra de comprendre comment protéger la peau des effets néfastes de la pollution urbaine, afin de développer des actifs et des produits cosmétiques adaptés.

Suivant cette approche surfacique, nous nous concentrerons sur la compréhension des effets barrières et/ou anti-adhésion de particules de produits cosmétiques. Cette propriété est très importante pour un produit anti-pollution puisque, en réduisant l'adhésion des particules polluantes, ceux-ci seront à même de limiter le contact entre la peau et ces composés nocifs. Pour appréhender les phénomènes mis en jeu dans cet effet protecteur, une caractérisation complète du produit appliqué sur la peau sera nécessaire, grâce à des méthodes instrumentales, mais également sensorielles (Figure 10).

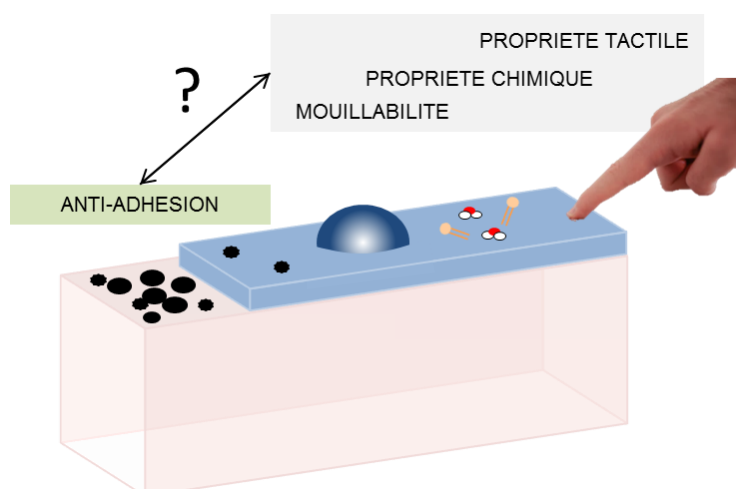


Figure 10. Le film résiduel cosmétique : peut-on expliquer le phénomène anti-adhésion de particules à partir de ses propriétés ?

Ainsi, les objectifs de cette thèse sont multiples :

- La première étape de ces travaux aura pour objectif de développer une méthodologie d'étude des propriétés de surface de la peau, notamment grâce au développement

d'un matériau capable de mimer la surface de la peau humaine, comme évoqué précédemment. Les modèles sélectionnés ou développés devront être caractérisés et validés en comparaison à la peau *in vivo*.

- La seconde étape consistera à évaluer et comprendre l'impact des polluants sur la surface de la peau et sa fonction barrière, *ex vivo* et sur modèles non-biologiques, à travers l'utilisation de modèles de polluants.
- La troisième partie consistera à comprendre comment il est possible de protéger la peau des effets néfastes des polluants. Pour cela, nous chercherons à définir pourquoi certains produits possèdent des propriétés anti-adhésion de particules. Cette étude nécessitera une caractérisation approfondie du film résiduel formé après application de produits sur la peau.

Afin de répondre aux objectifs du projet Urbaskin, les observations surfaciques réalisées seront reliées avec des aspects histologiques, génomiques et microscopiques mis en évidence par les différents partenaires du projet. L'organisation générale du projet ainsi que le rôle des partenaires sont résumés sur le schéma ci-dessous (Figure 11).

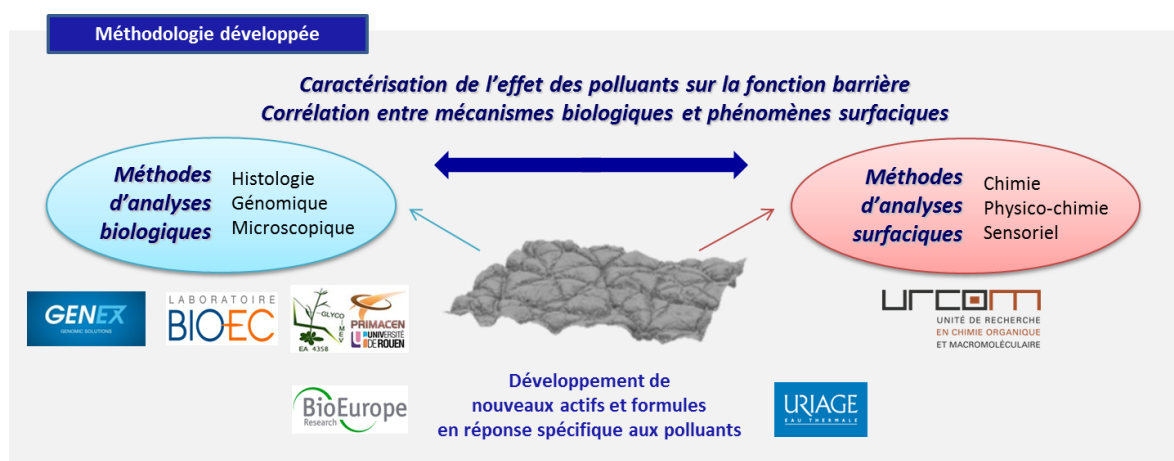


Figure 11. Méthodologie développée pour répondre aux objectifs du projet Urbaskin.

PARTIE 2 – Matériels et méthodes

Introduction

Cette seconde partie du manuscrit de thèse sera consacrée à la description des matériels et méthodes mis en place pour répondre aux problématiques définies précédemment. Comme discuté à l'issue de la synthèse bibliographique, le choix du modèle d'étude a été une étape cruciale. Différents modèles d'études ont donc été sélectionnés ou mis au point puis caractérisés pour pouvoir étudier de façon pertinente à la fois les interactions peau / polluants atmosphériques et peau / produits topiques. Dans un premier temps ces modèles seront décrits, puis les différentes techniques de caractérisation surfaciques (instrumentales et sensorielles) seront présentées.

Afin d'étudier l'impact de polluants sur la peau dans des conditions similaires aux conditions réelles d'exposition, il a également été nécessaire de modéliser ces polluants et de définir des protocoles d'exposition adaptés aux différents modèles d'études. Plusieurs systèmes d'exposition à la pollution ont donc été utilisés pour ces travaux. Le modèle spécifiquement développé pour l'étude *ex vivo* sera présenté, suivi par le protocole d'exposition de modèles non-biologiques.

Enfin, pour comprendre comment un produit topique peut protéger la peau de la pollution notamment en diminuant le contact entre les particules polluantes et le *stratum corneum*, un protocole d'évaluation de l'efficacité anti-adhésion de particules modèles sera présenté.

Afin de valider la pertinence et la significativité de l'ensemble des résultats obtenus, plusieurs outils statistiques ont été utilisés et seront détaillés à la fin de cette partie.

Chapitre 1 – Modèles d'études

Dans ce chapitre, les différents modèles d'études seront présentés. Ces modèles, biologiques et non-biologiques, ont servi de support pour l'ensemble des caractérisations surfaciques réalisées durant ces travaux, que ce soit pour évaluer l'impact des polluants sur la surface de la peau ou pour caractériser le film résiduel de produits cosmétiques.

I. Le modèle d'explants de peau humaine

Les explants de peau humaine utilisés ont été fournis par le Laboratoire BIO-EC (Longjumeau, France), partenaire et porteur du projet UrbaSkin. Ces explants de peau proviennent essentiellement d'abdominoplasties ou de mammoplasties, obtenues lors d'opérations de chirurgie réparatrice. Pour les besoins de ces travaux de thèse, des explants issus de 11 donneurs différents ont été analysés : 7 donneurs ont été utilisés pour la mise au point des protocoles et des conditions d'analyse, 4 donneurs pour l'analyse après exposition au modèle de pollution sélectionné. Les donneurs pouvaient être indifféremment hommes ou femmes, de type caucasien ou africain, d'âge compris entre 18 et 50 ans. Des différences ont pu être observées dans les propriétés de surface de la peau des différents donneurs, néanmoins une comparaison a toujours été réalisée entre un lot témoin et un lot d'explants traités par le modèle de polluants issus du même donneur, ce qui a permis de s'affranchir de l'effet donneur. Chaque lot (témoin ou traité) était au minimum composé de cinq explants afin d'avoir une surface suffisante pour répéter les mesures.

1.1. Préparation des plasties

Les plasties analysées durant le projet ont été préparées au laboratoire BIO-EC. Les prélèvements de peau sont dans un premier temps dégraissés à l'aide d'un scalpel, puis une partie du derme réticulaire est grattée afin d'obtenir une épaisseur homogène sur l'ensemble du prélèvement. La peau (épiderme vivant, le derme papillaire et une partie du derme réticulaire) d'environ 5 mm d'épaisseur est ensuite découpée en carré d'approximativement 2 cm de côté, à l'aide d'un scalpel adapté et placée en condition de survie.

1.2. Conditions de maintien en survie des explants

Chaque explant ainsi préparé et découpé est ensuite placé sur une grille baignant dans un milieu de culture spécifique développé par BIO-EC (appelé BEM). Le milieu BEM, renouvelé toutes les 48h, est constitué de façon à maintenir en survie les explants et à leur apporter les nutriments nécessaires au bon fonctionnement de leur métabolisme. Les explants sont ensuite placés dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂ permettant de maintenir un pH de surface physiologique. Ainsi préparés, il a été démontré que ces explants

reproduisaient de façon optimale la morphologie et les mécanismes cutanés en lien avec l'application de produits cosmétiques et pharmaceutiques (Isoir 2006).

Les explants étaient préparés à J0, dès réception de la plastie (Figure 12) et placés dans l'incubateur. Pour les explants subissant un traitement par un modèle de polluants, celui-ci était réalisé à J3, puis les explants étaient envoyés au laboratoire URCOM à J4. Les analyses réalisées dès réception ont montré que les propriétés de surface évoluaient entre le jour de réception J4 et le lendemain J5. En effet, durant le transport des explants, ceux-ci n'étaient pas maintenus sous 5% de CO₂, provoquant ainsi une modification de leur pH de surface. De même, du milieu de culture se déversait légèrement à leur surface, modifiant les mesures d'hydratation et de perte insensible en eau. Ainsi, dès réception la surface des explants était époncée avec du papier absorbant. Puis, une nuit à l'incubateur (37°C, 5% CO₂) était nécessaire pour les stabiliser, rétablir leur pH surfacique et obtenir des résultats homogènes sur un même donneur.

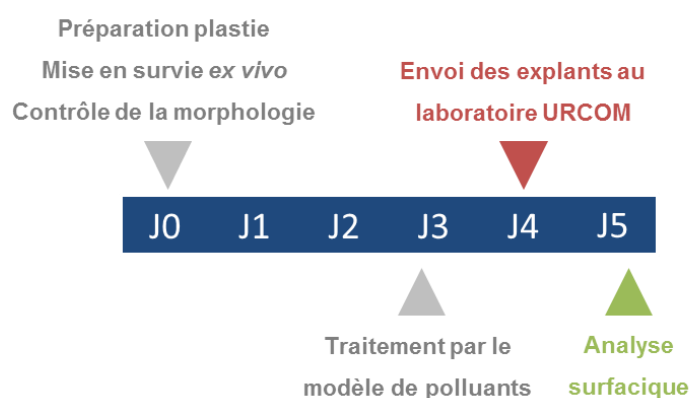


Figure 12. Préparation et analyse des explants de peau humaine

1.3. Mise sous tension mécanique des explants

La peau humaine présentant un état de pré-tension *in vivo*, lorsque les explants sont découpés, leur peau se rétracte, modifiant ainsi grandement leur microrelief. Comme décrit dans la partie 1, chapitre 2, la rugosité de surface influence la valeur des angles de contact. Il est donc apparu nécessaire d'analyser des explants maintenus en tension mécanique afin de reproduire au mieux le microrelief de la peau *in vivo* et ainsi d'obtenir des valeurs d'angles de contact comparables à celles de la peau *in vivo*. Ainsi, un système de support a été développé par le laboratoire BIO-EC (Figure 13) permettant de maintenir sous tension les explants. On constate aisément sur la Figure 13 (a2) et (b2) que les explants tendus ont une rugosité beaucoup plus faible. Cela a permis d'obtenir des gouttes de liquides plus symétriques et donc des valeurs plus répétables.

En fonction du nombre de supports disponibles et du nombre d'explants à analyser, ceux-ci étaient placés dans ce système dès réception à J4 ou le matin à J5 avant analyse physico-chimique et biométabolique.

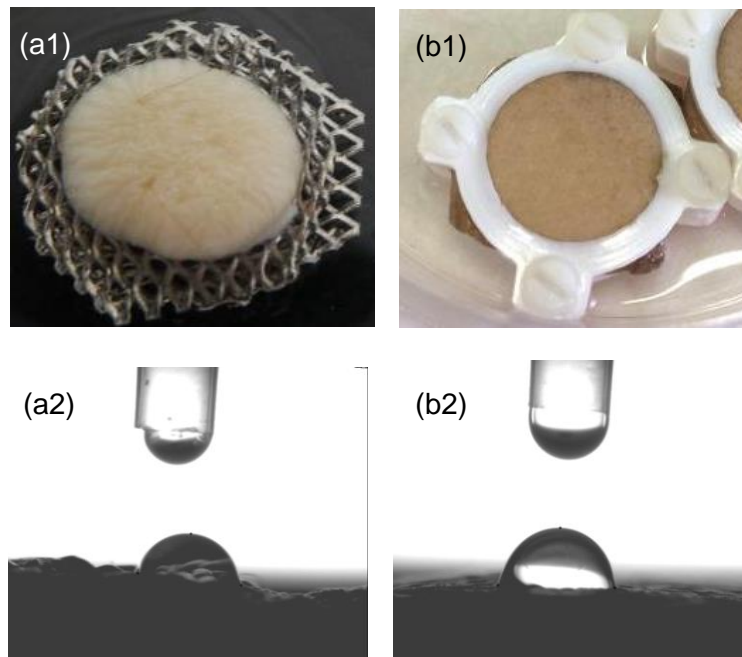


Figure 13. Photographies d'explants (a1) dans un support classique non tendu et (b1) dans un support spécifique de maintien sous tension mécanique accompagnées des images de mesures de l'angle de contact avec l'eau réalisées avec ces deux supports (Goniomètre PGX+, Scangaule, Gravigny, France)

Avant caractérisation de leur surface, les explants de peau étaient délicatement essuyés à l'aide de papier absorbant pour retirer tout excès de milieu de culture qui pouvait modifier leur état de surface. L'ensemble des instruments entrant en contact avec la surface des explants étaient nettoyés à l'éthanol puis séchés, de même pour les sorbonnes utilisées pour les manipulations, afin d'éviter toute contamination des échantillons.

Afin d'éviter l'effet du temps sur les manipulations, les explants témoins et traités par les polluants étaient analysés de façon alternée. Ainsi, le temps moyen entre la sortie de l'étuve et l'analyse de surface était le même pour chaque lot.

II. Modèles non-biologiques étudiés

Pour répondre aux objectifs du projet UrbaSkin, des modèles non-biologiques de peau ont été étudiés, pour apporter des éléments de compréhension supplémentaires par rapport à l'étude réalisée *ex vivo* sur explants de peau humaine et *in vivo* sur la peau de volontaires. En effet, le modèle explant de peau étant complexe, notamment pour l'analyse des propriétés de surface, il semblait nécessaire d'utiliser des modèles plus standardisés et répétables.

L'intérêt de ces modèles non-biologiques réside essentiellement dans l'étude des propriétés physico-chimiques de surface, nécessitant de mimer simplement la couche superficielle « morte » de la peau, le SC. Cela a permis de simplifier les manipulations en termes de coût, de logistique et surtout de surface disponible pour réaliser des essais et des screenings. De plus, il était impossible d'un point de vue pratique d'utiliser les explants de peau pour une étude sensorielle. Les surfaces non-biologiques commerciales sélectionnées pour ces travaux sont décrites ci-dessous. Afin d'aller plus loin dans cette démarche, un nouveau modèle de peau mieux adapté aux critères de notre étude a été développé: la Surfaskin (SFS).

II.1. Modèles commerciaux Vitroskin® et Bioskin®

Deux modèles commerciaux ont été étudiés et sélectionnés pour leur rapide disponibilité, facilité d'utilisation et leur standardisation.

La Vitroskin® (VS) commercialisée par IMS, Inc., Milford, CT est une référence en termes de modèles de peau non biologiques pour les études physico-chimiques. La VS est un modèle de peau synthétique contenant des protéines et des lipides (Douguet et al. 2017) et qui imite les propriétés de surface de la peau telles que la force ionique, le pH, la topographie et la tension superficielle critique (Jermann, Toumiat, and Imfeld 2002). Ce matériau non-biologique est utilisé comme substituant cutané pour des mesures SPF (Sun Protection Factor ou Facteur de Protection Solaire) *in vitro* ou pour l'étude de l'étalement d'émollients (Tokgoz et al. 1998; Douguet et al. 2017). Avant utilisation, il est nécessaire de l'hydrater selon un protocole standardisé développé par IMS. La VS est placée pendant 16 à 24h à température ambiante dans une chambre d'hydratation fermée standard qui contient 350g d'un mélange eau / glycérine 85:15. Une fois hydratée, elle est utilisée immédiatement, sans nettoyage préalable, pour réaliser les caractérisations surfaciques.

Le deuxième modèle non biologique commercial étudié est la Bio Skin Plate # 30 (BS), fournie par Beaulax, Co. Ltd, Tokyo, Japon. Cette surface est un matériau multicouche comprenant deux couches d'élastomère de polyuréthane et imitant les propriétés élastiques et viscoélastiques de la peau (Jachowicz, McMullen, and Prettypaul 2007). Cette surface a également été utilisée dans la littérature pour évaluer les propriétés optiques de fonds de teint en poudre (Ikeda et al. 2014) ou les propriétés de films minces appliqués sur la peau (Sato et al. 2016). Avant utilisation, le modèle BS était nettoyé à l'eau, sans éthanol qui détériore ses propriétés, et parfaitement séché.

Ces deux surfaces ont été caractérisées (voir partie 1, chapitre 2) d'un point de vue physico-chimique et topographique, et leur pertinence pour répondre aux objectifs du projet UrbaSkin sera discutée dans la partie 3 de ce manuscrit.

II.2. Principe du modèle développé au laboratoire : la Surfaskin®

Comme démontré dans la Partie 1, Chapitre 2, les deux surfaces commerciales BS et VS sont adaptées pour l'étude des propriétés physico-chimiques de la peau. Néanmoins, ces deux surfaces souffrent de certaines lacunes :

- La VS présente un microrelief très différent de la peau *in vivo*, pouvant ainsi modifier la façon dont un produit topique s'étale sur la surface, mais également modifier l'adhésion de particules polluantes. Son hydratation peut être contraignante, essentiellement dans le cadre de l'approche sensorielle. En effet, quelques instants après être sortie de la chambre d'hydratation, la feuille de VS ondule fortement et se déshydrate rapidement.
- La BS possède un caractère monopolaire basique (γ^-) assez faible, une rugosité un peu faible et une morphologie de surface encore trop différente de la peau *in vivo*, comme cela a été explicité dans la synthèse bibliographique.
- Les deux surfaces ne sont pas modulables. Leur composition n'est pas connue de façon précise et ne peut pas être ajustée. De plus, la caractérisation de l'effet des polluants sur les lipides cutanés en utilisant ces deux surfaces apparaît moins pertinente.

Ainsi, une nouvelle surface modèle a été développée pour cette étude, appelée la Surfaskin (SFS). Elle est basée sur la décomposition des éléments de surface de la peau constituée d'un film hydrolipidique recouvrant le SC (Figure 14).

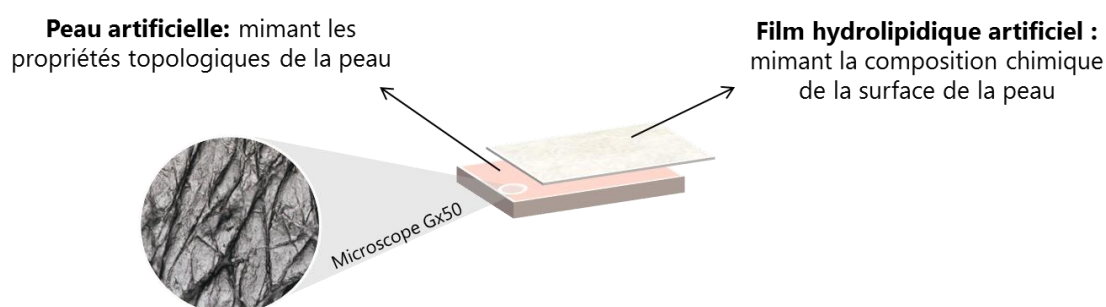


Figure 14. Concept de la surface développée au laboratoire : support synthétique recouvert d'un revêtement lipidique

La SFS est donc constituée de deux éléments : un matériau synthétique de microrelief contrôlé et similaire à la peau *in vivo*, recouvert d'un film hydrolipidique artificiel permettant

de mimer la composition chimique de surface de la peau. Ainsi, l'étude de l'effet des polluants et des produits cosmétiques pourra se faire sur la surface complète ou uniquement sur une partie de la surface (sur le support pour évaluer l'impact du relief sur l'adhésion de particules par exemple ; sur le mélange lipidique pour évaluer l'impact des polluants sur leur composition chimique et leur physico-chimie). De plus, les propriétés topographiques et la composition du film lipidique de la SFS sont modulables et peuvent être adaptées afin de mimer différents types de peaux (peau jeune, peau âgée, peau sèche ...).

Préparation du support polymérique

Le matériau silicone DragonSkin 20® (Création Silicone, Jouy-en-Josas, France) a été choisi en tant que support polymérique. Il s'agit d'une silicone habituellement utilisée dans le domaine cinématographique pour réaliser des effets spéciaux ou dans le domaine médical pour réaliser des prothèses (Bhushan and Tang 2011). Il a été démontré par Bhushan et Tang que son comportement physico-chimique après application de produits cosmétiques était similaire à la peau de rat, leur référence biologique.

Pour obtenir un microrelief similaire à la peau *in vivo*, la Dragonskin 20® est préparée à partir d'une empreinte de peau. Cette empreinte est réalisée *in vivo* grâce à la silicone biocompatible Body Double® (Création-Silicone, Jouy-en-Josas, France), qui permet d'obtenir un moule avec un relief négatif de peau. Cette empreinte Body Double® est ensuite moulée à l'aide de la silicone DragonSkin 20® (Figure 15).

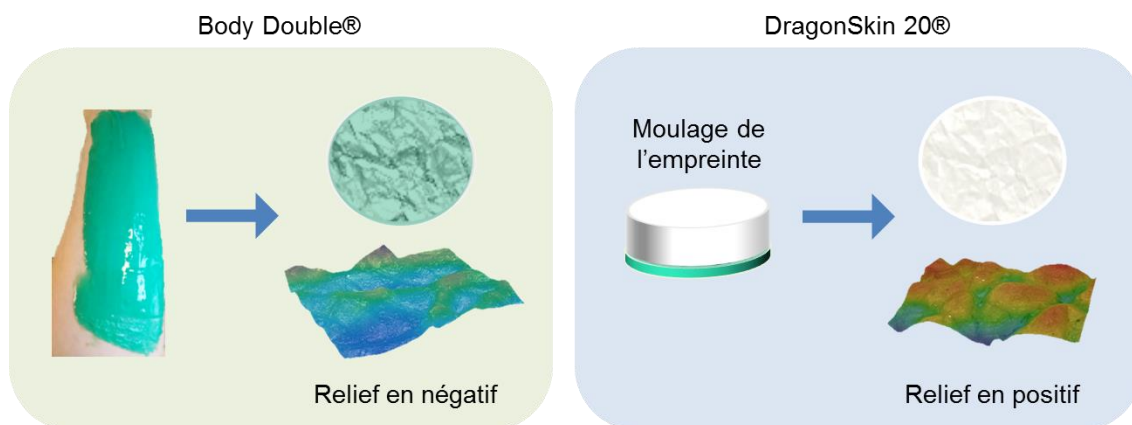


Figure 15. Préparation du support polymérique avec une topographie similaire à la peau *in vivo*

Cette DragonSkin 20® est préparée à partir d'un kit commercial. Une quantité égale des deux composants du kit sont mélangés à la main à l'aide d'une spatule en bois, puis le mélange est dégazé sous vide pendant 10 min. Le mélange est ensuite versé sur l'empreinte de peau Body Double® et laissé durcir pendant au moins 4 heures. La bonne compatibilité entre ces deux produits permet une reproduction parfaite de l'empreinte négative.

Préparation du revêtement lipidique

Pour reproduire la composition chimique de surface de la peau, un mélange de lipides sébacés est utilisé. En effet, les lipides sébacés sont les plus abondants au niveau du visage, zone la plus exposée aux polluants atmosphériques (Greene et al. 1970). De plus, les études épidémiologiques ont montré que les individus vivant en zone polluée possèdent une composition de sébum altérée (Partie 1, chapitre 1). De ce fait, l'étude de l'impact des polluants sur les lipides sébacés semble pertinente.

Le mélange de lipides est préparé en suivant la procédure et la composition décrite dans la littérature (Stefaniak, Harvey, and Wertz 2010) (Tableau 4). L'ensemble des lipides est dissout dans un mélange de solvants Chloroforme / Méthanol 2:1 à une concentration de 10 g/L de sébum. La solution ainsi préparée peut être conservée au réfrigérateur (T = 2-4°C) jusqu'à utilisation. Pour évaporer le solvant, un évaporateur rotatif est utilisé (Rotovapor® R-300, BÜCHI, Labortechnik AG, Flawil, Suisse).

Cette composition a été sélectionnée car elle reproduit assez fidèlement les proportions des différentes catégories de lipides du sébum humain et est stable dans le temps (Stefaniak, Harvey, and Wertz 2010).

Tableau 4. Composition du mélange de lipides sébacés

Molécule	Pureté	Fournisseur	Pourcentage massique (%)
Squalène	>98%	Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri)	10,29
Palmityl Palmitate		Stéarinerie Dubois (France)	19,42
Oleyl Oleate (Schercemol™ OLO ester)		Lubrizol (Oudalle, France)	4,85
Tristearine	> 99%	Sigma-Aldrich	21,36
Trioleine	65%	Sigma-Aldrich	10,68
Acide stéarique		Stéarinerie Dubois	6,87
Acide palmitique		Stéarinerie Dubois	6,87
Acide oléique	99%	Fisher Scientific SAS (Illkirch, France)	13,74
Cholesteryl Oleate	97%	Fisher Scientific	1,94
Cholestérol	95%	Fisher Scientific	3,88
(±)-α-Tocophérol	>97%	Fisher Scientific	0,10
Total			100,00

Protocoles de dépôt du revêtement lipidique

Deux protocoles ont été utilisés pour déposer le revêtement lipidique sur le support DragonSkin 20®.

Le premier protocole utilise le mix de lipides décrit précédemment dissout dans un mélange chloroforme / méthanol 3:7 à une concentration de 20 g/L de sébum. Cette solution de sébum est pulvérisée grâce à un spray sur le support polymérique (Gerhardt et al. 2009; Jones et al. 2016). 10 pulvérisations sont réalisées à 5 cm de distance sur une surface de 1 x 7 cm, à température ambiante. Après la pulvérisation, les surfaces sont laissées à sécher dans un tube en plastique hermétique afin de permettre une évaporation lente des solvants et une répartition homogène du revêtement lipidique.

Le deuxième protocole utilise cette fois-ci le mélange de lipides purs, sans solvant. Ce mélange lipidique est placé à l'étuve à 70°C pour permettre la liquéfaction de tous les lipides. Le support Dragonskin 20® est également placé à l'étuve à 70°C pendant 15 min, pour éviter une trop grande différence de températures entre le support et le mélange lipidique. Un fin pinceau est ensuite utilisé pour réaliser le dépôt de lipides sur le support. La surface recouverte de lipides est placée à l'étuve durant 5 min pour obtenir une bonne homogénéisation du dépôt. L'excès de lipides est ensuite retiré par tamponnage à l'aide d'un papier absorbant puis la SFS ainsi obtenue est laissée de nouveau à l'étuve pendant 5 min. Cette étape permet d'obtenir un film fin et homogène de lipides. La SFS est ensuite laissée à refroidir à température ambiante durant plusieurs minutes et est utilisée dans la journée, sans autre prétraitement.

Le choix de l'utilisation de l'un ou l'autre des protocoles est discuté dans la partie 3, chapitre 1. Les propriétés de la SFS obtenue dépendront du choix du protocole de dépôt.

Afin de valider la pertinence des différents modèles non-biologiques présentés ci-dessus, ceux-ci ont été comparés avant et après application de produits cosmétiques à la peau *in vivo*, grâce à des mesures réalisées sur les avant-bras de deux panélistes femmes, âgées de 23 et 25 ans. La peau *in vivo* était nettoyée à l'éthanol avant utilisation puis parfaitement séchée.

III. Conclusion du chapitre

Différents modèles d'étude ont été utilisés au cours de ce projet : un modèle biologique (l'explant de peau humaine) et trois modèles non-biologiques (deux modèles commerciaux et un modèle développé au laboratoire). Le modèle *ex vivo*, le plus similaire à la peau *in vivo*,

nous servira de référence biologique pour étudier l'effet des polluants et pour évaluer la pertinence des modèles non-biologiques sélectionnés.

Pour comprendre les phénomènes impliqués *ex vivo*, les modèles non-biologiques seront d'une grande utilité. L'un ou l'autre des modèles sera utilisé, en fonction de ses propriétés et des critères des études (instrumentales ou sensorielles). Ainsi, l'ensemble des modèles sera utilisé de façon complémentaire, ce qui permettra de développer de nouveaux protocoles et nouvelles méthodologies d'étude des propriétés de surface de la peau.

Chapitre 2 – Caractérisations instrumentale et sensorielle de surface

Ce chapitre présente l'ensemble des méthodes et protocoles utilisés pour caractériser la surface des modèles d'études présentés précédemment. D'abord, les protocoles de caractérisation instrumentale seront présentés. Ces mesures ont pu être réalisées sur l'ensemble des modèles d'étude disponibles. Ensuite, les protocoles sensoriels utilisés seront décrits. Ces évaluations sensorielles ont été réalisées uniquement *in vivo* et sur les modèles non-biologiques les plus pertinents.

I. Mesures de l'angle de contact et d'énergie libre de surface

L'objectif de ces mesures physico-chimiques était de déterminer dans un premier temps l'énergie libre de surface de la peau *ex vivo* et des différents modèles non-biologiques. Cette technique a également été utilisée pour évaluer l'impact de polluants atmosphériques sur les différentes composantes d'énergie libre de surface de la peau, *ex vivo* et sur SFS. Enfin, cette technique a permis de mettre en évidence l'impact de produits topiques sur l'énergie de surface, par une caractérisation de leur film résiduel.

I.1. Mesure de l'angle à l'avancée

Comme décrit dans la Partie 1, chapitre 2, la mesure de l'angle de contact à l'avancée permet de calculer différentes grandeurs physico-chimiques, notamment l'énergie libre d'une surface et ses différentes composantes. Elle permet également d'étudier l'interaction entre un liquide et une surface, mettant en évidence les propriétés d'étalement de liquides sur la surface étudiée (Savary, Grisel, and Picard 2013). L'angle à l'avancée a été utilisé car il est plus répétable que l'angle à l'équilibre pour les surfaces de faible énergie comme la peau (David and Neumann 2014).

Les mesures de l'angle de contact à l'avancée ont été réalisées selon la méthode de la goutte posée (ou « sessile drop method »), à l'aide d'un goniomètre portatif PGX+ (ScanGaulle, Gravigny, France), connecté au logiciel PGPlus. L'utilisation d'un goniomètre portatif a permis de réaliser des mesures sur les modèles d'études décrits précédemment mais aussi *in vivo* (panélistes femmes, de type caucasien, âgées de 23 et 25 ans). Cet appareil est équipé d'une caméra haute résolution pour acquérir les images, associée à un système d'éclairage et de miroir spécifique permettant de visualiser la goutte. La seringue utilisée pour le dépôt a un diamètre interne de 0,77mm.

Les mesures sont réalisées à température ambiante ($20 \pm 1,5$ °C). Pour réaliser les mesures, une goutte de faible volume est déposée sur la surface à analyser, puis son volume est augmenté par l'ajout de 5 gouttes successives, de même volume, à l'aide d'un

appareil pousse-seringue KSD Scientific (Inc, Guilford, Etats-Unis) réglé à un débit de 1mL/h (Figure 16). La goutte finale atteint un volume d'environ 6 μ L. 5 images sont enregistrées immédiatement après l'addition de chaque goutte. Le temps de mesure est d'environ 20 secondes, ce qui permet de négliger l'évaporation ou la pénétration du liquide testé.

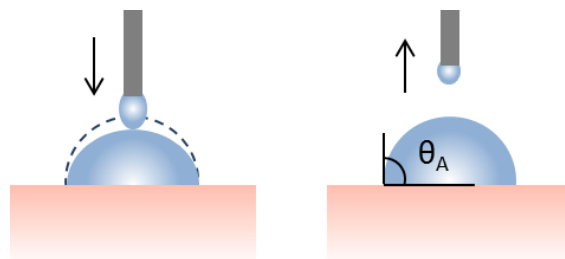


Figure 16. Mesure de l'angle de contact à l'avancée

Les angles à l'avancée sont mesurés à l'aide du logiciel, grâce à l'analyse de la forme de la goutte. Les mesures réalisées à droite et à gauche de la goutte sont moyennées pour obtenir une valeur d'angle par image. La valeur d'angle à l'avancée reportée, notée θ_A , est la valeur maximale mesurée parmi les 5 images analysées. Quel que soit le liquide étudié ou la surface analysée, chaque mesure d'angle de contact est réalisée au minimum trois fois.

1.2. Liquides de références et calcul d'énergie libre de surface

Pour déterminer l'énergie libre de surface de la peau *ex vivo* et des différents matériaux étudiés, le modèle mathématique de Van Oss à 3 composantes (composante de Lifshitz – Van der Waals, acide et basique) a été utilisé (C. J. Van Oss, Chaudhury, and Good 1987; C. J. Van Oss, Good, and Chaudhury 1988; Carel J. Van Oss, Chaudhury, and Good 1988). Ce modèle a été préféré aux modèles à 2 composantes (composantes dispersive et polaire) car il permet de caractériser finement les interactions apolaires et dispersives mais aussi les interactions de types acide et basique. De plus, cette méthode ayant été utilisée pour caractériser la peau *in vivo* (Mavon et al. 1997, 1998), cela permet d'avoir des valeurs de référence *in vivo* afin de comparer et valider les différents modèles étudiés.

Ainsi, par analogie avec les études de la littérature réalisées *in vivo*, le système de liquides eau – diiodométhane – formamide a été utilisé. Selon les travaux de Van Oss, le travail d'adhésion W_{sl} entre le liquide l et la surface solide s peut être exprimé de la façon suivante :

$$W_{sl} = 2\sqrt{\gamma_s^{LW}\gamma_l^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_s^+\gamma_l^-} + 2\sqrt{\gamma_s^-\gamma_l^+} \quad \text{où } \gamma^{LW}, \gamma^+ \text{ et } \gamma^- \text{ sont respectivement les}$$

composantes de Lifshitz – Van der Waals, acide et basique de l'énergie libre de surface des différentes phases en contact.

Grâce à la loi de Young – Dupré, exprimant le travail d’adhésion en fonction de la tension de surface du liquide et l’angle de contact entre le liquide et la surface, on obtient l’équation suivante :

$$(1 + \cos\theta) \gamma_l = 2\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_l^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_l^-} + 2\sqrt{\gamma_s^- \gamma_l^+}$$

Le système de trois équations à trois inconnues obtenu à l’aide des mesures réalisées avec les trois liquides de référence dont la valeur des différentes composantes est connue (Tableau 5) est résolu grâce au logiciel Microsoft® Excel 2012, ce qui permet de calculer les composantes d’énergie libre de la surface étudiée.

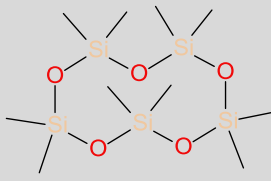
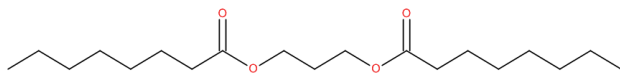
Tableau 5. Valeur des composantes d’énergie libre des liquides de références utilisés

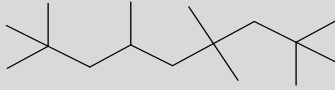
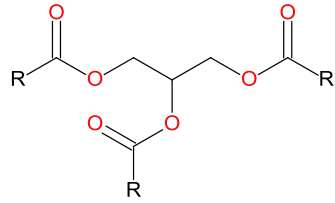
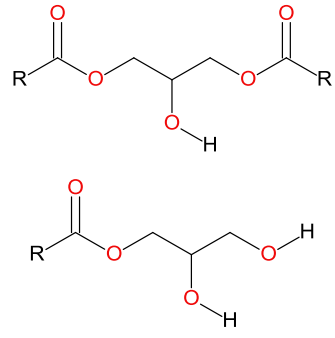
Liquide	γ_l (mJ.m ⁻²)	γ_l^{LW} (mJ.m ⁻²)	γ_l^+ (mJ.m ⁻²)	γ_l^- (mJ.m ⁻²)
Eau	72,8	21,8	25,5	25,5
Formamide	58	39	1,92	47,0
Diiodométhane	50,8	50,8	0,72	0

1.3. Etude de l’étalement d’émollients sur les modèles d’études

D’autres liquides ont pu être utilisés pour les mesures de l’angle de contact, notamment certains émollients couramment utilisés dans le domaine cosmétique, liquides à température ambiante (Tableau 6). Ils ont été choisis de façon à ce que leur structure chimique et leur polarité soient variées. Ainsi, l’étude de l’étalement des émollients a permis de comparer les différents modèles d’études (biologiques et non-biologiques) avec la peau *in vivo* et d’étudier leurs interactions avec des liquides de natures différentes.

Tableau 6. Emollients utilisés pour les mesures de l’angle de contact

Nom INCI	Code	Structure	Tension de surface (mJ/m ²) à 20°C
Cyclopentasiloxane (Savary, Grisel, and Picard 2013)	CPS		18,0
Propanediol dicaprylate (Savary, Grisel, and Picard 2013)	PDC		33,1

Isohexadecane (Savary, Grisel, and Picard 2013)	IHD		24,4
95% triacylglycerols			
			
~ 2% mono/diacylglycerols			
Argan oil (Charrouf and Guillaume 2008)	AO		31,7 (donnée expérimentale)
~ 2% acides gras libres			

1.4. Analyse physico-chimique du film résiduel d'ingrédients cosmétiques

Pour étudier le film résiduel des produits topiques après leur application sur la peau *in vivo* ou sur modèles non-biologiques, le même protocole instrumental a été utilisé (Figure 17).

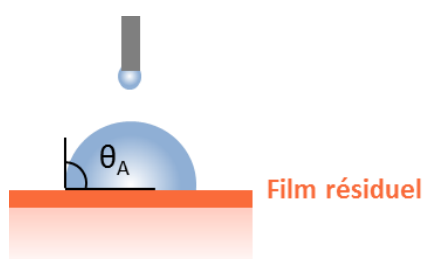


Figure 17. Caractérisation du film résiduel grâce aux mesures de l'angle de contact

Les produits (émulsions ou émoullients) ont été appliqués de façon à obtenir une quantité de 7 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$, en 40 tours à un rythme de 90 rotations par minutes. Les mesures de l'angle de contact à l'avancée avec les trois liquides de référence ont été réalisées 3 min et/ou 1h après application.

Cette technique d'analyse nous a permis de comparer et valider le comportement physico-chimique des différentes surfaces non-biologiques après application de produit, en comparaison avec la peau *in vivo*. Dans un premier temps, seul le liquide de référence eau a été utilisé, les autres liquides de référence étant toxiques pour la peau. Les produits topiques utilisés pour comparer les différentes surfaces sont indiqués ci-dessous (Tableau 7).

Tableau 7. Produits cosmétiques utilisés pour comparer les modèles non-biologiques et la peau *in vivo* (H/E : huile dans eau ; E/H : eau dans huile)

Produit	Nature	Code
Cyclopentasiloxane	Emollient	I1
Nivea Crème	Emulsion E/H	E1
Uriage Bariéderm Crème Mains Isolante Réparatrice	Emulsion E/H	E2
Isohexadécane	Emollient	I2
Huile d'argan désodorisée	Emollient	I3
Emulsion contenant du Beurre de Babassu®	Emulsion H/E	E3
Propanediol dicaprylate	Emollient	I4
Gel Hydroalcoolique Assanis Family	Solution / gel aqueux	S1
Solution aqueuse de polysaccharide Pollustop®	Solution / gel aqueux	S2
Uriage Roséliane Crème Riche Anti-rougeurs	Emulsion H/E	E4
Solution aqueuse d'Oligopiceatannol® Solabia	Solution / gel aqueux	S2
Solution aqueuse d'actif Resistress® Solabia	Solution / gel aqueux	S3
Uriage Age Protect Crème Nuit Détox	Emulsion H/E	E5
Uriage Age Protect crème multiactions SPF30	Emulsion H/E	E6
Uriage Age Protect Sérum Multi-Actions	Emulsion H/E	E7
Emulsion standard H/E (Gilbert et al. 2012)	Emulsion H/E	E8
Uriage Dépiderm Fluide anti-tâches SPF 15	Emulsion H/E	E9

Les autres liquides de références (diiodométhane et formamide) ont été utilisés dans un second temps sur modèles non-biologiques afin de caractériser l'énergie libre de surface du film résiduel des produits topiques présentés dans le Tableau 9 (paragraphe III.2.).

II. Méthodes d'analyse complémentaires

Pour compléter les mesures de l'angle de contact plusieurs autres méthodes d'analyse ont été utilisées, notamment la spectroscopie infrarouge permettant d'étudier la composition chimique de surface, la mesure de perte insensible en eau et de pH surfacique permettant d'évaluer des paramètres physiologiques de la peau mais aussi la microscopie optique et numérique permettant d'étudier la surface des modèles non-biologiques.

II.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La mesure de spectroscopie infrarouge est basée sur la capacité des molécules à absorber certaines longueurs d'onde du rayonnement infrarouge, grâce à l'interaction entre le rayonnement et la matière. L'énergie du rayonnement absorbée par une molécule dans l'infrarouge moyen correspond à la fréquence de vibration de certaines liaisons chimiques de cette molécule (Stuart 2005). Il existe différents modes de vibrations des liaisons chimiques : les modes d'élongation et de déformation (Figure 18), dont les énergies sont caractéristiques du type de liaison.

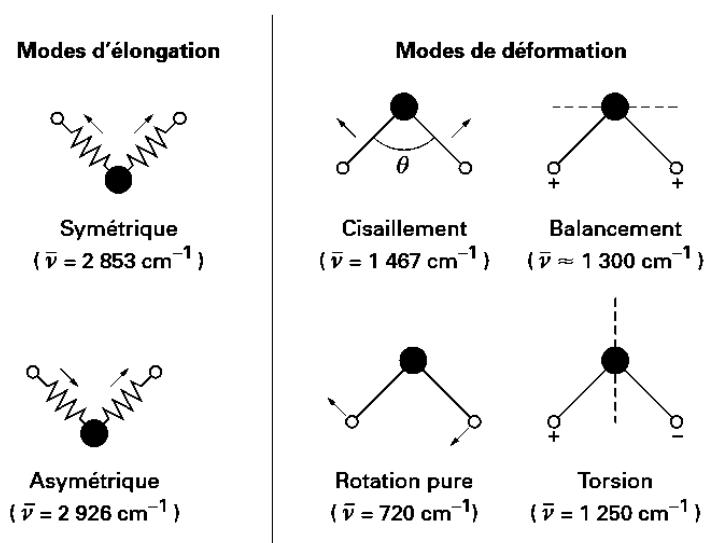


Figure 18. Différents modes de vibrations : exemple des vibrations des groupements CH_2 d'une molécule (extrait de (Dalibart and Servant 2000))

Ainsi, on obtient le spectre infrarouge d'un échantillon (liquide, solide, gazeux, sous forme de poudre ...) traversé par un rayonnement infrarouge polychromatique en déterminant les longueurs d'onde absorbées, spécifiques des fonctions chimiques présentes dans l'échantillon en question.

Dans le cas de notre étude de surface, un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier en réflexion totale atténuée a été utilisé (appareil Frontier (Perkin-Elmer, Waltham, Etats-Unis), piloté par le logiciel Spectrum (version 10.03.08.0135)). Quel que soit l'échantillon à analyser, celui-ci était placé directement au contact d'un cristal de sélénium de zinc de fort indice de réfraction ($n = 2,43$) (Figure 19), et maintenu avec une force de 20 UA pour assurer un bon contact entre la surface à analyser et le cristal.

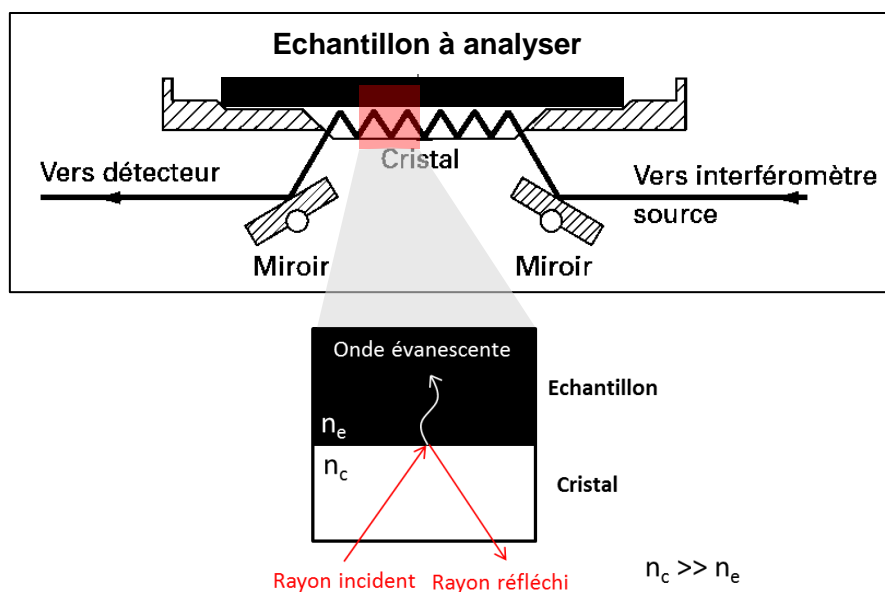


Figure 19. Principe de la mesure en réflexion totale atténuée (adapté de (Dalibart and Servant 2000))

L'analyse est réalisée sur la gamme de longueurs d'ondes allant de 650 cm^{-1} à 4000 cm^{-1} . 4 spectres sont enregistrés et moyennés lors de chaque acquisition. L'analyse des spectres obtenus est également réalisée sur le logiciel Spectrum.

Cette technique non invasive a permis de caractériser la composition chimique de surface des modèles biologiques et non-biologiques, et de la peau *in vivo*. Elle a été utilisée sur peau nue mais aussi après application de produits cosmétiques, permettant d'étudier la composition chimique du film résiduel. Les produits présentés dans le Tableau 7 ont été utilisés afin de comparer les modèles non-biologiques et la peau *in vivo* et les produits présentés dans le Tableau 9 ont été caractérisés sur modèles non-biologiques.

Utilisée sur peau nue, cette technique a également permis de caractériser l'organisation des bicouches lipidiques du SC. En effet, les longueurs d'onde de vibration des groupements CH_2 des chaînes lipidiques sont très sensibles à leur organisation latérale, notamment le mode de vibration d'élongation symétrique $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ (Figure 18, (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006)), dont la gamme de fréquences associées est comprise entre 2847 cm^{-1} et 2855 cm^{-1} . Plus la longueur d'onde associée est élevée, plus les bicouches sont désorganisées. Ceci a notamment été démontré par Mendelsohn, Flach et Moore, à travers l'étude de l'organisation des bicouches lipidiques du SC en fonction de la température (Figure 20, (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006)). Deux transitions sont observées : une première transition correspond au passage de l'organisation orthorhombique à hexagonale pour des longueurs d'onde autour de 2849.5 cm^{-1} , puis la deuxième transition vers l'état le plus désordonné a lieu vers 2852 cm^{-1} . Le suivi de cette longueur d'onde donne donc des indications quant à l'organisation des bicouches lipidiques.

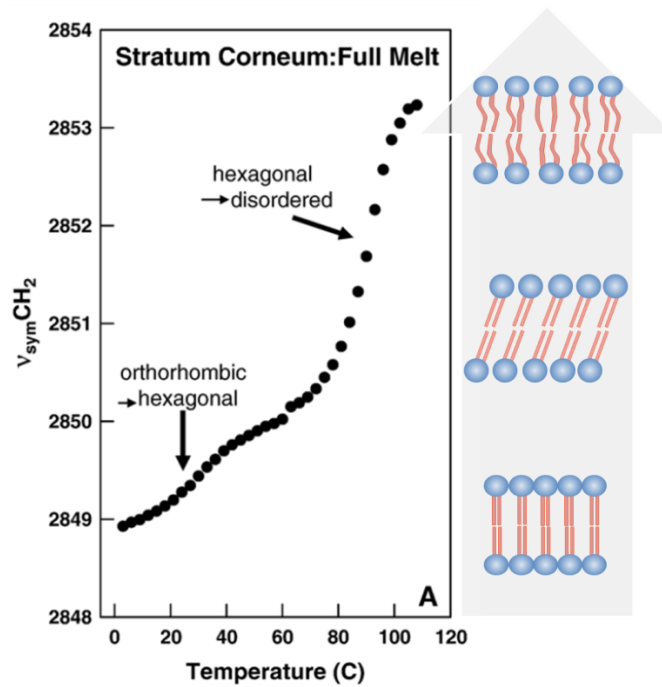


Figure 20. Evolution de la longueur d'onde $v_{sym}CH_2$ en fonction de la température et de l'organisation latérale des bicouches lipidiques (adapté de (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006)).

II.2. Perte insensible en eau et pH surfacique

Les mesures de PIE et de pH surfacique ont permis de déterminer des caractéristiques physiologiques de la peau et de caractériser sa fonction barrière (Elkeeb et al. 2010). Ces techniques ont essentiellement été utilisées *ex vivo*, avant et après exposition aux polluants atmosphériques.

La mesure de PIE est basée sur la mesure de l'évaporation de l'eau à sa surface, en utilisant la loi de Fick :

$$\frac{dm}{dt} = -D \cdot A \cdot \frac{dp}{dx}$$

Où m : eau transportée en g ; A : surface en m^2 , t : temps en h, D : constante de diffusion $D = 0.0877 \text{ g/m.h.mmHg}$; p : pression de vapeur de l'atmosphère en mmHg ; x : distance de la surface de la peau au point de mesure en m.

L'appareil utilisé, le Tewamètre® TM 300 (Monaderm, Monaco, France), contrôlé par le logiciel CK_Multi Probe (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Allemagne), est en géométrie ouverte et possède deux capteurs permettant de mesurer la PIE, un capteur de température et un capteur d'humidité (Elkeeb et al. 2010), placés dans un cylindre creux (Figure 21). Ce type de tewamètre en géométrie ouverte nécessite des conditions ambiantes standardisées.

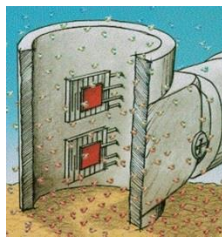


Figure 21. Représentation du principe de la mesure de PIE à l'aide d'un Tewamètre® (issue de "Tewameter® TM 300 - Courage - Khazaka Electronic, Köln" 2018)

Pour réaliser la mesure de PIE, le Tewamètre® a été utilisé en mode continu : une fois la sonde correctement positionnée sur la surface à analyser, la mesure est déclenchée et une valeur de PIE est mesurée toutes les secondes, durant 60 secondes. La valeur de PIE reportée correspond à la moyenne des mesures réalisées entre 15 et 30 secondes.

La sonde Skin-pH-mètre® PH905 (Monaderm, Monaco, France) pilotée par le même logiciel CK_Multi Probe a été utilisée pour les mesures de pH surfacique. Il s'agit d'une sonde de pH ayant la particularité d'être plane, pour assurer un bon contact avec la surface de la peau. Toutes les mesures de pH ont été réalisées au minimum trois fois par surface analysée, et la sonde a été rincée à l'eau distillée et essuyée avec du papier doux entre chaque utilisation.

L'ensemble des mesures biométriologiques ont été réalisées à température ambiante (entre 18°C et 22°C) et à un taux d'humidité contrôlé (50%). Lors des mesures sur explants de peau, le Tewamètre®, préalablement nettoyé avec un chiffon doux, était toujours utilisé avant le Skin-pH-mètre® afin d'éviter de mouiller la peau par la sonde pH.

II.3. Caractérisation du microrelief des modèles non-biologiques

Les microscopies optique et numérique ont permis d'étudier la surface et le microrelief des modèles non-biologiques.

Le microscope optique Leica (DMLP/DC 300, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suisse) a été utilisé en mode transmission, au grossissement x50, en lumière non-polarisée et polarisée. Les images microscopiques sont enregistrées par le logiciel IM 1000. Cette technique a notamment été utilisée pour évaluer l'homogénéité du dépôt de lipides sur la SFS (en lumière non-polarisée LNP et polarisée LP) (Figure 22), et leur possible cristallisation (en LP).

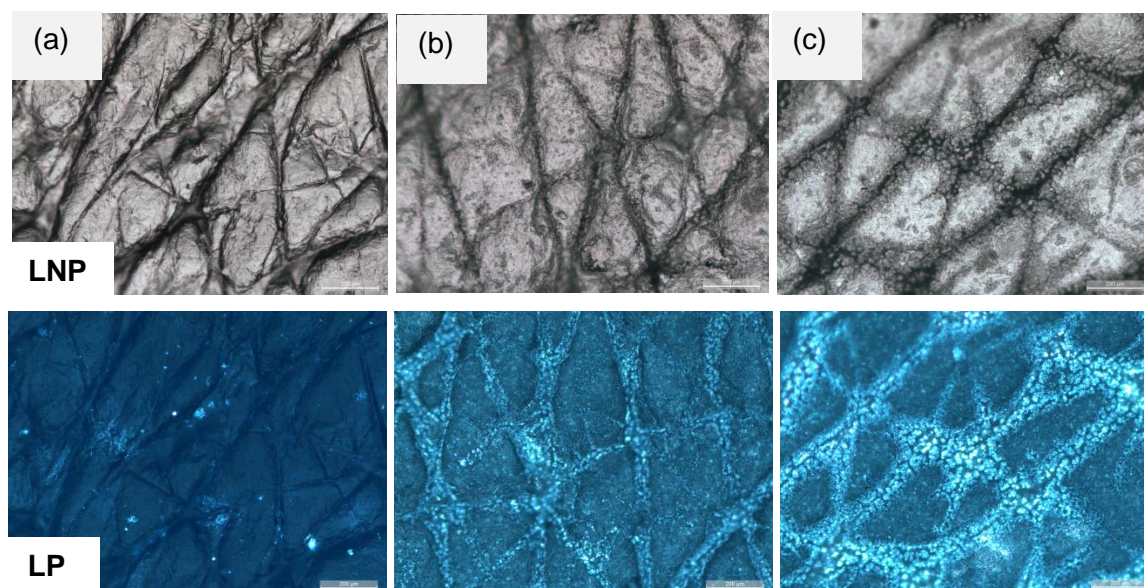


Figure 22. Exemple d'images microscopiques obtenues (transmission, Gx50) (a) support Dragonskin20® moulé sans lipides, (b) SFS avec un dépôt de lipides homogène (c) SFS avec un excès de lipides dans les sillons du microrelief

Le microscope numérique utilisé est un VHX-1000 (Keyence Corporation, TSE, Osaka, Japon), équipé d'une lentille VH-Z100R au grossissement x300. Les images en trois dimensions ont été enregistrées en transmission et assemblées pour obtenir des images de 1600 x 1600 pixels (Figure 23). Ces analyses numériques ont permis de caractériser plus finement la rugosité des modèles non-biologiques. Les profils de rugosité et les paramètres associés ont été calculés à partir des images 3D, selon la norme ISO 25178, grâce au logiciel Mountains Map® (Digital Surf SARL, Besançon, France) (Tableau 8).

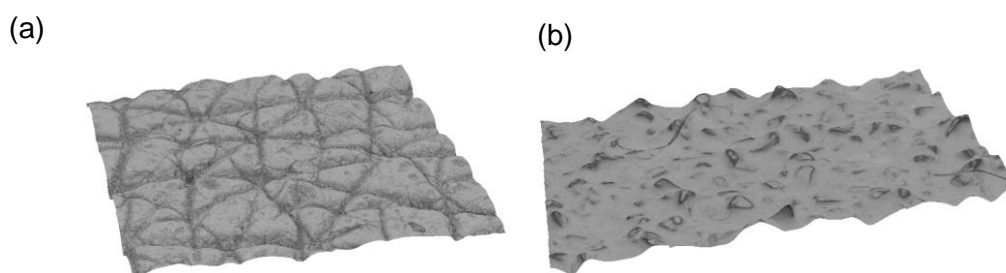


Figure 23. Exemple d'images obtenues en microscopie numérique (a) SFS (b) VS

Tableau 8. Paramètres de rugosité de surface (ISO 25178)

Paramètres de rugosité	Unité	Définition
Sq	µm	Hauteur moyenne quadratique
Ssk	/	Facteur d'asymétrie
Sp	µm	Hauteur maximale des pics
Sv	µm	Profondeur maximale des vallées
Sz	µm	Hauteur maximale
Sa	µm	Hauteur moyenne arithmétique

Ainsi, à partir des méthodes instrumentales décrites précédemment, les modèles biologiques et non-biologiques ont pu être caractérisés de façon complète d'un point de vue chimique, physico-chimique et topographique. Pour compléter cette caractérisation instrumentale, des méthodes de caractérisation sensorielle ont également été utilisées, notamment pour l'évaluation du film résiduel de produits cosmétiques. Ces méthodes sont présentées dans le paragraphe suivant.

III. Caractérisation sensorielle du film résiduel de produits cosmétiques

La caractérisation sensorielle du film résiduel de produits cosmétiques avait plusieurs objectifs. Dans un premier temps, elle visait à mettre en évidence et à caractériser l'impact de produits cosmétiques sur la surface de la peau, en complément de l'analyse physico-chimique. Ensuite, l'un des objectifs était de relier la sensorialité des films résiduels des produits topiques à leur capacité à diminuer ou augmenter l'adhésion de particules, afin de définir de nouveaux protocoles d'évaluation de propriétés anti-pollution. Enfin, l'utilisation de modèles non-biologiques en analyse sensorielle représentait une approche méthodologique particulièrement innovante, pour comparer la perception de produits cosmétiques appliqués *in vivo* et sur des surfaces modèles.

III.1. Choix des descripteurs, définitions et protocoles

L'analyse sensorielle consiste à étudier les propriétés organoleptiques d'un produit, en utilisant les organes des sens (Pensé-Lhéritier 2016). L'Homme, appelé panéliste ou juge en analyse sensorielle, sera alors l'instrument de mesure de ces propriétés organoleptiques. La caractérisation de la texture de produits cosmétiques est essentiellement réalisée à travers l'établissement d'un profil sensoriel (méthode descriptive et quantitative). L'évaluation de la texture des produits cosmétiques par un panéliste est divisée en quatre étapes durant lesquelles les sensations perçues peuvent être identifiées et quantifiées : l'apparence, le pick-up, l'application et l'apparence résiduelle après application (Schwartz 1975; Cville and Dus 1991) (Figure 24).

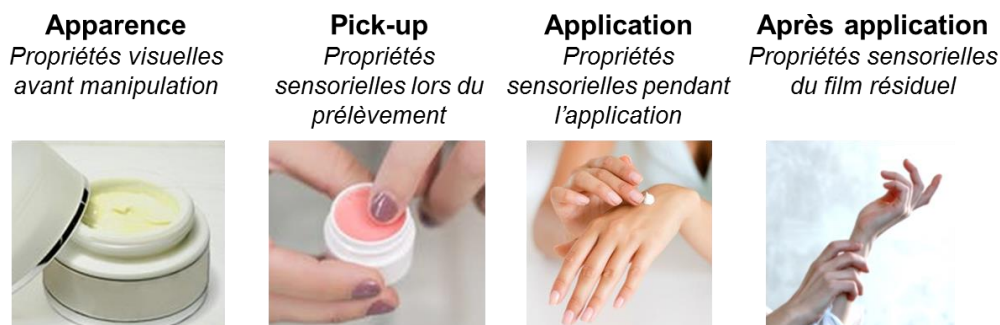


Figure 24. Phase d'évaluation de la texture d'un produit cosmétique

Différents descripteurs, permettant d'identifier les sensations, peuvent être définis et étudiés pour chacune de ces phases : l'apparence peut être caractérisée par la brillance ou l'intégrité de la forme du produit ; le pick-up peut être décrit par le filant ou la fermeté ; l'application fait intervenir de nombreuses sensations comme l'étalement, le cireux, le gras, l'aqueux ou encore l'épaisseur sous le doigt. Enfin, la phase après application peut être analysées à travers des descripteurs tels que le brillant, le gras, le collant, la douceur, le huileux, la quantité de résidu ... (Wortel and Wiechers 2000; Maria Emma Parente, Gambaro, and Solana 2005; Gilbert 2012). Dans le cadre de cette étude des propriétés de surface de la peau, le choix des descripteurs s'est limité à la phase après application de produits, pour caractériser les effets visuels ou tactiles du film résiduel de produits.

Dans l'objectif d'étudier le lien entre propriétés sensorielles du résidu et propriétés anti-adhésion de particules, nous avons estimé que le choix du descripteur « collant » après application était le plus pertinent.

Les évaluations sensorielles ont été réalisées selon la méthode « Spectrum™ Descriptive Analysis » (SDA), basée sur l'utilisation de concepts physiques de la perception tactile (Muñoz and Civille 1992; Gilbert et al. 2013). Le « collant » après application a été défini comme étant la force nécessaire pour décoller la tranche de la main appuyée sur la zone d'application du produit. Pour évaluer cette propriété résiduelle, les juges devaient dessiner un cercle de 9.60 cm² sur leur avant-bras et appliquer 30 µL de produit en 10 rotations au rythme de 90 rotations par minute dans le cercle préalablement dessiné. 3 min après l'application, ils devaient presser fortement la tranche de leur main sur la zone d'application et la décoller lentement, 3 fois de suite, puis évaluer le « collant ».

Une échelle de 0 à 7 accompagnée de produits référents a été utilisée pour quantifier la sensation de « collant » après application de façon objective, répétable et consensuelle (Gilbert 2012). Les produits utilisés en tant que référents sont les suivants :

- L'eau distillée, dont le collant après application était évalué à 0,5
- Le Lait Corps Réparateur Peaux Extra Sèches de la marque Mixa, évalué à 3
- Le liquide-vaisselle spécial peaux sensibles de la marque Auchan, évalué à 6,5

Ces produits ont été testés et choisis parmi de nombreux produits commerciaux pour leur propriété collante après application.

III.2. Sélection de produits à étudier

Onze produits cosmétiques et matières premières ont été étudiés (Tableau 9). L'émulsion standard eau dans huile a été préparée selon la composition et le protocole décrit dans l'article de Gilbert et al. (Gilbert et al. 2012).

Ces produits ont été sélectionnés pour leurs galéniques variées (crème main, soin visage ou produits capillaires) et de façon à obtenir une bonne répartition de ces produits sur l'échelle de notation du collant.

Tableau 9. Nom commercial, code et usage des différents produits analysés

Nom commerciaux des produits	Code	Type de produits
L'Oreal Paris Studio Line Out of Bed	P1	Gel Coiffant pour cheveux
Aderma Crème main au lait d'avoine	P2	Crème main
Emulsion standard huile dans eau	P3	Produit hydratant
Head & Shoulders Classic	P4	Shampoing
Uriage Age Protect Sérum Multi-actions	P5	Soin du visage
Uriage Depiderm Fluide anti-tâches SPF 15	P6	Soin du visage
Uriage Roseliane Crème riche anti-rougeurs	P7	Soin du visage
Uriage Age Protect Crème Nuit Détox	P8	Soin du visage
Invincity® Solabia (INCI: Water (and) Ascophyllum nodosum Extract)	P9	Actif cosmétique
Decamethylcyclopentasiloxane Evonik Goldschmidt (INCI: Cyclopentasiloxane)	P10	Ingrédient cosmétique
Uriage Eau Thermale Brume d'eau SPF 30 *	P11	Brume solaire

* Produit non utilisé pour l'évaluation sensorielle sur surfaces non-biologiques

III.3. Recrutement et entraînement du panel

Les 21 panélistes impliquées dans ce projet ont été recrutées au sein du personnel et des étudiants du laboratoire URCOM. Ces panélistes ont été sélectionnées de façon à avoir un panel homogène en termes d'état de peau.

Seules des femmes ont été impliquées dans les séances car d'une part les hommes présentent généralement une peau plus épaisse (Close 1994), d'autre part leur sensibilité aux produits cosmétiques est souvent moindre par rapport à celle des femmes, qui utilisent régulièrement ce type de produit. Ainsi, l'entraînement des femmes est souvent plus rapide et leur motivation plus pérenne.

D'autre part, des différences entre les groupes ethniques (caucasien, négroïde, mongoloïde et australoïde) peuvent exister, que ce soit en termes d'épaisseur, d'hydratation ou de composition lipidique (Rawlings 2006). Ainsi, les panélistes sélectionnées sont toutes

de type caucasien. De plus les propriétés de la peau évoluant avec l'âge (fermeté, épaisseur, hydratation ...), les panélistes recrutées sont toutes âgées entre 20 et 50 ans.

La particularité de cette étude est qu'elle a été réalisée *in vivo*, mais également sur modèles non-biologiques de peau. Seules la BS et la SFS ont été étudiées sensoriellement car la VS se déshydrate très rapidement et n'est donc pas adaptée. De plus, la VS n'est pas nettoyable et réutilisable comme peut l'être la BS, une très grande quantité de surface aurait donc été nécessaire pour réaliser une étude sensorielle.

Pour cette même raison, la SFS a été utilisée sans revêtement lipidique pendant les séances d'analyse sensorielle. De plus, un colorant couleur chair a été rajouté au matériau Dragonskin 20® (Silc Pig Chair, Pantone 488C, Création Silicone, Jouy-en-Josas, France) afin de rendre son aspect visuel plus proche de la peau *in vivo*, pour limiter l'influence de la couleur de la surface sur les perceptions des panélistes.

Les panélistes ont, lors d'une première séance d'entraînement d'environ 30 min, été familiarisées avec les surfaces modèles, afin de les habituer aux sensations perçues lors de l'application et après application de produits sur des surfaces autres que leur propre peau. Elles ont également réalisé une première évaluation des surfaces, avant application de produit. Les trois surfaces (la peau *in vivo*, la BS et la SFS) ont été comparées selon trois descripteurs : le collant, le rugueux et le brillant, dont les définitions et protocoles d'évaluation sont indiquées dans le tableau ci-dessous (Tableau 10).

Les surfaces ont été classées de 1 à 3, le 1 correspondant à la surface présentant l'intensité la plus faible pour le descripteur considéré, le 3 correspondant à la plus forte intensité, sans égalité possible. L'analyse statistique du test de classement par rang a été réalisée selon le test de Friedman, permettant de déterminer des différences statistiquement significatives entre la somme des rangs attribués à chaque surface pour chaque descripteur. Lorsque les différences entre les surfaces étaient significatives, un test de comparaison multiple, utilisant la correction de Bonferroni, était réalisé afin de définir des groupes de surfaces aux propriétés similaires.

Tableau 10. Définition et protocole d'évaluation des descripteurs utilisés pour comparer les surfaces avant application de produit

Descripteurs – Définition – Protocole d'évaluation
Rugueux : <i>« La rugosité d'une surface correspond à la présence de petites aspérités qui lui donnent un relief plus ou moins important. »</i> Passez votre doigt sur la surface en appliquant une légère pression. Répétez l'opération dans de multiples directions. Évaluez l'importance de ces aspérités

Collant :

« *Le collant désigne la force nécessaire pour décoller la tranche de la main de la surface* »

Appuyez fortement sur la surface avec la tranche de votre main. Relevez doucement la main et évaluez la force nécessaire pour la décoller.

Brillant :

« *Le brillant désigne la tendance de la surface à réfléchir la lumière. »*

Positionnez la surface et la lampe sur son socle. Placez la surface à 15cm et déplacez la horizontalement. Evaluer la quantité de lumière réfléchi par la surface

Une autre séance d'entraînement de 30 min a été réalisée afin de les familiariser avec le protocole d'évaluation et les produits référents, suivi de l'évaluation de 4 produits tests afin de vérifier leur fiabilité.

III.4. Conditions des tests et évaluation des produits

Les séances d'évaluation ont été réalisées dans le laboratoire d'analyse sensorielle de l'URCOM. Celui-ci est consisté de 16 cabines individuelles, en accord avec la norme NF EN ISO 8589. La température et le taux d'humidité sont maintenus constants, de façon à diminuer leurs variations entre les différentes séances d'évaluation et ainsi garantir une meilleure répétabilité des résultats. 21 panélistes ont participé à l'évaluation sensorielle des produits *in vivo* et 14 ont participé à l'évaluation sur surfaces non-biologiques.

Les 6 séances d'évaluation ont été réparties entre les surfaces à étudier (2 séances *in vivo*, 4 séances sur surfaces synthétiques). Durant chaque séance d'environ 30 min, 5 produits ont été évalués sur une surface donnée. Ceux-ci étaient présentés de façon aléatoire et anonyme, dans des pots de 5 mL à température ambiante et codés à l'aide d'un nombre à trois chiffres, pour réduire le biais dans les évaluations. Les panélistes avaient à leur disposition du gel hydro alcoolique pour se nettoyer les mains et les avant-bras, du papier absorbant, de l'eau et du démaquillant. Les produits référents étaient également disponibles, pour que les panélistes puissent les tester à nouveau autant de fois que nécessaire afin d'évaluer de façon précise les produits (Tableau 9). Au vu du nombre de panélistes suffisamment important, une seule répétition par produit a été réalisée.

IV. Conclusion du chapitre

En conclusion, ce chapitre présente l'ensemble des méthodes utilisées pour caractériser l'état de surface de la peau et le film résiduel de produits cosmétiques. Diverses méthodes instrumentales ont été mises au point et adaptées à chaque modèle d'étude. Ces caractérisations chimique, physico-chimique et physiologique ont été complétées par une caractérisation sensorielle de la surface de la peau après application de produits. Grâce à ces protocoles et instruments, des nouvelles méthodologies d'étude ont été définies et seront décrites dans la partie 3 de ce manuscrit.

Chapitre 3 – Etude de polluants atmosphériques

Ce chapitre sera consacré, comme son nom l'indique, à la description des protocoles utilisés dans le cadre de l'étude de l'effet des polluants atmosphériques sur la surface de la peau. Trois principaux protocoles seront décrits : le protocole utilisé pour l'exposition des explants de peau humaine, réalisé au laboratoire BIO-EC ; le protocole utilisé pour étudier l'impact de polluants sur les lipides cutanés, utilisant le modèle non-biologique SFS ; le protocole d'étude des propriétés anti-adhésion de particules de divers produits cosmétiques, utilisé sur modèles SFS et BS et *in vivo*.

I. Protocole d'exposition *ex vivo*

Le protocole d'exposition aux polluants *ex vivo* utilisé a été développé par le laboratoire BIO-EC. Cette exposition nécessite un outil spécifiquement développé au cours du projet : la Pollubox® (Lati 2016). Cet outil permet d'exposer des explants de peau humaine à différents polluants atmosphériques (métaux lourds, HAPs, particules de diesel, fumée de cigarette, ozone ...) en diffusant un nuage de polluants à l'intérieur d'une enceinte close (Figure 25). La Pollubox® permet de reproduire un contact naturel et réaliste entre les polluants et la peau humaine. Le milieu de culture des explants est protégé afin d'empêcher toute contamination systémique de la peau. Seules leurs surfaces sont donc soumises au stress polluants.

Cet outil est modulable et permet d'exposer les explants soit par nébulisation à une solution de polluants, soit par injection de gaz et aérosols (fumée de cigarette grâce à une « smoking machine » ou ozone grâce à un générateur) (Lati 2016; Percoco and Eudier 2018).

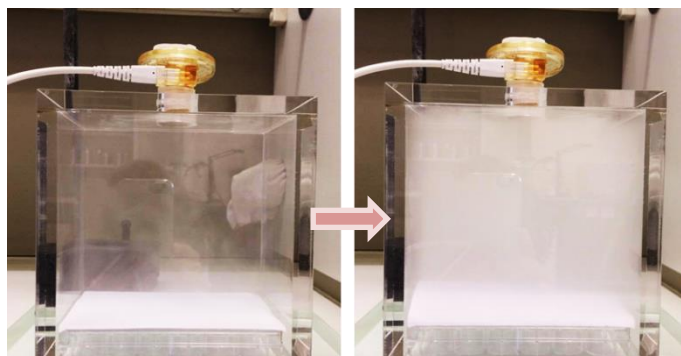


Figure 25. Génération d'un nuage de pollution au sein de la Pollubox® par nébulisation d'une solution de polluants, injection de fumée principale de cigarette ou génération d'ozone

Les protocoles d'exposition ont été développés et validés au cours du projet Urbaskin. Dans le cas de la présente étude de surface, les différents polluants cités précédemment ont

été testés. Les résultats présentés concerneront l'exposition des explants à la fumée de cigarette, dont l'effet surfacique est le plus significatif.

Ainsi, les explants à analyser ont été traités par la fumée de cigarette à J3 (3 jours après leur préparation) (Figure 12) puis envoyés au laboratoire URCOM à J4 et analysés à J5, grâce aux techniques instrumentales décrites précédemment. Les échantillons sont soumis à la fumée de 2 cigarettes Marlboro classiques et sont gardés dans la Pollubox® pendant 2h avant d'être remis à l'incubateur. Les explants témoins, non exposés aux polluants, sont également placés 2h dans la Pollubox®, sans subir de traitement.

II. Vieillessement du squalène en présence de polluants

Afin de comprendre les phénomènes mis en jeu lors de l'exposition *ex vivo* à la fumée de cigarette, une étude a été réalisée sur le modèle non-biologique SFS présenté précédemment. L'objectif de cette étude a été de mettre en évidence d'une part l'impact de divers polluants de la fumée de cigarette sur l'oxydation des lipides, et d'autre part d'évaluer et expliquer les conséquences de cette oxydation sur la physico-chimie de surface de la peau.

Le squalène, un important lipide de la famille des triterpènes de formule brute $C_{30}H_{50}$, présent dans le sébum et les lipides épidermiques, a été choisi comme lipide modèle car il est facilement oxydable, en raison de ses nombreuses insaturations (Pham et al. 2015) (Figure 26).

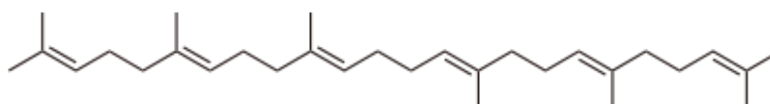


Figure 26. Structure chimique du squalène de formule $C_{30}H_{50}$

Ainsi, la mise en évidence de l'impact des polluants sur l'oxydation lipidique sera facilitée par l'utilisation de ce lipide. De plus, ses principaux produits d'oxydation, les peroxydes de squalène, contribuent à certaines modifications physiologiques : ils sont notamment impliqués dans la formation des comédons (Chiba et al. 2000; Pham et al. 2015). Le suivi du vieillissement de ce lipide en présence de polluants est donc pertinent et apportera de nouvelles informations pour répondre aux objectifs du projet UrbaSkin.

Deux catégories de polluants ont été sélectionnées pour cette étude : les HAP et les métaux lourds. Ainsi, trois composés modèles ont été utilisés : du benzo(a)pyrène (B(a)P) (>96% de pureté, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri) qui appartient à la famille des HAPs, du plomb et du nickel (poudre de plomb >99.95% de pureté et nickel >99% de pureté,

Sigma-Aldrich), connus pour leur toxicité et présents dans la fumée de cigarette (Borgerding and Klus 2005). Le choix de ces polluants permet de modéliser de façon simple certaines familles de composés contenus dans la fumée de cigarette. Ils font également partie des polluants atmosphériques primaires réglementés et fréquemment présents dans l'atmosphère. Ils sont donc pertinents pour modéliser la pollution atmosphérique de façon plus générale.

II.1. Conditions d'exposition

Plusieurs solutions de squalène avec ou sans polluants ont été préparées et laissées vieillir sous différentes conditions. L'objectif était de définir des conditions de vieillissement suffisamment douces pour ne pas trop altérer la qualité du squalène vieilli seul, tout en étant suffisantes pour mettre en évidence l'effet des polluants sur l'oxydation du squalène. Les différentes conditions d'exposition sont regroupées ci-dessous (Tableau 11). Deux conditions de vieillissement ont été choisies : le vieillissement à température ambiante (TA) sous lumière du jour pendant 45 jours (noté L) et le vieillissement en température à l'étuve (60°C) à l'obscurité pendant 15 jours (noté E). La validation de l'une ou l'autre de ces conditions sera discutée dans la partie 3 de ce manuscrit.

Tableau 11. Conditions de vieillissement du squalène et mélanges étudiés

Conditions	Nom	Composition des mélanges
TA + lumière du jour	S1L (témoin)	Squalène 0,5 g
TA + lumière du jour	S2L	Squalène 0,5 g + B(a)P 10 mg
TA + lumière du jour	S3L	Squalène 0,5 g + Pb 10 mg + Ni 10 mg
60°C + obscurité	S1E (témoin)	Squalène 0,5 g
60°C + obscurité	S2E	Squalène 0,5 g + B(a)P 10 mg
60°C + obscurité	S3E	Squalène 0,5 g + Pb 10 mg + Ni 10 mg

Toutes les solutions ont été préparées dans des flacons de 22 mL scellés avec un septum en Teflon®, agités à l'aide d'un agitateur magnétique à 400 rpm/min pour les conditions (L) et agités mécaniquement dans les conditions (E).

II.2. Méthodes d'analyse

Analyse chimique

Pour analyser la qualité du squalène et son niveau d'oxydation, deux méthodes ont été utilisées : la résonance magnétique nucléaire (RMN) ¹H et la chromatographie liquide à ultra-haute pression couplée à la spectrométrie de masse.

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés pour chaque mélange après 45 jours de vieillissement pour les conditions (L) et après 15 jours pour les conditions (E), en diluant les solutions dans du chloroforme deutéré CDCl_3 .

La chromatographie liquide à ultra-haute pression couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS : Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy) a été la méthode d'analyse chimique principale de cette étude de vieillissement. Elle a été utilisée pour analyser la qualité du squalène après 15, 30 et 45 jours de vieillissement dans les conditions (L) et après 15 jours de vieillissement dans les conditions (E).

La chromatographie liquide à ultra-haute pression (UHPLC) est une méthode séparative qui repose sur la séparation des composés d'un mélange complexe en fonction de leur affinité (chimique ou physique) pour un mélange de solvants (phase liquide mobile) et pour une phase stationnaire solide (colonne chromatographique). Elle se compose donc, de façon simplifiée, d'un injecteur, d'une colonne séparatrice et d'un détecteur. Chaque composé est caractérisé par un temps de rétention qui correspond au temps nécessaire pour que la molécule soit détectée en sortie de colonne chromatographique : plus le temps de rétention est long, plus l'affinité du composé avec la phase stationnaire est grande et/ou son affinité avec la phase mobile est faible et inversement. Dans le cas d'une analyse LC-MS, le spectromètre de masse joue le rôle de détecteur.

La spectrométrie de masse repose sur la détermination de la masse de composés d'un mélange grâce à leur rapport m/z (masse/charge). Pour cela, les espèces à analyser doivent être ionisées, grâce à une source d'ionisation. Une fois ionisés, les analytes sont séparés par un analyseur, en fonction de ce rapport m/z . Un détecteur permet alors de déterminer ce rapport m/z et d'identifier les formules brutes des molécules en présence.

Les éléments essentiels de la technique LC-MS sont regroupés ci-dessous (Figure 27). Les échantillons à analyser ont été préparés comme suit : 7 mg de chaque mélange ont été dissouts dans 1 mL d'un mix de solvants dichlorométhane / acétonitrile 1:1 (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France, de grade Optima© de très haute pureté). Les solutions obtenues ont ensuite été filtrées grâce à une membrane PTFE de 0,22 μm de porosité (Fisher Scientific SAS).

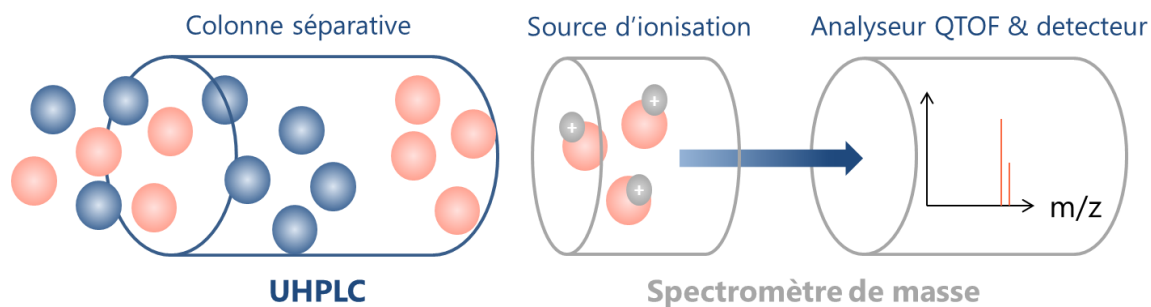


Figure 27. Principaux éléments constituant l'appareillage LC-MS

La séparation des analytes a été réalisée grâce à l'appareil UHPLC Agilent serie 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Allemagne), contrôlé par le logiciel Agilent MassHunter (pour l'acquisition et l'analyse des données). 5 μL de chaque échantillon ont été introduits dans une colonne séparative de type Poroshell 120 EC-C18 (Agilent Technologies) de dimensions 2,1 x 55 mm, de taille de particules de 2,7 μm . Les échantillons ont été analysés 2 fois afin de répéter et confirmer les spectres et chromatogrammes obtenus. La phase mobile utilisée était constituée d'eau ultrapure traitée par UV (résistivité de 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ à 25°C), d'acétonitrile et d'acide formique tous deux de grade Optima© (Fisher Scientific SAS). Le mélange eau/acétonitrile dopé avec 0,1% d'acide formique a été maintenu à un débit de 0,4 mL/min. Un ratio eau/acétonitrile 50:50 a été utilisé de 0 à 5 min, puis ce ratio était augmenté pour atteindre 0:100 après 8 min d'analyse. Ce ratio était ensuite maintenu jusqu'à 17 min, correspondant au temps total de l'analyse (Mountfort et al. 2007).

La détection des analytes par spectrométrie de masse a été réalisée sur un spectromètre Agilent Q-ToF 6530 (Agilent Technologies) piloté par le même logiciel Agilent MassHunter. Les échantillons étaient introduits dans la source d'ionisation directement via le flux sortant de la colonne séparative. L'ionisation a été réalisée par une source APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) en mode ions positifs. Cette source permet de générer les composés mono-chargés avec des adduits H^+ , Na^+ , K^+ ou NH_4^+ , de faible masse moléculaire et présentant une polarité moyenne telles que celle caractéristique du squalène et de ses dérivés. Après optimisation, les conditions d'analyse ont été définies comme suit :

- Température du gaz de vaporisation (N_2) : 500°C
- Température du gaz séchant (N_2) : 325°C
- Débit du gaz séchant : 8 L/min sous 35 psi
- Intensité de l'aiguille de décharge Corona : 4 μA
- Tension du capillaire : 1900 V
- Potentiel de fragmentation : 160 V

Les acquisitions ont été réalisées entre 50 et 1700 m/z. L'analyseur utilisé est un analyseur à temps de vol opérant à une résolution d'environ 20 000 m/z.

Afin de déterminer la composition chimique des composés présents dans les échantillons analysés, l'algorithme du logiciel Agilent MassHunter a été utilisé. Celui-ci permet de générer les formules brutes des composés en fonction des critères suivants :

- Pic de masse de plus de 5000 occurrences
- Formule contenant 30 atomes de carbone
- Formule contenant entre 0 et 62 atomes d'hydrogène
- Formule contenant entre 0 et 30 atomes d'oxygène
- Formule contenant entre 0 et 30 atomes d'azote
- Formule ayant un score MGF (Mascot Generic Format) d'au moins 50
- Composition vraisemblable

Le choix a été fait de se focaliser sur les dérivés peroxydés du squalène, de formule brute $C_{30}H_xO_y$ car ce sont les premiers produits d'oxydation du squalène. Ainsi, les peroxydes de squalène sont des marqueurs pertinents de l'oxydation lipidique (Nakagawa et al. 2007; Mountfort et al. 2007; Pham et al. 2015). De plus, ce sont ces composés qui sont impliqués dans la comédogénèse. Certains composés oxydés pourraient présenter une chaîne carbonée plus courte, mais seraient plus volatils et auraient donc moins d'impact sur la surface de la peau. Des composés de chaînes plus longues seraient issus de l'étape de terminaison du processus d'oxydation du squalène, et seraient donc observés dans une moindre mesure.

Analyse physico-chimique

Afin de déterminer l'impact du vieillissement du squalène sur la physico-chimie de surface de la peau, le modèle SFS a été utilisé. Le revêtement lipidique décrit précédemment a été remplacé par les mélanges décrits dans le Tableau 11 (même protocole de dépôt, réalisé à température ambiante), après 45 jours de vieillissement pour les conditions (L) et après 15 jours pour les conditions (E). Les surfaces ainsi préparées ont été analysées par mesure de l'angle de contact afin de déterminer leur énergie libre de surface.

III. Protocole d'évaluation de l'adhésion de particules sur la peau

L'objectif final de ce projet était de développer de nouveaux produits cosmétiques, capables de protéger la peau de la pollution, grâce à des effets curatifs ou préventifs. Les approches curatives vont avoir pour objectif de réduire les conséquences des effets des

polluants observées grâce aux protocoles précédents, via notamment le piégeage des radicaux libres et la détoxification. Les approches préventives vont, elles, avoir pour objectif de réduire le contact entre la peau et les polluants, grâce notamment à la formation d'un film protecteur à sa surface. Ce film aura un rôle de barrière, essentiellement liée à un effet anti-adhésion de particules (Garaud et al. 2015). L'une des approches développées durant ces travaux de thèse a consisté à évaluer les propriétés anti-adhésion de particules de certains produits cosmétiques et de comprendre pourquoi certains produits limitent cette adhésion tandis que d'autres vont augmenter l'adhésion des particules.

Ainsi, pour répondre à cette problématique, il a été nécessaire dans un premier temps de sélectionner des particules modèles, imitant les particules polluantes. Ensuite, un protocole d'exposition aux particules ainsi qu'un protocole d'évaluation d'efficacité anti-adhésion ont été mis au point et sont présentés dans les paragraphes ci-dessous.

III.1. Choix des particules et caractérisation

Le choix des particules modèles a été réalisé selon les critères suivants :

- Granulométrie proche de celle de particules de diesel modèles (particules 1650, NIST, Maryland, Etats-Unis) représentant des particules polluantes présentes dans l'atmosphère
- Caractéristiques hydrophile / hydrophobe variées
- Compatibilité cutanée permettant de réaliser des tests *in vivo*.

Ainsi, les particules ont été sélectionnées parmi des pigments de grade cosmétique, utilisés pour colorer des formulations, qui sont donc non toxiques pour la peau humaine. Ces particules ont été choisies de couleur noire afin d'avoir un bon contraste entre les particules et la couleur de la peau ou des surfaces modèles, rendant les analyses visuelle, microscopique ou colorimétrique plus aisées.

Les deux particules sélectionnées sont les suivantes :

- Pigments Unipure Black LC 989 EM (Sensient Technologies, Wisconsin, Etats-Unis) (notés Pigments 1)
- Pigments W9814 Covasil 305 (Sensient Technologies, Wisconsin, Etats-Unis) (notés Pigments 2)

Ces pigments ont été caractérisés par granulométrie laser (Figure 28) et par mesure de l'angle de contact afin de déterminer leur énergie libre de surface. Avant utilisation, ces pigments ont été tamisés grâce à un tamis de taille de maille de 0,160 μm , afin de diminuer la taille des agrégats.

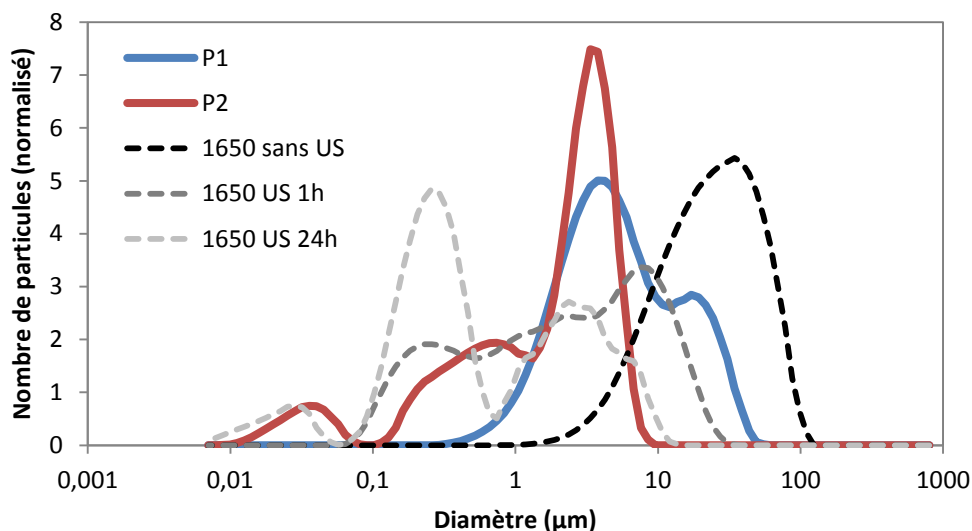


Figure 28. Granulométrie (répartition en volume) des particules modèles pigments 1 et pigments 2 après tamisage, en comparaison avec les particules de diesel 1650 de référence (sans ultrasons (US), après 1h d'ultrasons et après 24h d'ultrasons)

Les caractérisations granulométriques ont été réalisées grâce à un diffractomètre laser SALD 7500 Nano (laser de 405 nm, Shimadzu, Kyoto, Japon) avec une cellule de mesure SALD BC 75 de 7 mL sous agitation mécanique. Les particules 1 ont été diluées dans de l'eau ultrapure et les particules 2 ont été diluées dans de l'isohexadecane. Les particules de référence 1650 ont, elles, été diluées dans un mélange eau/éthanol 80 :20 et analysées sous différentes conditions : directement après dilution, après 1h aux ultrasons et après 24h aux ultrasons, ce qui permet de désagréger les particules. Les indices de réfractations des particules ont été fixés comme suit : 2,20 – 0,05i pour les pigments 1 ; 1,35 – 0,02i pour les pigments 2 et 1,50 -0,10i, en fonction de leurs caractéristiques chimiques.

Comme observé sur la Figure 28, les granulométries des pigments 1 et 2 sont très similaires à celle des particules 1650 après 1h et/ou 24h aux ultrasons. Globalement, les tailles des particules modèles sont donc cohérentes et modélisent de façon pertinente des particules de pollution atmosphérique.

Afin de déterminer l'énergie de surface de ces particules, celles-ci ont été compactées sous forme de pastilles solides. Ces pastilles ont été préparées à partir de 150 mg de particules compactées sous 5 tonnes à l'aide d'une presse hydraulique. Les pastilles ainsi obtenues présentaient une surface lisse et homogène permettant de réaliser des mesures de l'angle de contact avec les trois liquides de référence, comme décrit dans le chapitre 2, I. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 29. Les particules 1 possèdent une énergie de surface plus élevée que les pigments 2 et possèdent un caractère monopolaire basique très marqué, les rendant hydrophiles ($\theta_{\text{eau}} = 49,8 \pm 5,1^\circ$). Les pigments 2 sont des particules hydrophobes ($\theta_{\text{eau}} = 109,1 \pm 5,7^\circ$) d'assez faible énergie de surface.

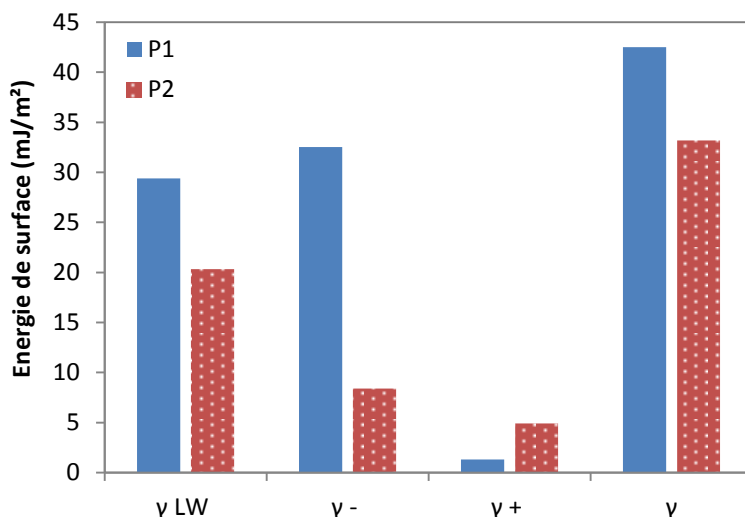


Figure 29. Energie libre de surface et ses composantes calculées pour les particules 1 et 2

Les différences notables entre les caractéristiques physico-chimiques des deux particules modèles permettront d'évaluer l'impact du type de particules sur leurs propriétés d'adhésion.

III.2. Protocole d'exposition et d'analyse

Surfaces d'études

Différentes surfaces ont été utilisées afin d'évaluer l'efficacité anti-adhésion de particules de produits cosmétiques : les modèles non-biologiques SFS et BS décrits précédemment et la peau *in vivo*, afin de s'assurer que les surfaces modèles reproduisent de façon cohérente l'adhésion des particules *in vivo*.

Les deux surfaces SFS et BS ont été utilisées car leur microrelief est le plus proche de la peau *in vivo*, ce qui permettra de mieux reproduire l'adhésion des particules. De plus, elles étaient plus facilement utilisables que la VS, qui se déshydrate très rapidement et perd donc ses propriétés de surface intéressantes après quelques minutes.

Produits étudiés

Les produits cosmétiques étudiés sont les mêmes que ceux décrits dans le chapitre 2, III, dont le film résiduel a été caractérisé d'un point de vue sensoriel et physico-chimique. Ceux-ci sont appliqués suivant le même protocole que celui décrit dans le chapitre 2, I.

L'analyse de l'effet anti-adhésion de particules a été réalisée 3 min et 1h après application.

Protocole d'exposition

Après optimisation, le protocole a été défini comme suit : les surfaces à étudier sont recouvertes de particules modèles à l'aide d'une spatule, sans contact, afin de ne pas induire une adhésion par application d'une pression supplémentaire sur la surface (Figure 30). 50 secondes après le dépôt des particules, la surface est placée à la verticale à 30 cm d'une arrivée d'air. Un jet d'air ponctuel (< 1sec) à une pression de 1,5 bar permet d'éliminer les particules non adhérentes de la surface.



Figure 30. Protocole d'exposition aux particules modèles

Protocoles d'analyse de l'efficacité anti-adhésion

Le protocole d'analyse permettant de déterminer la quantité de particules adhérentes sur la surface a dû être adapté à chaque surface.

Pour la surface SFS, la mesure de la quantité de particules adhérentes a été réalisée par microscopie optique et analyse d'image. Les surfaces traitées par les pigments sont observées au microscope optique en transmission, au grossissement x50, en lumière non polarisée. 3 images par surface sont enregistrées. Le logiciel d'analyse d'image ImageJ (NIH, Maryland, Etats-Unis) permet ensuite de calculer le pourcentage de surface recouverte par les pigments, indiquant ainsi un pourcentage d'adhésion (noté %AP) (Figure 31).

La surface BS n'étant pas transparente et ne réfléchissant pas la lumière, la mesure par microscopie optique (en transmission ou réflexion) n'était pas réalisable. Ainsi, pour déterminer la quantité de particules adhérentes, un Skin-Colorimeter® (Monaderm, Monaco, France), relié au logiciel CK_Multi Probe, a été utilisé. Le pourcentage %AP est cette fois-ci calculé à partir de la différence de couleur de la surface avant/après traitement par les pigments, mesurée dans le système colorimétrique RVB. Trois mesures sont réalisées par surface traitée. Le calcul du %AP est réalisé de la manière suivante :

$$\%AP = \frac{(R + V + B)_{avant} - (R + V + B)_{après}}{(R + V + B)_{avant}}$$

Où R, V et B correspondent aux coordonnées de la surface dans le système R, V, B.

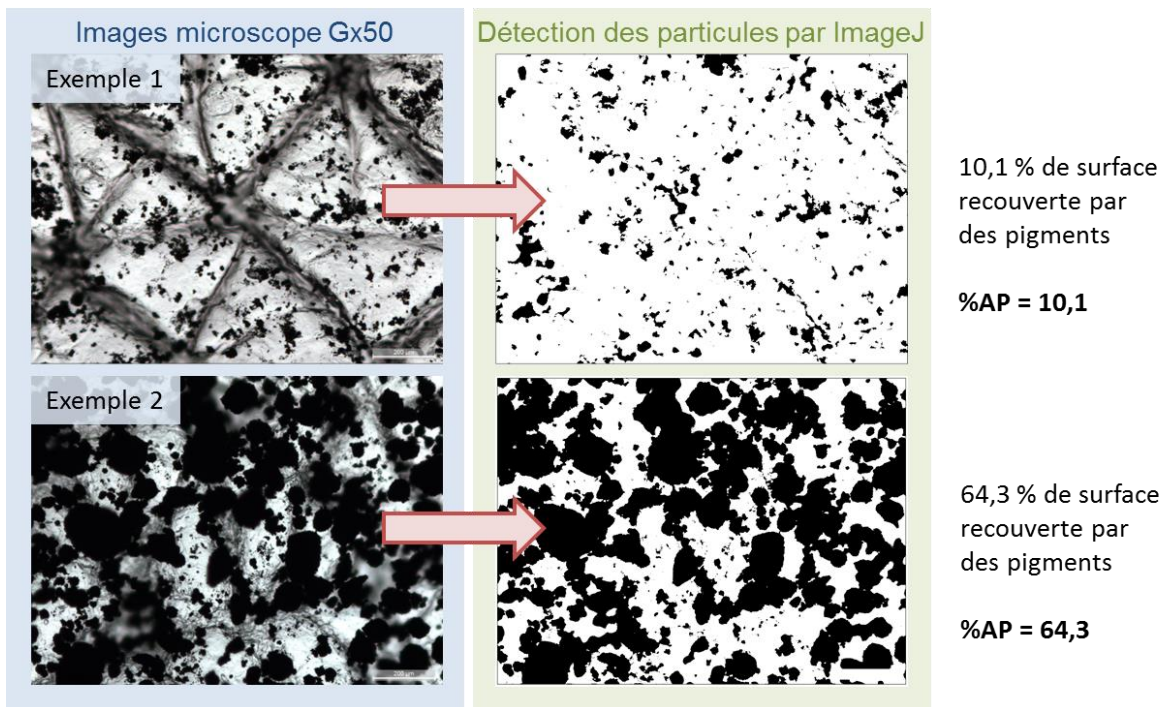


Figure 31. Exemples d'analyse d'image réalisée à l'aide d'ImageJ

Enfin, l'adhésion des pigments *in vivo* a été évaluée de façon visuelle, à partir de photographies.

Cette étude permettra ainsi de définir des pistes pour expliquer pourquoi certains produits cosmétiques présentent des propriétés anti-adhésion de particules, à partir de l'analyse de leur film résiduel. Cela sera également un moyen de mettre en évidence les différences qui peuvent exister entre différents types de particules.

IV. Conclusion du chapitre

Ce chapitre présente les trois protocoles utilisés pour l'exposition de nos modèles d'études aux polluants atmosphériques. Un premier protocole développé par BIO-EC a été présenté. Celui-ci a permis de mettre en évidence l'impact de la fumée de cigarette sur les explants de peau humaine. Le second protocole présenté a permis d'étudier l'impact de polluants modèles sur l'oxydation d'un lipide particulier, le squalène, et les conséquences de cette oxydation sur la physico-chimie de surface de la peau. Cette étude a permis de comprendre les phénomènes observés *ex vivo*, comme décrit dans la partie 3 de ce manuscrit. Enfin, le troisième protocole présenté a permis d'étudier l'effet anti-adhésion de particules de produits cosmétiques. Il sera utile afin de mieux appréhender les liens pouvant exister entre les propriétés résiduelles des produits et leurs propriétés barrière anti-pollution.

Chapitre 4 – Outils statistiques

Différents outils statistiques ont été utilisés pour analyser l'ensemble des données récoltées, issues d'analyses instrumentales ou sensorielles. Les moyennes exprimées ont toutes été calculées à partir d'au moins 3 mesures, accompagnées de leur écart-types.

Les analyses présentées ci-dessous ont été réalisées grâce au logiciel XLSTAT (version 2012.1.01) (Addinsoft, Paris, France).

I. Analyse de la variance (ANOVA)

L'analyse de la variance ou ANOVA (ANalysis Of VAriance) est une méthode unidimensionnelle d'analyse de données, utilisée pour comparer un ensemble de plus de deux moyennes, en identifiant les sources de variations pouvant exister entre ces moyennes. Elle permet notamment d'évaluer l'effet d'un facteur ou d'une variable qualitative (exemple : l'effet traitement par un polluant ou l'effet temps pour les études instrumentales ; l'effet produit ou juge pour les études sensorielles) sur une variable quantitative (exemple : l'énergie de surface, le %AP ou la note en analyse sensorielle). L'ANOVA permet ainsi de déterminer si un paramètre qualitatif de l'expérience influence de façon significative le résultat quantitatif obtenu (Gilbert 2012). L'ANOVA permet également de former des groupes de produits ou échantillons qui présentent des propriétés statistiquement similaires. Ces groupes sont formés grâce au test de comparaison multiple de Tukey. La significativité de la différence entre deux groupes d'échantillons sera indiquée par * si la p-value (probabilité que « l'hypothèse nulle » soit vraie, c'est-à-dire que les échantillons ne soient pas différents) est inférieure à 0,05. Si $p < 0,01$, la différence sera notée **, si $p < 0,001$, la différence sera notée ***. Plus la valeur de p est faible plus les différences observées entre les groupes sont statistiquement significatives.

Cette technique a été essentiellement utilisée lors de l'analyse de la surface des explants ou des modèles non-biologiques, pour évaluer si l'effet d'un traitement (par les polluants ou par un produit cosmétique) sur un paramètre surfacique est significatif. L'ANOVA est également beaucoup utilisée en analyse sensorielle pour étudier l'effet juge, l'effet produit ou l'effet juge x produit. Elle permet de vérifier si les produits sont statistiquement différents selon le descripteur considéré et de valider la performance des juges.

II. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) est une analyse multidimensionnelle permettant de représenter de façon simple un ensemble de données caractérisé par plus de deux variables quantitatives.

Un ensemble de données caractérisé par 2 variables quantitatives peut être facilement représenté sur un graphique à deux dimensions dont chaque axe représente une variable. Mais lorsque ce nombre de données p devient supérieur à 3, il n'est pas possible de représenter ce « nuage » de point à p dimensions. Ainsi, l'ACP consiste à construire un nouveau système à 2 dimensions grâce à deux nouvelles variables F1 et F2 par projection des p variables initiales. Ces deux variables F1 et F2, appelées composantes principales, sont donc des combinaisons linéaires des p variables quantitatives, calculées de façon à conserver le maximum d'informations.

L'ACP permet ainsi de construire des graphiques en 2 dimensions représentant l'ensemble des échantillons caractérisés par les p variables (Figure 32).

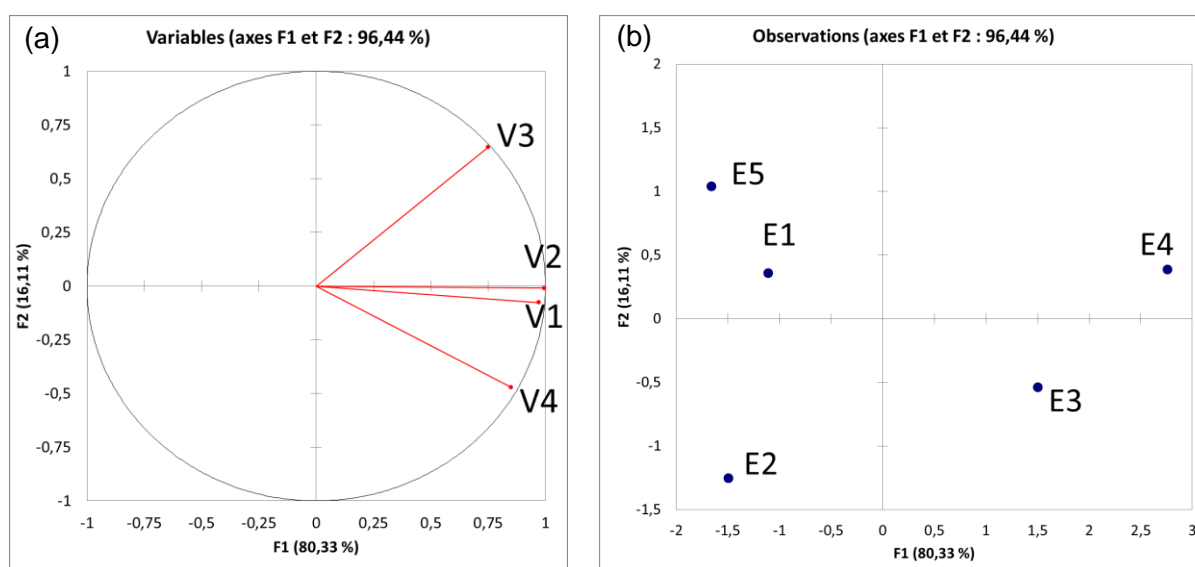


Figure 32. Exemple de projection obtenue par ACP : (a) représentation de 4 variables V_i dans le système d'axes F1 et F2 (b) représentation de 5 échantillons E_i dans ce nouveau système d'axes

Sur cette Figure 32, la projection obtenue représente 96,44% de l'information initiale, ce qui en fait une bonne représentation des échantillons. Cette projection permet de définir des groupes aux propriétés similaires : les échantillons E1 et E5 sont proches et possèdent donc des propriétés voisines, contrairement aux échantillons E2 ou E4 par exemple. Enfin, cela permet également de mettre en évidence des liens entre les 4 variables. Dans le cas présenté, les variables V1 et V2 sont représentées avec un angle très faible, ce qui signifie qu'elles sont corrélées. Les variables V3 et V4 présentant un angle plus important n'ont pas de lien particulier.

Cette technique d'analyse statistique s'avère donc très utile pour représenter les produits analysés en fonction de différentes caractérisations réalisées, afin de mettre en évidence des liens entre les variables ou entre les produits.

III. Etablissement de corrélation et de modèles prédictifs

Différents outils permettent de mettre en évidence des corrélations entre variables. Ceux-ci seront très utiles pour déterminer quel paramètre surfacique influence l'adhésion des particules ou la perception sensorielle par exemple.

Différentes méthodes de modélisation ont été utilisées afin de définir le modèle le plus adapté : la régression linéaire simple entre variables linéaires, logarithmiques ou semi-logarithmiques ; la régression linéaire multiple pas à pas ou la régression Partial Least Square (PLS).

La régression linéaire simple consiste à définir simplement une relation affine entre une variable explicative x et une variable y :

$$y = a_0 + a_1x + \varepsilon$$

Où ε représente l'erreur résiduelle du modèle, a_1 et a_0 les paramètres du modèle calculé de façon à minimiser ε . La qualité de la régression est évaluée grâce au calcul du coefficient de détermination r^2 , représentant le rapport entre la variance expliquée par le modèle et la variance totale (Gilbert 2012).

La régression linéaire multiple pas à pas est simplement une généralisation de la régression linéaire simple, pour laquelle plusieurs variables explicatives x_1, x_2, \dots sont utilisées :

$$y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_px_p + \varepsilon$$

Dans le cas de la régression linéaire multiple, la qualité du modèle sera évaluée par le coefficient de détermination ajusté $r^2_{\text{ajusté}}$. En effet, plus on utilise de variables explicatives plus le r^2 a tendance à augmenter, même si les variables sont aléatoires. Ainsi, le $r^2_{\text{ajusté}}$ tient compte du nombre de variables utilisées et est donc plus représentatif de la qualité du modèle :

$$r^2_{\text{ajusté}} = 1 - \frac{n-1}{n-p-1}(1 - r^2)$$

Où n est le nombre d'échantillons et p le nombre de variables explicatives.

Enfin, la régression PLS est une régression multifactorielle, couramment utilisée pour relier des mesures instrumentales avec des mesures sensorielles (Gilbert 2012). Elle permet de déterminer les combinaisons linéaires optimales entre les variables x_i pour décrire au mieux la variable y . Il s'agit d'une méthode itérative qui utilise à la fois le principe de la

régression linéaire et le principe de l'ACP pour rechercher des composantes servant à exprimer y en fonction des x_i. Elle permet ainsi de modéliser des variables plus complexes. Néanmoins, elle nécessite une sélection au préalable des données contrairement à la régression linéaire multiple, car elle utilise l'ensemble de variables sélectionnées pour calculer les nouvelles composantes. La régression linéaire multiple quant à elle n'utilise que les variables diminuant l'erreur résiduelle, grâce à son principe d'introduction des variables pas à pas dans la régression.

Une fois le modèle mis au point par régression, il est possible d'étudier son pouvoir prédictif et donc sa robustesse grâce à une méthode de validation croisée à k segments. Pour cela, nous avons choisi de diviser le jeu de données utilisé dans la mise au point du modèle deux groupes : un groupe de calibration et un groupe de validation (Figure 33). Ces deux groupes, correspondant à un segment, sont utilisés pour calculer le coefficient de détermination de calibration, le RMCE de calibration (écart-type résiduel de calibration) et le RMCE de validation, défini par la relation suivante :

$$RMCE_{val} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n_{val}}}$$

Où y est la variable de validation à prédire, \hat{y} la variable prédite par le modèle de calibration et n_{val} le nombre d'observations présentes dans le groupe de validation.

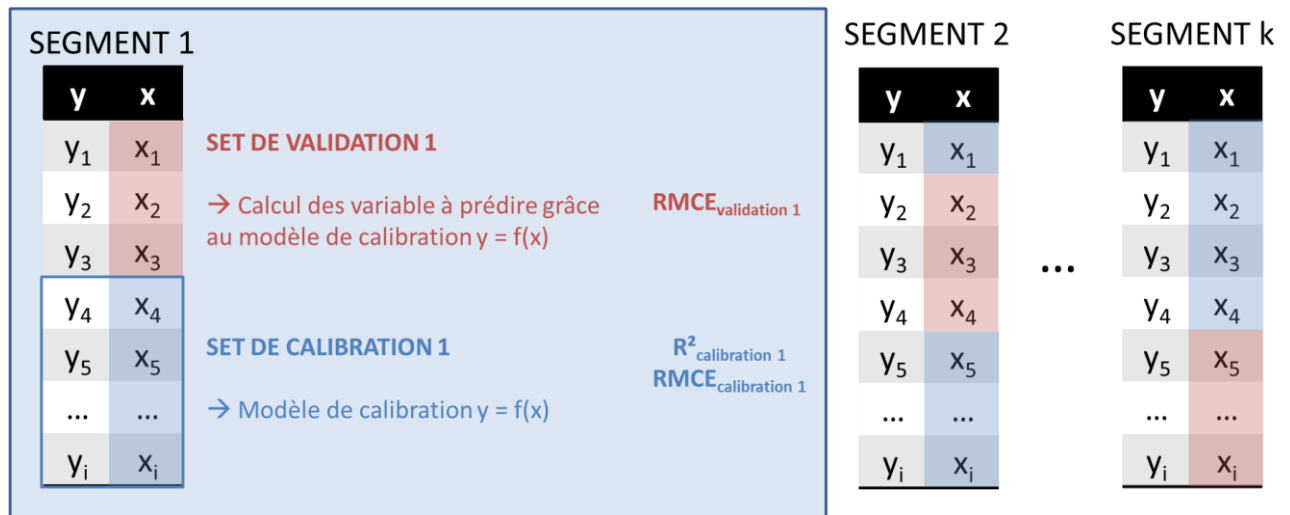


Figure 33. Illustration de la validation croisée à k segments

Cette opération est réalisée k fois, de façon à ce que toutes les variables soient utilisées au moins une fois dans le groupe de calibration et de validation. Le RPD (Ratio of Prediction to Deviation) est alors calculé à l'issue de cette validation croisée à k segments. Il est défini par la relation suivante :

$$RPD = \frac{ET}{\overline{RMCE_{val}}}$$

Où ET correspond à l'écart-type obtenu sur l'ensemble du modèle à valider et $\overline{RMCE_{val}}$ est la moyenne des $RMCE_{val}$ calculée sur les k segments.

La valeur de ce RPD permet de déterminer la robustesse du modèle et sa capacité prédictive. Si le RPD est inférieur à 2,5 le modèle n'est pas suffisamment fiable pour être retenu. Si le RPD est compris entre 2,5 et 3, le modèle est un bon modèle prédictif et si le RPD est supérieur à 3, le modèle est considéré comme excellent (Cozzolino et al. 2004; François et al. 2008; Gilbert et al. 2013).

Conclusion

Dans cette deuxième partie de manuscrit, les différents matériels et méthodes utilisés au cours de ce projet ont été recensés. Dans un premier temps, les modèles d'études sélectionnés ont été présentés. Leur utilisation permettra de répondre aux différentes problématiques présentées dans le chapitre 3 de la partie 1.

Ces modèles seront entièrement caractérisés grâce aux méthodes instrumentales et sensorielles mises au point et décrites dans le chapitre 2 de cette deuxième partie. Puis l'effet des polluants sera mis en évidence grâce aux protocoles d'exposition définis précédemment. L'ensemble de ces méthodes permettra d'évaluer et comprendre l'impact des polluants sur les propriétés de surface de la peau telles que son énergie libre, sa composition chimique, sa fonction barrière ou encore son pH.

Grâce à l'apport de connaissances nouvelles issues de ces nouvelles méthodologies, de nouveaux produits cosmétiques pourront être développés afin de protéger la peau des effets néfastes de la pollution. Il s'agit là d'un des enjeux majeurs du projet au plan fondamental bien entendu, mais également pour les partenaires industriels du projet Urbaskin intéressés à développer de nouveaux actifs et produits permettant de mieux lutter contre les effets de la pollution sur la peau humaine. Pour cela, il sera essentiel de comprendre comment un produit peut agir en surface de la peau et modifier ses propriétés. Notamment, grâce au protocole d'étude de l'effet anti-pollution développé, il sera possible de comprendre comment un produit peut diminuer l'adhésion de particules similaires aux particules de pollution.

L'ensemble des résultats obtenus grâce à ces matériels et méthodes sera détaillé dans la troisième et dernière partie de ce manuscrit de thèse.

PARTIE 3 – Résultats et discussion

Introduction

La troisième et dernière partie de ce manuscrit a pour objectif de retranscrire et de discuter l'ensemble des résultats obtenus durant ces trois années de thèse. Des réponses aux différentes questions soulevées par la synthèse bibliographique seront apportées, de nouvelles méthodologies d'étude seront présentées, et les apports de ces travaux de thèse dans la réponse aux objectifs du projet Urbaskin seront soulignés. La restitution de ces travaux sera présentée en trois chapitres, chacun s'appuyant sur une publication scientifique acceptée ou soumise.

Le premier chapitre aura pour objectif de présenter le développement et la caractérisation du modèle non-biologique de peau Surfaskin (SFS), spécifiquement développé pour le projet Urbaskin. Il exposera en quoi ce modèle constitue un nouvel outil et une nouvelle méthodologie précieux pour l'étude des propriétés de surface de la peau. Ce chapitre s'appuiera sur une publication intitulée « *Design of a lipid coated polymeric material mimicking human skin surface properties: A performing tool to evaluate skin interaction with topical products* », soumise dans le journal ACS Applied Materials and Interfaces.

Le deuxième chapitre se concentrera sur l'étude et la mise en évidence de l'effet de la pollution urbaine sur les propriétés de surface de la peau. Le modèle SFS présenté dans le chapitre 1 sera utilisé pour étudier l'impact des polluants sur l'oxydation des lipides de surface, plus particulièrement le squalène. Ceci permettra d'expliquer comment des modifications chimiques peuvent modifier l'énergie libre de surface de la peau. Ces travaux ont été valorisés par une publication intitulée « *Squalene oxidation induced by urban pollutants: impact on skin surface physico-chemistry* », soumise dans le journal Chemical Research in Toxicology. Ces résultats seront complétés par ceux obtenus à partir de l'étude menée *ex vivo*, permettant de valider la méthodologie d'étude précédente et d'expliquer l'impact des polluants sur la fonction barrière de la peau. Ces résultats apporteront des informations fondamentales pour le projet Urbaskin.

Enfin, le troisième chapitre sera focalisé sur l'étude des modifications surfaciques induites par l'application de produits cosmétiques, grâce à des approches instrumentales et sensorielles. Dans un premier temps, le film résiduel des produits, qui n'a jamais été étudié auparavant, sera caractérisé instrumentalement par des approches *in vivo* et sur modèles non-biologiques. Ces résultats seront complétés par une approche sensorielle de l'étude de ce film résiduel. Une méthodologie sensorielle originale, basée sur l'utilisation de modèles non-biologiques sera présentée sous forme d'une publication intitulée « *Prediction of residual film perception of cosmetic products using an instrumental method and non-biological*

surfaces : the example of stickiness after skin application », acceptée dans le journal *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*. Ces caractérisations surfaciques du film résiduel serviront de bases pour interpréter les propriétés anti-adhésion de particules des produits cosmétiques. Ainsi, ce chapitre apportera de nouveaux éléments clefs dans la compréhension de l'impact des produits sur la peau et permettra de mieux appréhender la formulation et l'évaluation de produits cosmétiques anti-pollution.

Chapitre 1 – Mise en place d'un nouveau modèle d'étude des propriétés de surface de la peau

Ce chapitre a fait l'objet d'un article soumis dans le journal ACS Applied Materials and Interfaces, et d'un brevet européen (N° EP18306149.8).

L'ensemble des études réalisées concernant l'effet de la pollution urbaine sur les propriétés de surface de la peau souligne la difficulté de trouver un modèle d'étude adapté, reproduisant de façon pertinente la complexité de la peau. Comme évoqué précédemment, l'explant de peau humaine semble être le modèle le plus adéquat car il possède à la fois une structure et une composition chimique, pour ainsi dire, identiques à la peau humaine *in vivo* (Cho et al. 2013). Il sera donc un modèle privilégié pour la présente étude. Néanmoins, à l'image de la peau *in vivo*, ce modèle souffre d'une forte variabilité inter-individus, n'est pas durable dans le temps, n'est pas utilisable en analyse sensorielle et surtout est très coûteux. Ainsi pour pouvoir étudier des phénomènes dans le temps et surtout pour pouvoir réaliser des screening ou des études sensorielles, il est nécessaire d'envisager d'autres modèles de peau, non-biologiques, dont certains existent déjà dans la littérature et sont commercialisés (cf. review). Cependant, ces surfaces ne sont pas modulables, et leur composition chimique n'est pas précisément connue. De plus, ces modèles ne possèdent pas de lipides en surface, ce qui limite grandement leur intérêt pour étudier l'impact de polluants sur les lipides cutanés. Aucun des modèles disponibles n'étaient donc parfaitement adaptés à notre étude axée sur les propriétés de surface de la peau.

Partant de ce constat, il est apparu nécessaire de mettre au point un nouveau modèle non-biologique de peau, permettant d'étudier de façon simple la surface de la peau, son interaction avec des polluants et avec divers produits cosmétiques. Ce modèle devait répondre aux critères suivants :

- Energie libre de surface proche de la peau pour mimer les interactions peau/polluants et peau/produits.
- Comportement physico-chimique après application de produits cosmétiques proches de la peau pour pouvoir mimer les propriétés physico-chimiques des films résiduels.
- Topographie similaire à la peau pour améliorer les surfaces existantes et pour mieux mimer la physico-chimie de surface.
- Composition chimique de surface similaire à la peau, notamment en termes de lipides, pour pouvoir étudier l'impact des polluants sur la composition lipidique.

- Utilisable dans le temps, peu coûteux, simple et rapide à préparer, répétable et modulable.

La surface modèle développée n'avait pas besoin de mimer des mécanismes biologiques ni des propriétés de l'épiderme viable ou du derme puisqu'elle se focalise uniquement sur les propriétés de l'extrême surface de la peau. Ainsi, l'objectif était de reproduire au mieux les éléments de surface de la peau :

- Le *stratum corneum* (SC), matériau hydrophobe, composé de kératine et de lipides, possédant un microrelief spécifique (Elkhyat et al. 1996; Mavon et al. 1997; Elias 2005).
- Le film hydrolipidique qui recouvre ce SC et qui apporte à la peau un caractère faiblement à fortement monopolaire basique, en fonction de la zone du corps étudiée (Mavon et al. 1997, 1998).

La surface modèle, appelée Surfaskin (SFS) dans la suite du manuscrit, est donc constituée de deux éléments : un support reproduisant l'hydrophobie du SC et sa topographie, recouvert d'un revêtement spécifique reproduisant le film hydrolipidique cutané.

Le support sélectionné devait pouvoir être moulé de façon suffisamment précise pour reproduire les plateaux et les sillons de la peau, avec une précision de l'ordre du micromètre (Lagarde, Rouvrais, and Black 2005), et posséder une faible énergie de surface. Il devait également être capable de reproduire le film résiduel de produit cosmétique, en mimant notamment le comportement physico-chimique de la peau après application de produits. Notre choix s'est tourné vers les matériaux polymériques, qui sont généralement de faible énergie de surface, comprise entre 19 et 47 mJ/m² ("Solid Surface Energy Data (SFE) for Common Polymers" 2018). Les zones de peau les plus hydrophobes pouvant posséder une énergie de surface inférieure à 30 mJ/m² (Elkhyat et al. 2001), les polymères siliconés semblaient être pertinents pour reproduire l'hydrophobie du SC.

Le film résiduel de produits cosmétiques et le comportement physico-chimique de plusieurs surfaces pouvant modéliser la peau ont été étudiés par Bhushan et Tang à l'aide de la microscopie à force atomique et de la mesure de l'angle de contact (Bhushan and Tang 2011). D'après leurs résultats, le matériau polymère siliconé Dragonskin 20® semblait présenter des propriétés similaires à la peau de rat, leur modèle biologique de référence (mouillabilité après application d'émulsions cosmétiques, épaisseur du film résiduel, adhésivité du film, friction et rugosité). Ce matériau, facilement accessible, a donc été sélectionné pour servir de support à notre modèle SFS.

Pour simplifier la composition chimique de surface de la peau, nous nous sommes focalisés sur la composition lipidique au niveau du visage, riche en sébum. Le film hydrolipidique qui recouvre la surface cutanée a donc été approximé par un mélange de lipides sébacés. En effet, ces lipides sont les plus exposés aux polluants et sont donc pertinents à étudier en lien avec la pollution urbaine. Une composition lipidique reproduisant le sébum humain (Stefaniak, Harvey, and Wertz 2010) a donc été utilisée pour recouvrir le support Dragonskin 20®.

Différents protocoles ont été testés pour déposer ce mélange lipidique sur le support polymère, notamment des dépôts réalisés par spray, trempe, pinceau ou à l'aide d'un applicateur de film. Les deux protocoles les plus intéressants sont discutés dans la publication suivante. L'objectif était d'obtenir un film fin et uniforme, recouvrant le matériau polymère.

La mise au point, la caractérisation ainsi que des exemples d'application de cette SFS sont présentés ci-dessous, à travers l'article « *Design of a lipid coated polymeric material mimicking human skin surface properties : A performing tool to evaluate skin interaction with topical products* ». La SFS est comparée au modèle Vitroskin®, le modèle commercial actuellement reconnu pour mimer les propriétés de surface de la peau, afin de valider la performance de ce nouveau modèle SFS.

Design of a lipid coated polymeric material mimicking human skin surface properties: A performing tool to evaluate skin interaction with topical products

EUDIER Florine, GRISEL Michel, SAVARY Géraldine, PICARD Céline*

*Normandie Univ, France; UNILEHAVRE,FR 3038 CNRS, URCOM, EA 3221, 25 rue
Philippe Lebon BP 1123, 76063 Le Havre cedex, France*

*Corresponding author celine.picard@univ-lehavre.fr

Abstract

An original non-biological skin model has been developed to mimic skin surfaces properties. This skin model presents several improvements when compared to existing ones: it owns topography identical to *in vivo* skin and a lipid composition close to skin face. This imparts to the model surface a physico-chemistry similar to *in vivo* skin. Concept and design of the skin model are presented, followed by an instrumental characterization performed using 3D-microscopy, ATR-FTIR and contact angle measurements. Surface free energy components are calculated for the non-biological skin model using the Van Oss approach and compared to *ex vivo* experiments performed on human living skin explants. A comparison was made with the commercial skin model Vitroskin®, this last being a reference in terms of non-biological skin model. The effect of several emollients on skin physico-chemistry was investigated *in vivo* and on both non-biological models. The study focused on several emollients and oils, including silicones and esters, and three emulsions (O/W and W/O). Results obtained confirm the high reliability of the developed model as it shows a skin-like surface behavior. This very interesting tool shows promising results concerning the study of residual film present after products application or to study skin/product interactions.

Keywords

Human skin model – physico-chemistry – Advancing contact angle – Surface characterization – Cosmetic application – sebum

Introduction

Skin is the most extensive and heaviest human organ. It plays a fundamental protective role for our whole body. One of its most important functions is to control the penetration of external compounds and microorganisms into human body and to limit excessive water loss¹. This skin barrier property is mainly related to the stratum corneum, its external layer composed of dead cells, the corneocytes, kept stuck together thanks to intercellular lipids which act as stratum corneum “cement”². This external dead layer is in direct contact with external environment and with any product applied to skin surface. Both corneocytes and

intercellular lipids integrity condition the efficacy of skin barrier function and the interaction between the skin and its environment.

Studying skin surface properties is consequently of great interest to better understand corneocytes and lipids roles in penetration or permeation phenomenon. Those phenomenon are relative to passive diffusion and to contact area between skin and external compounds, which are both related to skin physico-chemistry³. This important property describes how skin interacts with its environment and how a compound or product topically applied interacts with skin.

Using the Van Oss approach for surface free energy determination, previous *in vivo* studies showed that skin physico-chemistry is greatly impacted by the presence of sebaceous lipids on its surface^{3,4}: the forearm skin, poor in sebum, behaves as a weakly monopolar basic (hydrophobic) surface whereas the forehead skin, rich in sebum, behaves as a strongly monopolar basic (hydrophilic) surface. Those observations are explained by both lipids amount and composition: sebum is enriched in amphiphilic lipids, especially free fatty acids, which increase the monopolar basic behavior of sebum-rich skins.

When studying the impact of harmful factors on skin physico-chemistry, such as UV radiations, urban pollutants or new cosmetic or pharmaceutical ingredients whose toxicity data are not available, *in vivo* measurements are not feasible due to raw material potential toxicity and regulation. In addition, surface free energy determination needs the use of toxic compounds such as diiodomethane which is injurious in case of skin contact. Consequently, skin models have to be developed and used.

Animal models are available, such as pig skin and rat skin. They present similarity with human skin but also differences, above all concerning lipid composition⁵ which can impact their physico-chemistry. Moreover, in the framework of a cosmetic study, ethical and legal question are raised: the European Union prohibits all animal tested products since 2013⁶.

Some alternative skin models have been developed to reduce the use of animals for cosmetic researches. Reconstructed human skin and human skin explants are probably the most powerful models because their behavior, structure and composition are close to *in vivo* skin⁷⁻⁹. However, those two models are very expensive and show limited life duration. Consequently, simple non-biological surfaces can be used to mimic skin surface properties and to study the frictional and mechanical properties¹⁰⁻¹² or the adhesion properties¹³. Non-biological skin models are hence commercially available such as the Vitroskin® which has been specifically developed to mimic skin surface properties (pH, ionic strength, physico-chemistry). The main disadvantage of those commercial products is that their composition remains unknown and unchangeable, thus they can be considered as "black boxes". Based

on this obvious state-of-the-art, one can consider the need for a new fairly simple, reliable, cheap and easy to handle synthetic surface owning properties equivalent to *in vivo* human skin.

The aim of the present study is to develop an original non-biological skin model (NBSM) of controlled composition which mimics skin surface properties, chemical composition and topography thus imitating its physico-chemistry. First, a polymeric material reproducing skin micro topography was prepared. This material was then coated with an artificial sebum imitating skin surface lipid composition. Contact angle measurements were performed and compared to *ex vivo* measurements in order to validate the NBSM physico-chemistry. Results were compared to commercial Vitroskin® reference.

In a second step, to deepen the characterization of the NBSM, physico-chemical properties were measured using different emollients and emulsions in order to highlight the interest of the NBSM to study topical application. All the results obtained were compared to *in vivo* skin measurements.

Material and methods

1. Chemicals used

Artificial sebum:

Squalene (>98% purity), Triolein (Glyceryl Trioleate 65% purity) and Tristearin (Glyceryl Tristearate, >99% purity) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri); Cholesteryl oleate (97% purity), Cholesterol (95% purity), DL- α -Tocopherol (>97% purity), Oleic acid (99% purity), chloroform (technical grade) and methanol (technical grade) were supplied by Fisher Scientific SAS (Illkirch, France). Oleyl Oleate (Schercemol™ OLO ester) was supplied by Lubrizol (Oudalle, France). Palmityl palmitate, palmitic and stearic acid were kindly given by Stearinerie Dubois (France).

Liquids for contact angle measurements:

Three reference liquids were used to perform surface free energy calculation: ultrapure water (resistivity of $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ at 25°C), diiodomethane (analytical grade, 99% purity) and formamide (analytical grade, 99% purity) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri). Their surface free energy components values are reported in table 1.

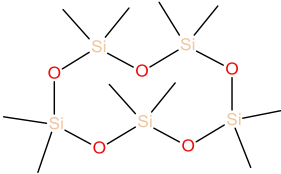
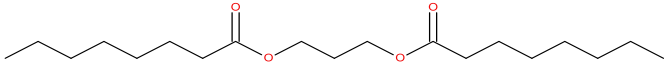
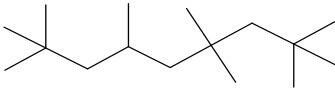
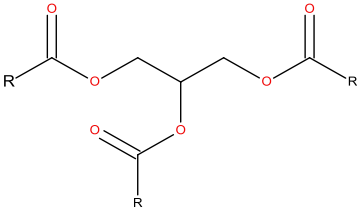
Table 1: Surface free energy components of water, diiodomethane and formamide¹⁴.

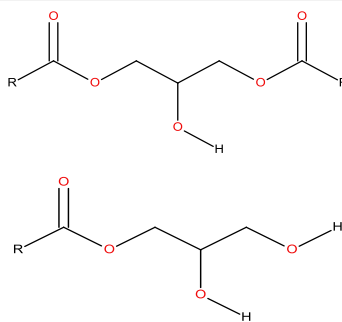
Liquid	γ_i (mJ.m ⁻²)	γ_i^{LW} (mJ.m ⁻²)	γ_i^+ (mJ.m ⁻²)	γ_i^- (mJ.m ⁻²)
Water	72.8	21.8	25.5	25.5
Diiodomethane	50.8	50.8	0.72	0
Formamide	58	39	1.92	47.0

Topical ingredients and emulsions used for physico-chemical study:

Cosmetic grade ingredients used for this study are presented with their physico-chemical properties in table 2. Silicone was supplied by Evonik Goldschmidt (Essen, Germany); ester was kindly given by Stearinerie Dubois (Boulogne-Billancourt, France); isohexadecane was supplied by IMCD Group (Cologne, Germany) and the argan oil was supplied by Olvea Group (Saint-Léonard, France).

Table 2: Topical ingredients used

INCI name	Code	Structure	Surface tension (mJ/m ²) at 20°C
Cyclopentasiloxane ¹⁵	CPS		18.0
Propanediol dicaprylate ¹⁵	PDC		33.1
Isohexadecane ¹⁵	IHD		24.4
Argan oil ¹⁶	AO	<p>95% triacylglycerols</p>  <p>~ 2% mono/diacylglycerols</p>	31.7 (experimental data)



~ 2% free fatty acids

Three emulsions listed in Table 3 were also used: two commercial ones and a standard emulsion specifically developed at laboratory scale according to the protocol described in¹⁷.

Table 3: Description of emulsions used

Name	Code	Application
Nivea Crème	NC	Moisturizing and nourishing W/O emulsion
Gel Hydroalcoolique Assanis Family	GHA	Disinfecting aqueous gel
Standard Emulsion	SE	O/W emulsion

2. Study models

Human living skin explants:

Human living skin explants were furnished by BIO-EC (Longjumeau, France); they were obtained from plastic surgery of the abdominal area of a 29 years old Caucasian woman, with her consent. To prepare skin explants, the subcutaneous fat was first removed using a scalpel, then skin (dermis and epidermis) was cut into approximately 2 cm diameter circles. The explants as prepared were placed in survival conditions using BIO-EC's explant medium (BEM) and maintained in an incubator at 37°C in 5% CO₂. Half of the BEM was replaced by fresh one every two days. Eight explants were used for the determination of surface free energy. They were kept into the incubator until contact angle measurements. There were gently wiped before measurements, to eliminate residual BEM present on the surface.

In vivo measurements:

In vivo measurements were performed on the forearm of a 21 years old Caucasian woman with her consent. The analyzed skin was kept unwashed for 2 hours and no treatment was performed before measurements.

Commercial non-biological (NB) skin model:

The commercial Vitroskin® (IMS, Inc., Milford, CT) has been characterized and used in the study. It is a reference in terms of non-biological skin models for physico-chemical studies.

The Vitroskin® (VS) is a synthetic skin model made with proteins and lipids¹⁸ which mimics skin surface properties such as ionic strength, pH, topography and critical surface tension. This NB skin model is used as skin substituent for *in vitro* SPF (Sun Protection Factor) measurements or for the study of emollients spreading^{18,19}. Prior to use, it required to be hydrated according to a standardized protocol developed by IMS. The pieces of VS were placed during 16-24h at room temperature in a standard closed hydration chamber which contains 350g of a mixture water/glycerin 85:15, poured in the bottom.

Preparation of the NB skin model specifically developed (NBSM):

A new NB skin model (NBSM) has been developed for the study. It consists of two distinct parts (see fig 1).

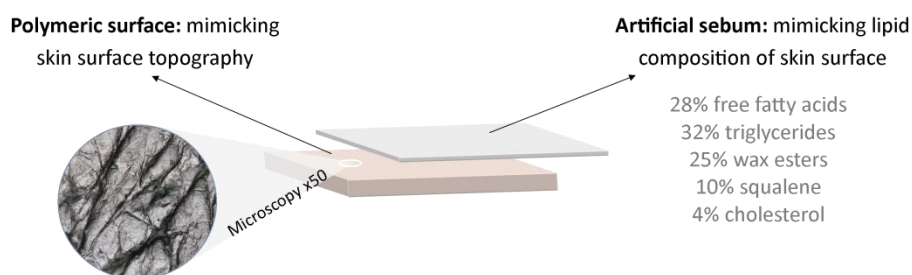


Fig 1: Presentation of the NBSM concept: an artificial skin made with silicone coated with an artificial sebum.

The first part is a polymeric material which reproduces skin surface topography. This artificial support is coated with an artificial sebum which mimics lipid composition of skin face. This NBSM was prepared as described in the following paragraphs.

Preparation of a polymeric support mimicking skin surface topography

A skin print was prepared *in vivo* using the biocompatible silicon Body Double® (Création-Silicone, Jouy-en-Josas, France) to obtain a silicon surface with a negative relief of the skin. For the present study, the skin print was performed on the forearm of a 26 years old volunteer, with her consent. This skin print was molded back using the silicone DragonSkin® (DragonSkin 20, Création-Silicone, Jouy-en-Josas, France). This silicon material has already been characterized by Bhushan and Tang²⁰ using atomic force microscopy. They highlighted in their work that the DragonSkin® was a good simulation of skin surface properties regarding its adhesive force and frictional behavior after application of topical products.

After mixing together an equal amount of the two components of the kit, the Dragonskin® was let degassing under high vacuum during 10 min. The viscous mixture was then poured onto the Body Double® skin print and let harden for at least 4h. The good compatibility between these two products allows a perfect reproduction of the negative skin print.

The polymeric support obtained following this protocol is at the size of the forearm used to prepare the skin print and can be cut into the desire shape. In the present study, the polymeric support was cut into rectangles of dimensions 2x5 cm, to present a sufficient area to perform all characterizations.

Preparation of the artificial sebum

The artificial sebum was prepared following the composition²¹ described on table 4. All weighted lipids were dissolved in CHCl₃/MeOH 2:1 to reach a concentration of 10 g/L of sebum. The solution was kept in the fridge (T=2-4°C) until use. When solvents evaporation was necessary, a rotatory evaporator has been used (Rotavapor® R-300, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)

Table 4: Composition used for the artificial sebum

Chemical	Weight (% w/w)
Squalene	10.29
Palmityl Palmitate	19.42
Oleyl Oleate	4.85
Tristearin	21.36
Triolein	10.68
Stearic acid	6.87
Palmitic acid	6.87
Oleic Acid	13.74
Cholesteryl Oleate	1.94
Cholesterol	3.88
(±)-α-Tocopherol	0.10
Total	100.00

The artificial sebum was then coated onto the previously described polymeric material. Two coating protocols have been tested. They are presented below and discussed in the Results and Discussion section.

Coating protocols

The first protocol (referred as “Protocol 1”) used a sebum solution in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:7 at a concentration of 20g/L. Sebum solution was pulverized through a spraying pump on the support^{11,22}. 10 pulverizations at a distance of 5 cm were performed on a 1 cm x 7 cm surface at ambient temperature. Surfaces as prepared were placed in a closed plastic tube to allow slow solvents evaporation and good homogeneity of the lipids coating.

The second protocol (referred as “Protocol 2”) used pure sebum, without any solvent. The solvents were evaporated from the artificial sebum solution. Resulting lipids mixture was placed in an oven at 70°C until complete liquefaction. The polymeric material was also placed in the oven at 70°C during 15 min to avoid temperature difference during deposit. A thin pencil was used to apply a liquid lipid film onto the silicone support. Coated support was then placed back in the oven during 5 min for homogenization. Excess lipids were wiped off using absorbent paper, and the coated silicone was placed again in the oven during 5 min. This last step was crucial as it allowed obtaining a thin homogeneous sebum deposit. The artificial skin model prepared as described was allowed to cool down to room temperature during few minutes.

3. Surface characterization of NB skin models

Infrared spectroscopy:

A FT-IR Spectrometer spectrum (PerkinElmer, Inc., Waltham, Massachusetts, USA), connected to the Spectrum software was used. 4 spectra were recorded for each measurement, using the ATR mode (ZnSe crystal). The range of vibrations was from 4 000 to 650 cm^{-1} .

Optical microscopy:

Surfaces observation was performed using an optical microscope (DMLP/DC 300, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a camera and controlled by the Leica Application Suite software. All pictures were obtained using transmission mode, at a magnification of x50.

Digital microscopy:

A Keyence Microscope VHX-1000 (Keyence Corporation TSE, Osaka, Japan) using the VH-Z100R lens at a magnification of x300 was used. 3D images were recorded in transmission mode and assembled to obtain a 1600 x 1200 pixels size.

Roughness profiles and parameters were calculated from 3D images of surfaces according to the ISO 25178 norm, using the Mountains Map® software (Digital Surf SARL, Besançon, France). The different roughness parameters obtained are listed in table 5.

Table 5: Roughness parameters definitions

Roughness parameter	United	Definition
Sa	µm	Arithmetic mean height
Sz	µm	Maximum height
Ssk	/	Skewness factor

4. Contact angle measurement and surface free energy determination

Advancing contact angle measurements:

Contact angle measurements were performed using a portative goniometer PGX+ (ScanGaule, Gravigny, France) connected to the PGPlus software. This goniometer is equipped with a high resolution camera to acquire images, with a specific lightening system associated with a mirror to visualize the droplet. The syringe used for droplets deposition has an intern diameter of 0.77 mm.

Measurements were performed at room temperature ($20 \pm 1.5^\circ\text{C}$). Advancing contact angle θ_A is the highest value of contact angle measured prior to drop baseline displacement when the drop volume is increased. A small drop was deposited on the surface and its volume was increased by the addition of five successive drops^{23,24}. The final drop reached a volume of approximately 7µl. Five pictures were taken immediately after the addition of each drop. Total time of the experiment is around 20 seconds, so evaporation or penetration of liquid is neglected. Contact angle from both sides of the drop were calculated using the software program. θ_A was then the maximum value obtained from the mean of both sides of drop among these five pictures. Advancing contact angle measurements for each liquid were performed at least in triplicate for each study models.

Surface free energy determination:

To determine the surface free energy of solid surfaces, one of the most recent approaches has been developed by Van Oss and co-workers^{3,25,26}. They suggest that solid and liquid surface free energy can be divided into two components: the Lifschitz-Van der Waals component (γ^{LW}), which corresponds to the Van der Waals interactions (Keesom, Debye, London), and the acid-base component (γ^{AB}) which corresponds to the acidic and basic interactions, according to the Lewis concept:

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (1)$$

This acid-base component can be expressed by the geometrical mean of two parameters: γ^+ (electron acceptor) and γ^- (electron donor):

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-} \quad (2)$$

This last component includes the hydrogen bonding and the π -electron interactions.

Surface free energy can be calculated from contact angle measurements using the Young equation:

$$\gamma_L \cos \theta = \gamma_S - \pi_e - \gamma_{SL} \quad (3)$$

Where γ_L is the liquid surface tension, θ is the contact angle, γ_S is the solid surface free energy, π_e the film pressure of the liquid and γ_{SL} the interfacial surface free energy. "L" and "S" refer to liquid and solid respectively. π_e can be neglected for low energy solids like skin³.

According to Van Oss, the interfacial surface free energy can be expressed as follow:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S^{LW} + \gamma_L^{LW} - 2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2(\sqrt{\gamma_S^+\gamma_S^-} + \sqrt{\gamma_L^+\gamma_L^-} - \sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} - \sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+}) \quad (4)$$

Thus, the Young equation can be written:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L = 2\sqrt{\gamma_L^{LW}\gamma_S^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_L^+\gamma_S^-} + 2\sqrt{\gamma_L^-\gamma_S^+} \quad (5)$$

Following this equation, the surface free energy of the solid surface can be determined with using at least three reference liquids of known components values.

The Van Oss model has been defined for a smooth and homogeneous surface. For a rough surface, the roughness coefficient defined by Wenzel et al²⁷ should be used to adjust contact angle value:

$$\cos \theta^* = r \cos \theta$$

Where $r = \frac{\text{real surface area}}{\text{appearing surface area}} \geq 1$ the roughness coefficient, θ^* the measured contact angle, θ the real contact angle

Nevertheless, some studies dealing with the effect of roughness on wettability of random surface like skin show that this relation does not correctly describe real contact angle^{3,28,29}. Moreover, we try to reduce the impact of roughness on our results using surfaces of equivalent topography. That's why skin roughness has not been taken into account for this study.

5. Physico-chemical study

Water contact angle after product application:

50 μL of each emollient and emulsion were manually spread on 10 cm^2 surface areas by 40 rotations. Water contact angle measurements were performed 1 min and 3 min after application, in triplicate.

Ingredient contact angle on untreated surfaces:

Contact angle of AO, IHD, CPS and PDC were measured in triplicate on each study models. Drop deposition protocol was the same as the one described previously.

Results and discussion

1. Optimization of sebum coating on the NBSM

Two protocols were tested to coat sebum thin layer on the silicone support. Sebum thin layers were visualized using optical microscope in transmission mode (fig 2).

Presence of lipids on the polymeric support gives a granular aspect to the relief (fig 2 (b, c)). Using protocol 1, lipids clearly crystallize, as evidenced on fig 2 (b): diamond-shape crystals are visible under polarized light. This crystallization, probably due to solvents evaporation, gives a glitter aspect to the surface, which is not appropriate for the lipid coating aspect. This crystallization is not observed for protocol 2 which exhibits an apparent homogeneous sebum layer over the entire surface (fig 2 (c)).

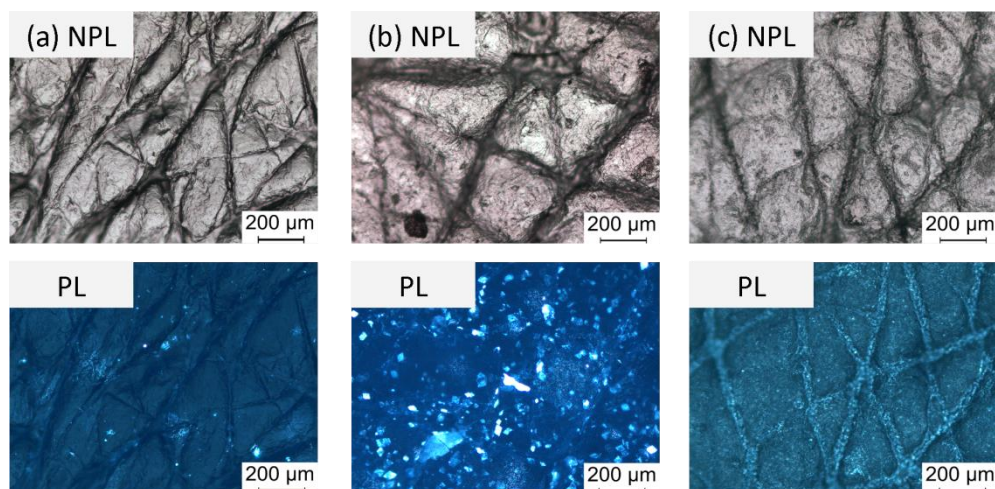


Fig 2: Microscopic images of (a) silicone support, sebum thin layer deposited using (b) protocol 1 and (c) protocol 2 (Magnification x50, transmission, non-polarized light NPL and polarized light PL)

In order to check the deposition protocol reliability, surface free energy was determined before and after sebum coating onto the silicone surface. Results are summarized in fig 3. Graph includes additional data resulting from human living skin explants measurements.

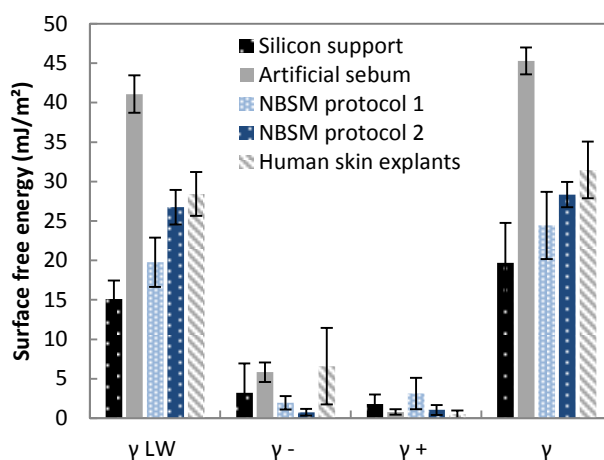


Fig 3: Surface free energy parameters as determined for the different surfaces: the silicone surface, the artificial sebum, the NBSM prepared using protocol 1, the NBSM prepared using protocol 2 and human living skin explants.

Unsurprisingly, knowing the low surface tension of silicone polymers, the silicone surface obtained shows a low surface free energy (γ) when compared to *ex vivo* skin: 19.7 ± 5.0 mJ/m² for silicone against 31.5 ± 3.6 mJ/m² for *ex vivo* skin. Artificial sebum properties demonstrate that this coating is able to increase the LW component value once applied on a given surface. Its high LW component value ($\gamma_{LW\text{sebum}} = 41.1 \pm 2.4$ mJ/m²) can be explained by the composition of this lipids mixture. Indeed, triglycerides and other constitutive lipids with long carbon chain will highly interact with each other, increasing surface cohesiveness. This cohesion will increase surface energy, through apolar interactions. Thus, the addition of the sebum thin layer on the silicone allows reaching a value of 26.7 ± 2.2 mJ/m² for the LW component on the NBSM prepared with protocol 2, in good agreement with the value of 28.4 ± 2.8 mJ/m² calculated on human living skin explants. Noteworthy those results are in accordance with literature data calculated from *in vivo* measurements³.

Values obtained for the NBSM following Protocol 2 for sebum deposition are therefore consistent with the measurements carried out with the human living skin explants. It is interesting to note that the basic component (γ^-) is slightly lower for coated NBSM when compared to human living skin explants. Nevertheless, this component depends on the type of skin: according to Mavon et al^{3,4}, sebum enriched skins show higher surface free energy values than poor sebum area. This difference for the surface free energy is due to the higher basic component value for sebum-rich skins. They assumed that this high basic component can be related to sebaceous lipid level and to its amphiphilic lipids content, specifically free

fatty acids. But the artificial sebum studied here did not show particularly high basic component: $\gamma_{\text{sebum}} = 5.8 \pm 1.2 \text{ mJ/m}^2$. Consequently, the NBSM did not reach as high γ as found on rich sebum *in vivo* skins. Both protocols show low values for the basic component: $1.9 \pm 0.8 \text{ mJ/m}^2$ for protocol 1 and $0.7 \pm 0.4 \text{ mJ/m}^2$ for protocol 2. The NBSM physico-chemistry is therefore much closer to poor sebum skin area as forearm skin rather than forehead skin.

Results clearly indicate that Protocol 1 is less efficient than Protocol 2 to reach properties close to *ex vivo* human skin. Indeed, one can observe that surfaces prepared using protocol 1 show higher values for the acidic component ($3.1 \pm 2.0 \text{ mJ/m}^2$), in comparison with *ex vivo* skin ($0.5 \pm 0.5 \text{ mJ/m}^2$). Then, the LW component determined for protocol 1 (19.8 ± 3.1) is lower than the one obtained *ex vivo*. Protocol 2 is so more appropriate to mimic skin physico-chemistry. In addition, the absence of solvent in Protocol 2 is undoubtedly advantageous for environmental concerns and it also prevents the risk of dissolution of the polymeric material once covered by the sebum. Moreover optical microscopy proves that sebum distribution was more homogeneous and that lipids crystallization was limited with Protocol 2. For all these reasons, the second protocol was selected and applied for the rest of the study.

The lipids coated over the support surface were then characterized by infrared spectroscopy (fig 4).

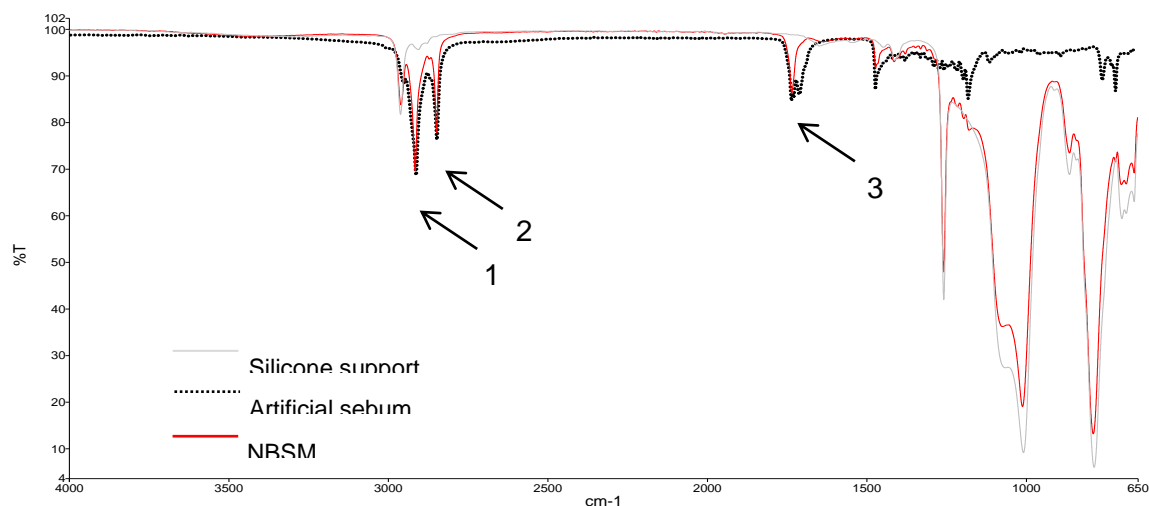


Fig 4: Infrared spectra recorded before / after sebum coating using protocol 2

Vibrations associated to the artificial sebum are visible on the NBSM infrared spectrum. There are indicated by the black arrows on fig 4, and its associated wavenumbers are reported in table 6 and compared to *in vivo* data.

Table 6: Wavenumbers (cm^{-1}) for *in vivo* skin, the artificial sebum and the NBSM.

Peak number	<i>in vivo</i> skin (see fig 5)	Artificial sebum	NBSM	Chemical structure associated^{30,31}
1	2922.54	2914.65	2916.71	CH ₂ asymmetric stretch
2	2853.14	2849.06	2849.74	CH ₂ symmetric stretch
3	1741.63 and 1710.90	1735.33 and 1710.27	1735.13	C=O esters (1720-1790) and fatty acids (1690-1720)

Wavenumbers associated to CH₂ symmetric stretch (table 6) give information about lipids chain conformational packing. According to Mendelsohn and al³¹, lipids chain packing evolves into the stratum corneum depth. Through the extreme surface (from 0 to 4 μm), CH₂ symmetric stretch wavenumber evolves from 2853 to 2849 cm^{-1} which corresponds to disordered and hexagonal chain packing. This is due to the specific lipids composition enriched in unsaturated lipids that covers the skin. Deeper into the stratum corneum, saturated lipids are predominant and show a highly ordered orthorhombic packing with associated wavenumbers between 2849 and 2847 cm^{-1} . This highly ordered packing provides to the stratum corneum its water barrier function. *In vivo* FTIR spectra data recorded on the forehead shows a disordered chain packing, corresponding to a liquid state³¹. Artificial sebum and NBSM FTIR spectra show a hexagonal type chain packing, explained by the mixture of saturated and unsaturated lipids chains used. This is consequently an intermediary packing between liquid lipids state and highly ordered lipids organization (wavenumber < 2849 cm^{-1}). This conformation is hence consistent with extreme surface lipids chain packing between 2853 and 2849 cm^{-1} described by Mendelsohn.

2. Surface properties characterization of VS and NBSM

The NBSM developed here was then compared with VS that is frequently used for studying skin surface properties

Infrared spectroscopy:

Infrared spectroscopy was first carried out to compare the two NB skin models. Spectra obtained on both models are stacked with *in vivo* spectra recorded on the forehead and on the forearm (fig 5).

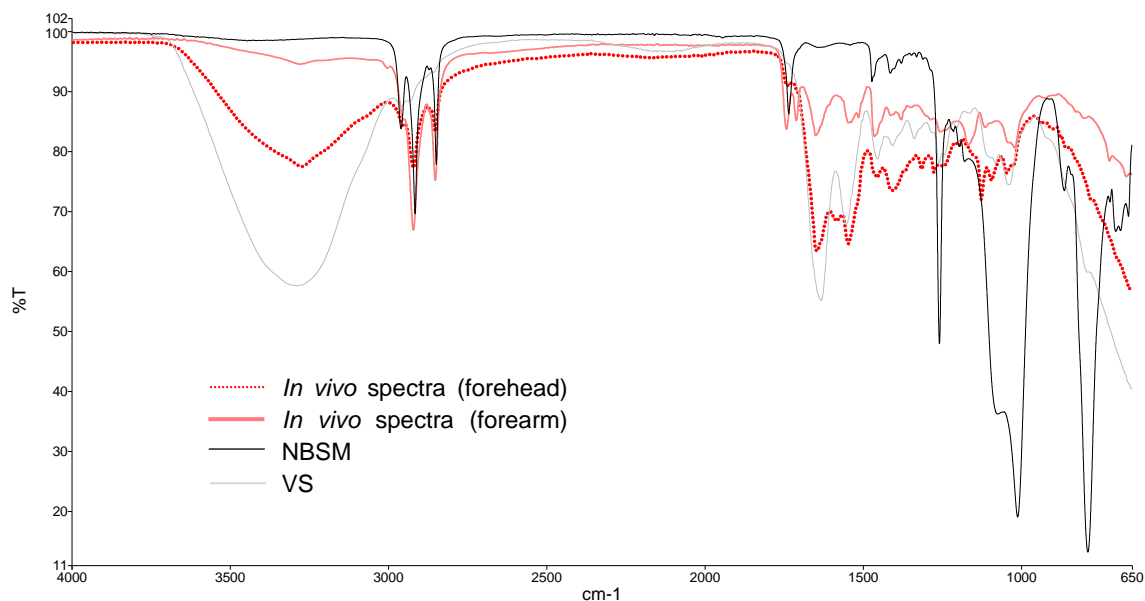


Fig 5: Infrared spectra recorded *in vivo*, on the VS and on the NBSM.

As expected, fig 5 shows distinct spectra which reflect differences in composition of the surfaces. NBSM is enriched in sebaceous lipids, whose associated absorption vibrations (2914 and 2849 cm^{-1}) lies between the ones of the *in vivo* forearm and forehead, whereas they are absent on the VS. VS shows vibrations associated to ceramides³⁰ (1631 cm^{-1} and 1553 cm^{-1}). Those lipids are involved in stratum corneum lipids organization and consequently in skin barrier function^{32,33}. For the NBSM, where ceramides are absent, we have shown previously that we are able to reach a physico-chemistry very close to *ex vivo* skin using only sebaceous lipids. The impact of ceramides on skin physico-chemistry is negligible when compared to sebaceous lipids. That's why the addition of ceramides for the present physico-chemical study was not relevant.

VS is also well hydrated as highlighted by the important vibration associated to -OH structures ($\nu = 3286\text{ cm}^{-1}$). This hydration state is less important on both *in vivo* spectra. This can be a source of divergence concerning physico-chemical behavior of VS and *in vivo* skin.

3D microscopy:

3D microscopy gives access to surface topography of the NB skin models and helps to study their roughness. 3D pictures obtained are presented on fig 6 and roughness profiles are summarized in fig 7.

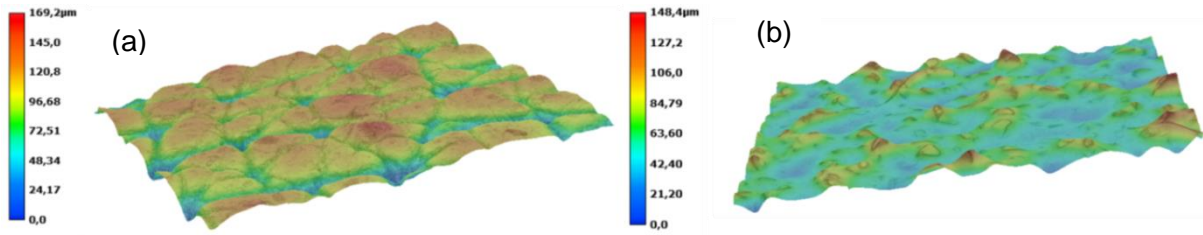


Fig 6: 3D microscopy images (Magnification x300) (a) NBSM (b) VS

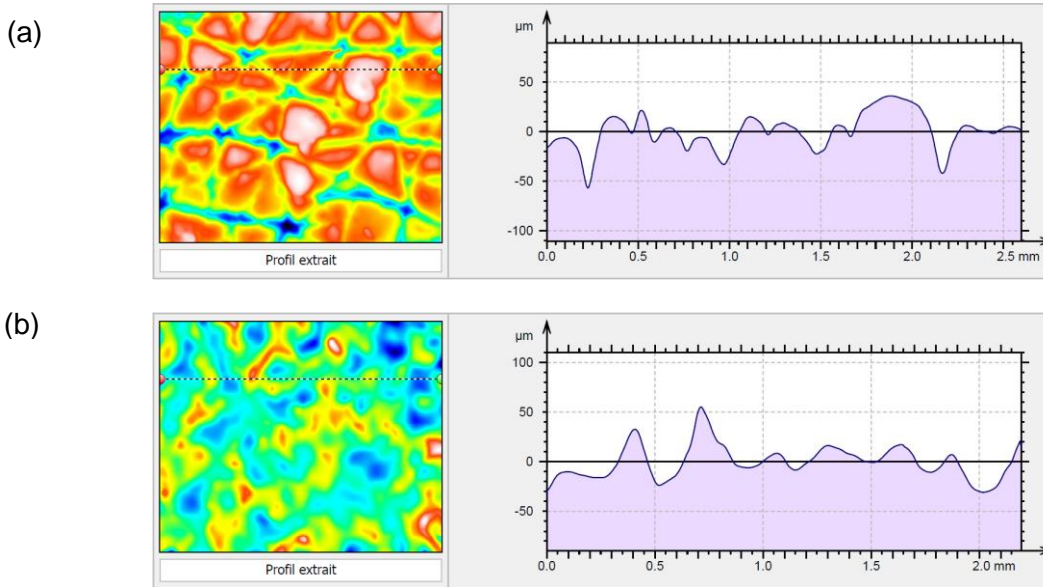


Fig 7: roughness profiles of (a) NBSM (b) VS

Roughness parameters are summarized in table 7. Results highlight that both models shows S_a and S_z in the order of magnitude of *in vivo* skin. An important difference between the NBSM and the VS concerns the skewness factor S_{sk} : $S_{sk_NBSM} = -0.739$ against 0.648 for S_{sk_VS} . This important parameter describes surface morphology: a positive S_{sk} value corresponds to a surface showing peaks and protuberance projecting above the average height whereas a negative S_{sk} value corresponds to a tray surface with deep scratches and pores. Those values are in accordance with visual observations made on fig 6 (a) and (b). Consequently, parameter S_{sk} is clearly discriminant between both non-biological models.

In addition, *in vivo* literature data reports negative S_{sk} values between -0.46 and -0.91 . Skewness factor of NBSM is so in good agreement with *in vivo* parameter.

Table 7: roughness parameters calculated on NBSM and on VS where S_a : Arithmetic mean height and S_z : Maximum height; S_{sk} : Skewness factor

Roughness parameters	<i>In vivo</i> ^{11,34} (volar forearm)	NBSM	VS
----------------------	--	------	----

Sa (μm)	[17 ; 20]	23.4	15.4
Sz (μm)	[119 ; 125]	169	148
Ssk	[-0.46 ; -0.91]	-0.739	0.648

The NBSM mimics forearm skin relief with much more accuracy than VS. As a consequence, in the aim to compare contact angle measurements performed on *in vivo* volar forearm the NBSM appears more suitable because surface roughness has a significant impact on contact angle measurements²⁷.

To summarize, the NBSM developed in the present work shows a chemical composition and topographic properties close to *ex vivo* skin. Moreover, as shown in previous paragraph, the sebum coating has been optimized to be as close as possible to skin physico-chemistry. All these results demonstrate that the NBSM is a relevant skin model to mimic a large range of skin surface properties.

In order to show the interest of NBSM, complementary measurements have been performed to evaluate its interactions with emollient and its physico-chemical behavior after products application. For this study, contact angles between water, emollients, and *in vivo* skin were compared with measurements on both NB skin models (VS and NBSM). However, for discussion, we had to compare surface free energy data with *ex vivo* calculated values as it was not possible to determine surface free energy of the *in vivo* skin of our panelist due to the toxicity of the reference liquids used.

3. Physico-chemical study of topical ingredients and emulsions: comparison with *in vivo* skin

Study of emollients spreading:

Contact angle measurements are part of instrumental methods which are used to study spreading properties of emollients on skin^{15,18}. Spreading of emollients is an important purpose for sensory quality of a topical product¹⁵ but also for its efficacy, above all for sunscreens³⁵⁻³⁷. Indeed, sun protection factor is on the one hand due to solar filters present in emulsions and on the other hand due to the homogeneity of the residual film once the product spreads onto the skin surface. Thus, among other parameters responsible for the film formation and homogeneity, the spreading appears of primary importance. In order to evaluate spreading properties of topical ingredients, contact angle measurements were performed with 4 ingredients: CPS, PDC, AO and IHD on the different surfaces studied herein. Results obtained on the NBSM, on the VS and *in vivo* are presented on fig 8.

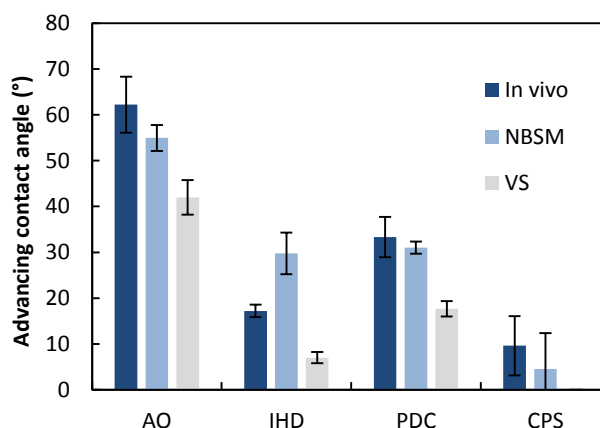


Fig 8: Contact angle values measured for AO, IHD, PDC, and CPS on NBSM, VS and *in vivo*

From a general point of view, contact angle measured using the four different ingredients appear very similar between the NBSM and *in vivo* surfaces. On the opposite, advancing contact angles as measured for the different emollients on the VS are lower when compared to both *in vivo* and NBSM surfaces. Those results mean that the NBSM surface, specifically developed in the present work, interacts with products in the same way as the *in vivo* skin. The only difference concerns IHD which shows more affinity with *in vivo* skin than with the NBSM. This can be explained by the slightly higher skin LW component, as calculated *ex vivo* and confirmed in literature³, compared to the NBSM, thus inducing higher interactions with the apolar IHD. However, this NBSM undoubtedly constitute an efficient support to evaluate emollient spreading if compared to VS. Indeed, lower contact angle measured on VS indicate that each ingredient shows more affinity with the VS than with *in vivo* skin. As a consequence, spreading of emollients is enhanced due to a higher surface free energy for VS ($\gamma_{VS} = 35.8 \text{ mJ/m}^2$) when compared to *ex vivo* skin and NBSM. The hydration state of the VS may be responsible for this result as the presence of water classically tends to increase surface free energy value. According to those results, the NBSM interestingly appears as a relevant tool to study residual film present on the skin surface after topical application. The physico-chemical characterization of residual films is presented below.

Characterization of residual film after products application:

Characterization of the residual film of an ingredient or an emulsion on skin is a very interesting topic as its homogeneity, composition and stability greatly impact skin surface properties and, consequently, the efficacy of actives and products. To study the physico-chemistry of residual films, water contact angle have been measured on VS, NBSM and *in vivo* at two distinct times (1 and 3 minutes) once a series of products applied following the protocol described in section Material and Methods. Results are presented on fig 9.

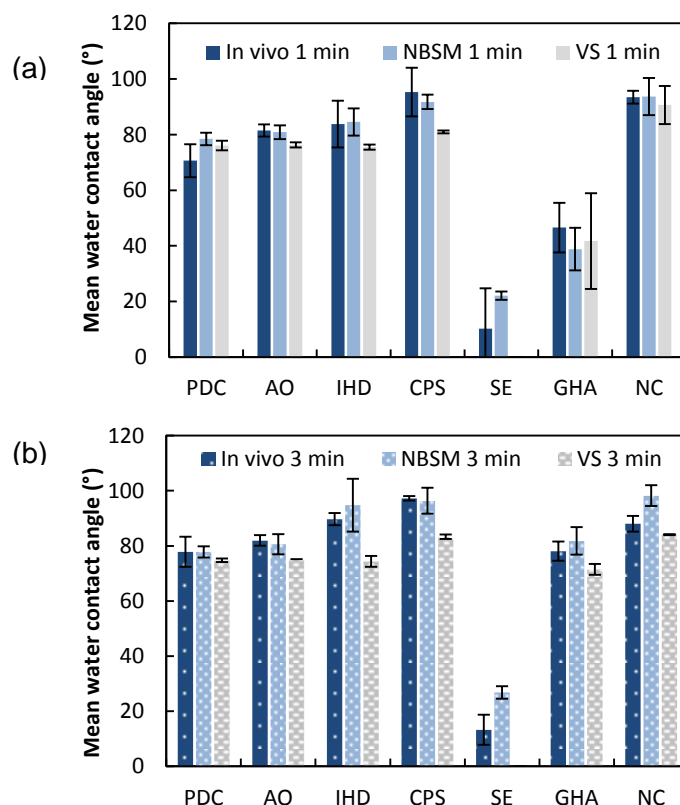


Fig 9: Water contact angle determined (a) 1 min (b) 3 min after product application. Three surfaces are compared: *in vivo* skin, the NBSM and the VS.

Water contact angles measured 1 min after surface treatment with emollients are classified as follow: $\theta_{\text{water}}/\text{PDC} < \theta_{\text{water}}/\text{AO} < \theta_{\text{water}}/\text{IHD} < \theta_{\text{water}}/\text{CPS}$ for both *in vivo* skin and NBSM, whereas $\theta_{\text{water}}/\text{IHD} < \theta_{\text{water}}/\text{PDC} \approx \theta_{\text{water}}/\text{AO} < \theta_{\text{water}}/\text{CPS}$ for VS. Before products application, $\theta_{\text{water}} \text{ in vivo} = 93,2 \pm 7.8^\circ$, $\theta_{\text{water}} \text{ NBSM} = 114,2 \pm 5.8^\circ$ and $\theta_{\text{water}} \text{ VS} = 104.2 \pm 11.8^\circ$. Globally, ingredients reduce water contact angle values for each surface.

For NBSM and *in vivo* skin, results obtained are in accordance with surface tension values (Table 2) of each ingredient: the lower the ingredient surface tension the higher the water contact angle. Indeed, the emollient residual film modifies skin composition and surface tension. As an example, CPS with low surface tension decreases skin surface energy.

Concerning the emulsions, the differences between the 3 surfaces, namely *in vivo*, NBSM and VS, appear less pronounced. NC exhibits the highest values of water contact angle, followed by the hydro alcoholic gel, while SE obtained the lowest values (Fig 9). Their composition can explain values obtained: SE and GHA contain more than 70% of water and isopropyl alcohol respectively which makes the skin more hydrophilic after application whereas for the inverse emulsion NC, its continuous oily phase is more important and makes the skin more hydrophobic.

The skin model VS displays surprisingly a water contact angle null for SE. Differences observed for VS in the measurements after emulsion application can be due to its absorption capacity and to its high hydration, as explained previously. Water from deposit drop can interact with the high amount of water contained in VS which decreased contact angle values.

Water contact angle measured 3 min after treatment can be useful to evaluate the evolution of residual film on skin at longer time. For instance, the GHA shows an important increase in water contact angle between 1 min and 3 min after application. This is probably the result of isopropyl alcohol evaporation. In this case, only non-volatile and non-penetrating ingredients of the product remain on the skin 3 min after application. In opposition, the SE residual film did not significantly evolve after 3 min which means that both penetration and evaporation of compounds are not achieved.

Whatever the type of ingredient (polar or apolar oil, ester, silicon) or emulsion used, advancing water contact angle determine on NBSM and *in vivo* remain very close. VS is also performing, but in a lesser extent, due to few differences with *in vivo* measurements. VS also shows less variation among products, above all 3 minutes after application. To sum up, results obtained in the present section with NBSM are very promising in the aim to study residual films of topical products and to highlight their effects on skin physicochemical properties.

The final example of application concerns the use of NBSM to characterize residual film after product application in terms of chemical composition, as shown on infrared spectra on fig 10 before and after NC application to skin.

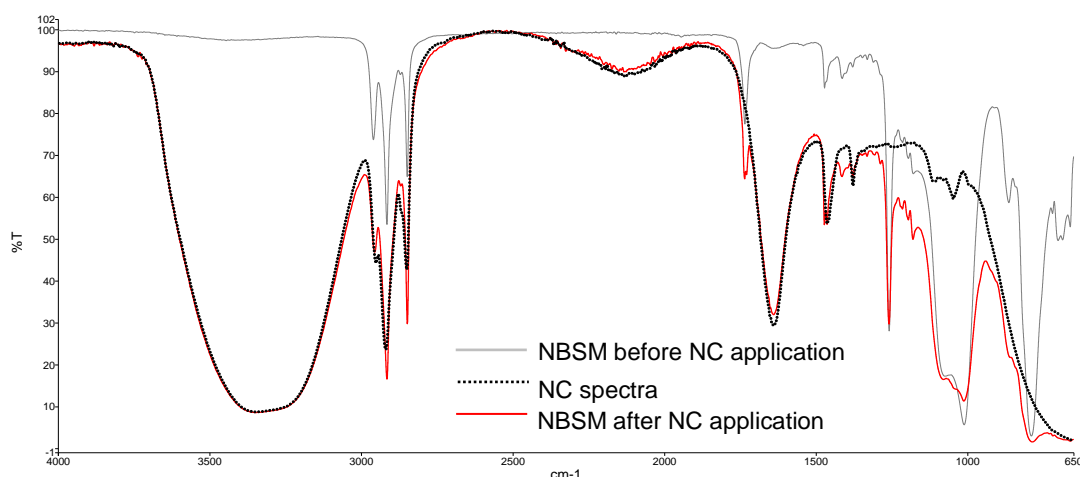


Fig 10: IR spectra recorded on NBSM before and 3 min after application of NC

According to the ingredient applied, we can highlight its presence on NBSM surface by following one or more vibrations associated to their original spectrum. In this example, the

vibration at 1639 cm^{-1} is characteristic of the presence of the NC emulsion on the surface. Such an illustration highlights how it can be very interesting to study the chemical composition of the residual film after application and its evolution over time with using NBSM surface. Another perspective covers the investigation of the homogeneity of a residual film by means of IR microscopy or Raman microscopy for instance³⁸.

Surprisingly, the investigations dealing with the impact of topical products on skin surface physico-chemistry are not numerous in literature. However, it is a fundamental point to highlight and understand the interactions between skin surface and a topical product. The use of such a skin model can help to fulfill this lack of data by standardizing the complex skin surface. It is a way to deepen the comprehension of phenomenon involved in skin permeation enhancement, topical drug delivery or skin adhesive properties for instance. In addition, the skin model developed in the present work has the great advantage to present a lipid coating, allowing the study of the interactions between human skin lipids and topical products, which represent an interesting perspective.

Moreover, in the aim to study a new ingredient whose toxicity has not been evaluated, the use of a non-biological skin model such as NBSM is of great interest: it allows studying ingredients properties without any safety trouble and with no particular technical difficulties.

Conclusion

This study describes the design, optimization, characterization and use of an original non-biological skin model which mimics skin surface properties, namely chemical composition, topography and physicochemical properties. This Non Biological Skin Model (NBSM) consists of an artificial material prepared with silicone and mold from an *in vivo* skin print, whose surface is coated with an artificial lipids mixture mimicking human sebum composition. Coating protocol has been tuned to be as close as possible to *in vivo* and *ex vivo* skin general characteristics. Lipids layer coated on the silicone support has been characterized using IR spectroscopy and resulting skin model surface has been studied using 3D microscopy. When compared to existing models, this NBSM has the advantage to reproduce real human micro topography. The study focuses on a volar forearm relief but other body part skin print can be used such as forehead or back. Present NBSM technology is therefore fully versatile, it represents high potentiality as a way to deepen the understanding of the skin micro relief impact on its physico-chemistry and on products interactions with and spreading behavior onto the skin.

Additional studies have been performed on this NBSM to present its potential uses for the characterization of residual film present on skin after topical application. Physico-chemical study highlights the similarity between *in vivo* skin and NBSM behavior in contact with

emollients and emulsions. This can be of great interest to develop the knowledge of residual residual film after application of raw materials or products such as gels or emulsions. This is a key area for sensory characterization but also for efficacy assessments. As an outlook, a control of the mechanical properties of the silicone support can be an important parameter to improve the tactile perceptions of the surface, in order to better mimic the product application onto skin.

This non-biological surface is of great interest to study efficacy of new products on skin surface but also for more fundamental researches. Lipid composition can be tuned by adding some epidermal lipids to mimic cutaneous disorders link to a modification in skin lipids such as atopic dermatitis or symptoms of dry skin³⁹. This can obviously constitute a novel way for characterizing those skin disorders and their physico-chemical consequences.

This NBSM skin model may also be used to study the impacts of many external factors such as UV radiation, ozone or urban pollutants on skin surface physico-chemistry and to understand particles or microorganisms adhesion.

Acknowledgments

The authors would like to gratefully thank BIO-EC laboratory (Longjumeau, France) for providing ex-vivo skin samples.

This study has been led within the framework of the URBASKIN project, selected as Project of Excellence by the General Directorate for Competitiveness Industry and Services (DGCIS) in the 20th Appeal FUI (Fonds Unique Interministériel). It has been financed by BPI France and by Normandie, Val de Loire and Ile-de-France regions and supported by the Cosmetic Valley. The authors sincerely thank contributors and financiers for their support.

References

- (1) Brisson, P. Percutaneous Absorption. *Can Med Assoc J* **1974**, *110* (10), 1182–1185.
- (2) Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J.-M. The Skin: An Indispensable Barrier. *Experimental Dermatology* **2008**, *17* (12), 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.
- (3) Mavon, A.; Zahouani, H.; Redoules, D.; Agache, P.; Gall, Y.; Humbert, P. Sebum and Stratum Corneum Lipids Increase Human Skin Surface Free Energy as Determined from Contact Angle Measurements: A Study on Two Anatomical Sites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1997**, *8*, 147–155.
- (4) Mavon, A.; Redoules, D.; Humbert, P.; Agache, P.; Gall, Y. Changes in Sebum Levels and Skin Surface Free Energy Components Following Skin Surface Washing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1998**, *10* (5), 243–250. [https://doi.org/doi:10.1016/S0927-7765\(98\)00007-1](https://doi.org/doi:10.1016/S0927-7765(98)00007-1).
- (5) Stahl, J.; Niedorf, F.; Kietzmann, M. Characterisation of Epidermal Lipid Composition and Skin Morphology of Animal Skin Ex Vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *72* (2), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.013>.
- (6) Merenyi, S. COSMETICS: Regulation (EC) No 1223/2009. **2014**.
- (7) Bouwstra, J. A.; Gooris, G. S.; Weerheim, A.; Kempenaar, J.; Ponc, M. Characterization of Stratum Corneum Structure in Reconstructed Epidermis by X-Ray Diffraction. *J. Lipid Res.* **1995**, *36* (3), 496–504.

- (8) Lerebour, G.; Cupferman, S.; Cohen, C.; Bellon-Fontaine, M. N. Comparison of Surface Free Energy between Reconstructed Human Epidermis and in Situ Human Skin. *Skin Research and Technology* **2000**, *6* (4), 245–249. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0846.2000.006004245.x>.
- (9) Tfayli, A.; Bonnier, F.; Farhane, Z.; Libong, D.; Byrne, H. J.; Baillet-Guffroy, A. Comparison of Structure and Organization of Cutaneous Lipids in a Reconstructed Skin Model and Human Skin: Spectroscopic Imaging and Chromatographic Profiling. *Exp Dermatol* **2014**, *23* (6), 441–443. <https://doi.org/10.1111/exd.12423>.
- (10) Nachman, M.; Franklin, S. E. Artificial Skin Model Simulating Dry and Moist in Vivo Human Skin Friction and Deformation Behaviour. *Tribology International* **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.triboint.2016.01.043>.
- (11) Gerhardt, L.-C.; Schiller, A.; Müller, B.; Spencer, N. D.; Derler, S. Fabrication, Characterisation and Tribological Investigation of Artificial Skin Surface Lipid Films. *Tribology Letters* **2009**, *34* (2), 81–93. <https://doi.org/10.1007/s11249-009-9411-0>.
- (12) Dąbrowska, A. K.; Rotaru, G.-M.; Derler, S.; Spano, F.; Camenzind, M.; Annaheim, S.; Stämpfli, R.; Schmid, M.; Rossi, R. M. Materials Used to Simulate Physical Properties of Human Skin. *Skin Res Technol* **2016**, *22* (1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/srt.12235>.
- (13) Charkoudian, J. C. A Model Skin Surface for Testing Adhesion to Skin. *Journal of the society of cosmetic chemists* **1988**, *39*, 225–234.
- (14) Janczuk, B.; Chibowski, E.; Bruque, J. M.; Kerkeb, M. L.; Gonzalez Caballero, F. On the Consistency of Surface Free Energy Components as Calculated from Contact Angles of Different Liquids: An Application to the Cholesterol Surface. *Journal of colloid and Interface Science* **1993**, *159*, 421–428.
- (15) Savary, G.; Grisel, M.; Picard, C. Impact of Emollients on the Spreading Properties of Cosmetic Products: A Combined Sensory and Instrumental Characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *102*, 371–378. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.028>.
- (16) Charrouf, Z.; Guillaume, D. Argan Oil: Occurrence, Composition and Impact on Human Health. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2008**, *110* (7), 632–636. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700220>.
- (17) Gilbert, L.; Picard, C.; Savary, G.; Grisel, M. Impact of Polymers on Texture Properties of Cosmetic Emulsions: A Methodological Approach. *J Sens Stud* **2012**, *27* (5), 392–402. <https://doi.org/10.1111/joss.12001>.
- (18) Douguet, M.; Picard, C.; Savary, G.; Merlaud, F.; Loubat-bouleuc, N.; Grisel, M. Spreading Properties of Cosmetic Emollients: Use of Synthetic Skin Surface to Elucidate Structural Effect. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *154*, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.028>.
- (19) Tokgoz, N. S.; Marginean-Lazar, G.; Ponte, A.; Fructus, A. E. Use of Synthetic Skin for in Vitro Evaluation of Photoprotective Efficacy of Sunscreens: Application to Different Type of Emulsions. In *Proceedings of the 20th IFSCC Congress*; France, 1998.
- (20) Bhushan, B.; Tang, W. Surface, Tribological, and Mechanical Characterization of Synthetic Skins for Tribological Applications in Cosmetic Science. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *120* (5), 2881–2890. <https://doi.org/10.1002/app.33340>.
- (21) Stefaniak, A. B.; Harvey, C. J.; Wertz, P. W. Formulation and Stability of a Novel Artificial Sebum under Conditions of Storage and Use. *International Journal of Cosmetic Science* **2010**, *32* (5), 347–355. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00561.x>.
- (22) Jones, S.; Rio, E.; Cazeneuve, C.; Nicolas-Morgantini, L.; Restagno, F.; Luengo, G. S. Tribological Influence of a Liquid Meniscus in Human Sebum Cleaning. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2016**, *498*, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.03.047>.
- (23) Timmons, C. O.; Zisman, W. A. The Effect of Liquid Structure on Contact Angle Hysteresis. *Journal of Colloid and Interface Science* **1966**, *22* (2), 165–171. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(66\)90080-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(66)90080-4).
- (24) Drelich, J. Guidelines to Measurements of Reproducible Contact Angles Using a Sessile-Drop Technique. *Surface Innovations* **2013**, *1* (4), 248–254. <https://doi.org/10.1680/si.13.00010>.
- (25) Van Oss, C. J.; Good, R. J.; Chaudhury, M. K. Additive and Nonadditive Surface Tension Components and the Interpretation of Contact Angles. *Langmuir* **1988**, *4* (4), 884–891. <https://doi.org/10.1021/la00082a018>.
- (26) Van Oss, C. J.; Chaudhury, M. K.; Good, R. J. Interfacial Lifshitz-van Der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. *Chem. Rev.* **1988**, *88* (6), 927–941. <https://doi.org/10.1021/cr00088a006>.
- (27) Wenzel, R. N. Resistance of Solid Surfaces to Wetting by Water. *Industrial & Engineering Chemistry* **1936**, *28* (8), 988–994. <https://doi.org/10.1021/ie50320a024>.
- (28) Oliver, J. P.; Huh, C.; Mason, S. G. An Experimental Study of Some Effects of Solid Surface Roughness on Wetting. *Colloids and Surfaces* **1980**, *1* (1), 79–104. [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(80\)80039-4](https://doi.org/10.1016/0166-6622(80)80039-4).

- (29) Cazabat, A. M.; Stuart, M. A. C. Dynamics of Wetting: Effects of Surface Roughness. *J. Phys. Chem.* **1986**, *90* (22), 5845–5849. <https://doi.org/10.1021/j100280a075>.
- (30) Prasad; Knübel; Schmidt-Fonk; Ortanderl; Nieveler; Förster. Infrared Spectroscopy of the Skin: Influencing the Stratum Corneum with Cosmetic Products. *International Journal of Cosmetic Science* **2000**, *22* (5), 371–383. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.2000.00028.x>.
- (31) Mendelsohn, R.; Flach, C. R.; Moore, D. J. Determination of Molecular Conformation and Permeation in Skin via IR Spectroscopy, Microscopy, and Imaging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758* (7), 923–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.009>.
- (32) Bouwstra, J. A.; Cheng, K.; Gooris, G. S.; Weerheim, A.; Ponc, M. The Role of Ceramides 1 and 2 in the Stratum Corneum Lipid Organisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1996**, *1300* (3), 177–186. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00006-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00006-9).
- (33) Bouwstra, J. A.; Dubbelaar, F. E. R.; Gooris, G. S.; Weerheim, A. M.; Ponc, M. The Role of Ceramide Composition in the Lipid Organisation of the Skin Barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1999**, *1419* (2), 127–136. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00057-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00057-7).
- (34) Lagarde, J. m.; Rouvrais, C.; Black, D. Topography and Anisotropy of the Skin Surface with Ageing. *Skin Research and Technology* **2005**, *11* (2), 110–119. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2005.00096.x>.
- (35) Draelos, Z. D. Therapeutic Moisturizers. *Dermatologic clinics* **2000**, *18* (4), 597–607.
- (36) Fageon, L.; Moyal, D.; Coutet, J.; Candau, D. Importance of Sunscreen Products Spreading Protocol and Substrate Roughness for in Vitro Sun Protection Factor Assessment. *International Journal of Cosmetic Science* **2009**, *31* (6), 405–418. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00524.x>.
- (37) Vergou, T.; Patzelt, A.; Schanzer, S.; Meinke, M. C.; Weigmann, H.-J.; Thiede, G.; Sterry, W.; Lademann, J.; Darvin, M. E. Methods for the Evaluation of the Protective Efficacy of Sunscreen Products. *Skin Pharmacology and Physiology* **2013**, *26* (1), 30–35. <https://doi.org/10.1159/000343576>.
- (38) Sohn, M.; Buehler, T.; Imanidis, G. Repartition of Oil Miscible and Water Soluble UV Filters in an Applied Sunscreen Film Determined by Confocal Raman Microspectroscopy. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2016**, *15* (7), 861–871. <https://doi.org/10.1039/C6PP00024J>.
- (39) Sator, P.-G.; Schmidt, J. B.; Hönigsmann, H. Comparison of Epidermal Hydration and Skin Surface Lipids in Healthy Individuals and in Patients with Atopic Dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2003**, *48* (3), 352–358. <https://doi.org/10.1067/mjd.2003.105>.

En résumé, cet article présente un nouveau modèle de peau, nommé Surfaskin (SFS), développé afin de reproduire au mieux différentes propriétés de la surface cutanée : sa composition chimique, sa topographie et sa physico-chimie. Ce modèle, dont le concept a été présenté précédemment, est divisé en deux éléments : un support siliconé reproduisant la topographie de la peau et l'hydrophobie du SC, recouvert d'un film de lipides sébacés.

Différents protocoles de dépôts ont été testés pour recouvrir le support siliconé de lipides : un protocole noté (1) dans lequel les lipides sont dissous dans un mélange de solvants chloroforme / méthanol 3:7 et déposés sur la surface grâce à un spray (10 pulvérisations par surface) ; un protocole noté (2) dans lequel un mélange de lipides purs est liquéfié et déposé à l'aide d'un pinceau sur le support silicone. Il s'avère que le protocole (1) ne permet pas d'obtenir une énergie libre de surface comparable à celle calculée sur explants de peau humaine à partir du modèle de Van Oss et des mesures de l'angle de contact. De plus, les solvants dissolvent le support polymère, pouvant ainsi altérer son microrelief et ses propriétés physico-chimiques. Enfin, l'évaporation de ces solvants conduit à une cristallisation des lipides. Le protocole (2) réalisé au pinceau a donc été sélectionné pour obtenir une surface mimant la physico-chimie de surface de la peau. La surface ainsi obtenue possède une énergie libre de surface très proche de celle mesurée sur explants de peau humaine : $\gamma_{S_SFS} = 28,3 \pm 1,6 \text{ mJ/m}^2$ et $\gamma_{S_ex\ vivo} = 31,5 \pm 3,6 \text{ mJ/m}^2$. Les composantes apolaires des deux surfaces sont très similaires ($\gamma_{SFS}^{LW} = 26,7 \pm 2,2 \text{ mJ/m}^2$ et $\gamma_{ex\ vivo}^{LW} = 28,4 \pm 2,8 \text{ mJ/m}^2$) et leurs composantes acides sont toutes deux inférieures ou égales à 1 mJ/m^2 . La seule différence notable entre ces deux surfaces concerne la composante basique, légèrement plus faible sur le modèle SFS que sur la peau *ex vivo*. Le mélange artificiel de lipides sébacés utilisé présente également une composante basique relativement faible ($\gamma_{sebum} = 5,8 \pm 1,2$), ce qui explique la faible valeur obtenue sur SFS. Cette composante étant essentiellement impactée par la présence d'acides gras libres (Mavon et al. 1998, 1997), une augmentation de la proportion d'acides gras pourrait éventuellement permettre d'atteindre une composante basique plus élevée. Néanmoins, les valeurs obtenues sont en bon accord avec les mesures réalisées *ex vivo* et les données de la littérature concernant la peau *in vivo* (Mavon et al. 1997; Elkhyat et al. 1996).

Cette surface SFS préparée avec le protocole (2) a ensuite été caractérisée par spectroscopie infrarouge, permettant de mettre en évidence le dépôt de lipides sébacés et d'étudier leur organisation latérale, mettant ainsi en évidence les similitudes avec la peau *in vivo* : les chaînes CH_2 des bicouches lipidiques présentes en surface de la SFS sont organisées de façon hexagonale, comme observé *in vivo* à la surface du SC, ce qui permet de reproduire une caractéristique importante de la fonction barrière cutanée (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006).

La SFS a également été caractérisée par microscopie optique et numérique, afin, d'une part, de vérifier l'homogénéité du dépôt de lipides et d'autre part, d'étudier sa topographie. Cela nous a permis de déterminer ses paramètres de rugosité à l'aide d'images en trois dimensions. Les paramètres calculés définissent une morphologie de surface de la SFS très similaire à la peau *in vivo*, ce qui est indispensable pour pouvoir comparer des mesures de l'angle de contact entre ces deux surfaces.

Cette surface SFS ainsi caractérisée a été comparée à un modèle de référence pour l'étude des propriétés de surface de la peau, la Vitroskin® (VS). En comparaison de cette surface VS, la SFS possède de nombreux avantages. En effet, la topographie de la SFS faite de plateaux et sillons est identique à la peau *in vivo*, contrairement à celle de la VS, constituée de pics et protubérances, ce qui est très différent de la peau humaine. La SFS possède également ce dépôt des lipides cutanés, qui permettent d'une part d'obtenir une composition chimique de surface similaire à la peau mais aussi de mimer sa physico-chimie de surface, notamment son énergie libre. Ces lipides permettent ainsi de mimer l'extrême surface du SC et donc de reproduire les interactions entre la surface SFS et des produits topiques.

Pour compléter ces éléments et s'assurer de la performance de la SFS par rapport à la VS pour étudier la physico-chimie de la peau, des mesures de l'angle de contact entre des émouillants et diverses surfaces (SFS, VS et la peau *in vivo*) ont été réalisées. Ces mesures font partie des techniques instrumentales qui permettent de caractériser l'étalement des émouillants sur les diverses surfaces étudiées. Cette caractéristique est fondamentale pour l'étude de la qualité sensorielle de produits cosmétiques mais aussi pour l'étude de leur efficacité, notamment lorsqu'il s'agit de produits solaires (Draelos 2000; Fageon et al. 2009; Vergou et al. 2013; Savary, Grisel, and Picard 2013). En effet, la protection solaire apportée par un produit topique dépend très fortement de l'homogénéité du film formé en surface de la peau, celle-ci permettant d'assurer une bonne répartition des filtres solaires. L'étalement d'un produit sur la surface de la peau jouera un rôle important dans la formation d'un film homogène. L'utilisation d'un modèle de peau permettant d'étudier l'étalement d'émouillants serait donc d'un grand intérêt.

Les résultats obtenus sur SFS apparaissent plus proches de la peau *in vivo* que ceux obtenus sur VS, probablement en raison de la différence de topographie entre la VS et la peau *in vivo* et de l'hydratation très importante de cette surface, qui peut induire une plus forte interaction avec certains composés polaires. Ainsi, cette première étude physico-chimique démontre l'intérêt de la SFS par rapport à la VS.

En complément, des mesures de mouillabilité des surfaces après application de divers produits cosmétiques ont été réalisées. Cette étude permet de caractériser le résidu des produits topiques et d'évaluer leur persistance dans le temps. Les résultats obtenus démontrent, là encore, que la SFS est plus proche de la peau *in vivo* que la VS. Il semble donc que la SFS permet de reproduire avec une grande fidélité le film résiduel d'un produit tel qu'il pourrait être formé *in vivo*. Ceci ouvre de nombreuses perspectives pour la recherche cosmétique, pharmaceutique ou encore dermatologique. Il est possible, en utilisant ce modèle SFS, de reproduire le film résiduel de divers produits topiques et de le caractériser de façon beaucoup plus simple et répétable que sur la peau *ex vivo* ou *in vivo* d'un panéliste, pour ensuite étudier l'impact des propriétés de ce film sur la pénétration cutanée, sur son adhésion ou sur ses propriétés sensorielles.

Ces travaux démontrent donc l'intérêt que présente la SFS pour étudier les propriétés de surface de la peau. En plus des caractéristiques rappelées précédemment, la SFS ne nécessite pas de protocole d'hydratation préalable, par rapport à la VS. Ceci représente un avantage considérable pour les présents travaux mais aussi pour d'autres types d'études, puisque la VS se déshydrate très rapidement une fois sortie de sa chambre d'hydratation, et perd ses caractéristiques surfaciques intéressantes. De plus, la SFS est modulable, c'est-à-dire qu'il est possible d'ajuster sa composition lipidique pour s'adapter à un type de peau particulier (peau sèche, peau grasse ou encore peau atopique), et de modifier sa topographie pour s'adapter à une zone du corps. Nous nous sommes focalisés lors de ces travaux sur une topographie d'avant-bras, mais il est également possible de reproduire une peau avec des rides plus ou moins marquées et d'étudier par exemple l'impact du microrelief cutané sur la mouillabilité de la peau. L'intérêt que peut représenter cette SFS pour les études pharmaceutiques et cosmétiques nous a mené à protéger cette invention via un brevet européen déposé le 30 août 2018 (N° EP18306149.8).

A l'issue de ce chapitre, nous avons en main un outil indispensable qui sera utilisé dans la suite de ces travaux. Notamment, la SFS sera utilisée dans le cadre du projet Urbaskin pour évaluer l'impact des polluants atmosphériques sur la physico-chimie de surface de la peau, grâce à un protocole spécifiquement développé. Le chapitre suivant, portant sur l'étude de l'effet des polluants sur la peau, démontrera l'intérêt de cet outil dans la compréhension des phénomènes surfaciques impliqués dans l'interaction peau/polluants. Cette SFS sera également un élément clé dans la caractérisation du film résiduel des produits cosmétiques et dans la compréhension des phénomènes d'adhésion de particules modèles, présentées dans le chapitre 3 de cette partie.

Chapitre 2 – Compréhension de l'effet de polluants sur les propriétés de surface de la peau

Ce chapitre présente les résultats obtenus concernant l'impact des polluants atmosphériques sur les propriétés de surface de la peau. Il est divisé en deux parties, chacune consacrée à un modèle d'étude.

Dans un premier temps, les résultats obtenus sur modèle SFS seront exposés, à travers la publication « *Squalene oxidation induced by urban pollutants: impact on skin surface physico-chemistry* ». Cette publication présente le protocole de vieillissement d'un lipide spécifique, le squalène, mis au point afin d'évaluer l'effet des différents composés toxiques sur son oxydation et les conséquences de cette modification en termes de physico-chimie de surface.

Dans un second temps, l'effet de polluants sur la surface de la peau sera mis en évidence *ex vivo*, grâce au modèle de pollution développé par le Laboratoire BIO-EC. Les modifications surfaciques observées sur explants de peau seront expliquées à la lumière de la précédente étude menée sur SFS. Les conséquences de ces modifications sur la fonction barrière de la peau seront également étudiées et discutées. Le lien entre les effets des polluants observés en surface et en profondeur de la peau sera précisé, grâce notamment aux résultats obtenus par les partenaires du projet Urbaskin.

I. Oxydation de lipides en présence de polluants atmosphériques : impact sur la physico-chimie de la peau

Cette partie a fait l'objet d'une publication dans le journal Chemical Research in Toxicology

Le squalène, un important lipide sébacé, est une des premières cibles des polluants atmosphériques. En effet, il est abondamment présent en surface de la peau et est donc en contact direct avec l'environnement. De plus, il est le lipide le plus insaturé de la peau humaine, le rendant très prompt à l'oxydation (Pham et al. 2015). La mise en évidence de l'impact de la pollution sur la qualité de ce lipide est donc un élément clef pour comprendre comment des composés polluants peuvent modifier la surface de la peau.

Partant de ce constat, plusieurs conditions de vieillissement ont été testées afin de comprendre l'impact de deux types de polluants sur l'oxydation du squalène : un composé HAP, le benzo(a)pyrène, et des métaux lourds, le plomb et le nickel. Les deux conditions testées sont les suivantes : une exposition du squalène à 60°C à l'obscurité (notée E) et une exposition à la lumière du jour et à température ambiante (notée L). L'objectif était de trouver

des conditions de vieillissement suffisantes pour observer un effet des polluants, sans détériorer le squalène de la solution témoin. Ainsi, des analyses RMN ^1H ont été réalisées sur les solutions S1E et S1L (solutions témoins ne contenant que du squalène, décrites dans la partie 2) après respectivement 15 jours et 45 jours de vieillissement dans les conditions citées précédemment (Figure 34).

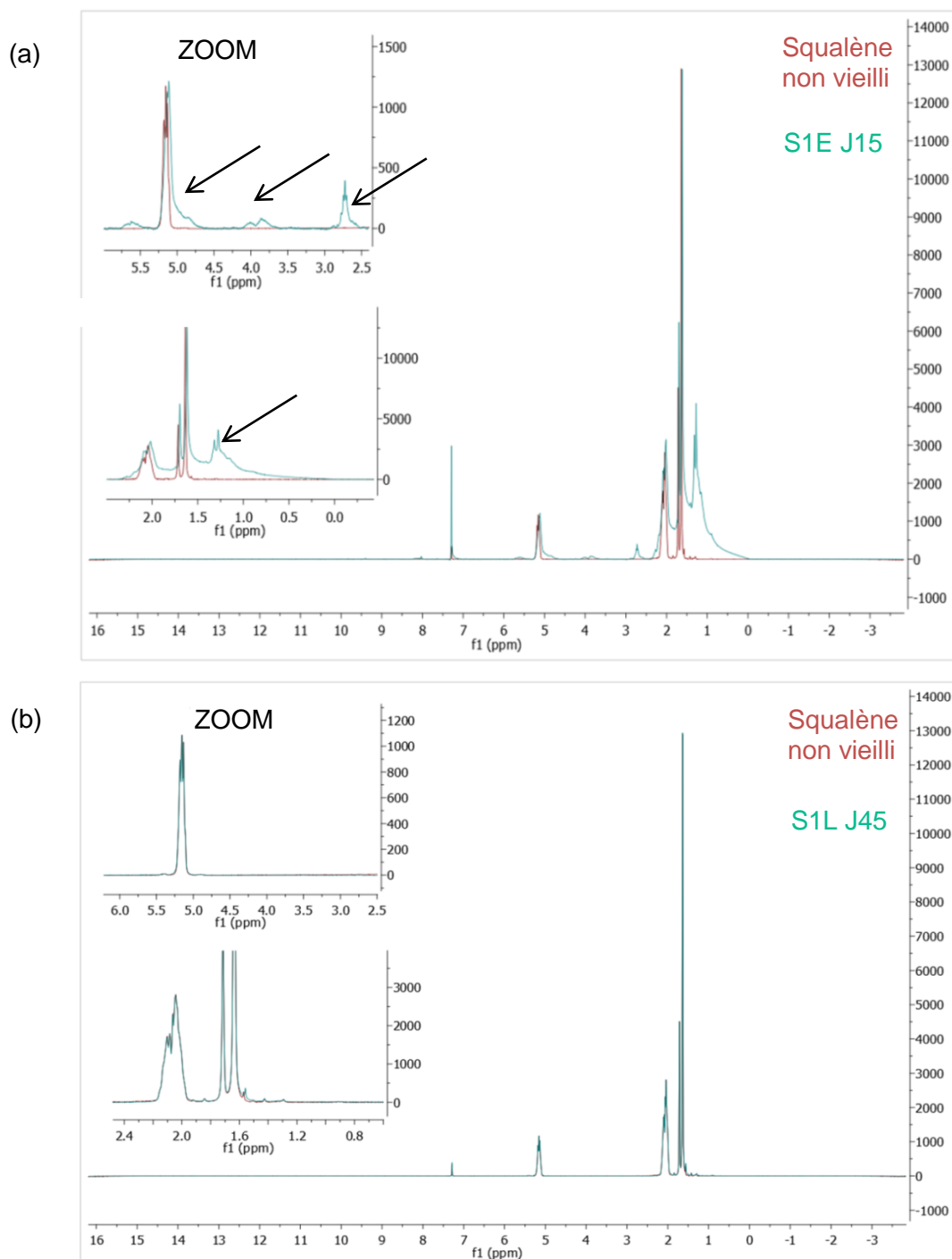


Figure 34. Superposition des spectres RMN ^1H (a) du squalène avant vieillissement et 15 jours après vieillissement dans les conditions (E) ; (b) du squalène avant vieillissement et 45 jours après vieillissement dans les conditions (L).

Les signaux indiqués par des flèches noires (Figure 34) correspondent à la formation de composés de dégradation. Il apparaît donc clairement sur cette Figure 34 que la solution S1E est déjà très détériorée dès 15 jours de vieillissement alors que la solution S1L semble très peu affectée même après 45 jours de vieillissement.

Ainsi, les résultats obtenus indiquent que les conditions (E) sont très oxydantes, et qu'il sera par conséquent difficile de discerner l'oxydation due aux polluants de l'oxydation naturelle du squalène. En revanche, dans les conditions (L), si une oxydation est observée en présence de polluants, elle sera belle et bien due à ces polluants, puisque l'oxydation naturelle du squalène s'avère très limitée dans ces conditions.

Ceci est confirmé par les spectres RMN ^1H présentés dans la figure ci-dessous (Figure 35) enregistrés après vieillissement des solutions. Les niveaux de dégradation de la solution témoin S1E et de la solution S3E contenant les métaux lourds sont très similaires après 15 jours dans les conditions (E) (Figure 35 (a)) tandis que la différence de qualité entre les solutions S1L et S3L est très significative dans les conditions (L) après 45 jours de vieillissement (Figure 35 (b)).

Le choix s'est donc porté vers les conditions de vieillissement (L) permettant de mettre en évidence l'oxydation du squalène due aux polluants. Les résultats obtenus concernant l'impact des polluants sur l'oxydation lipidique sont détaillés dans l'article suivant.

L'objectif a ensuite été de mettre en évidence et de comprendre l'impact de l'oxydation du squalène sur la physico-chimie de surface de la peau, en utilisant la SFS comme support d'analyse. La méthodologie développée et les résultats obtenus sont également décrits dans l'article.

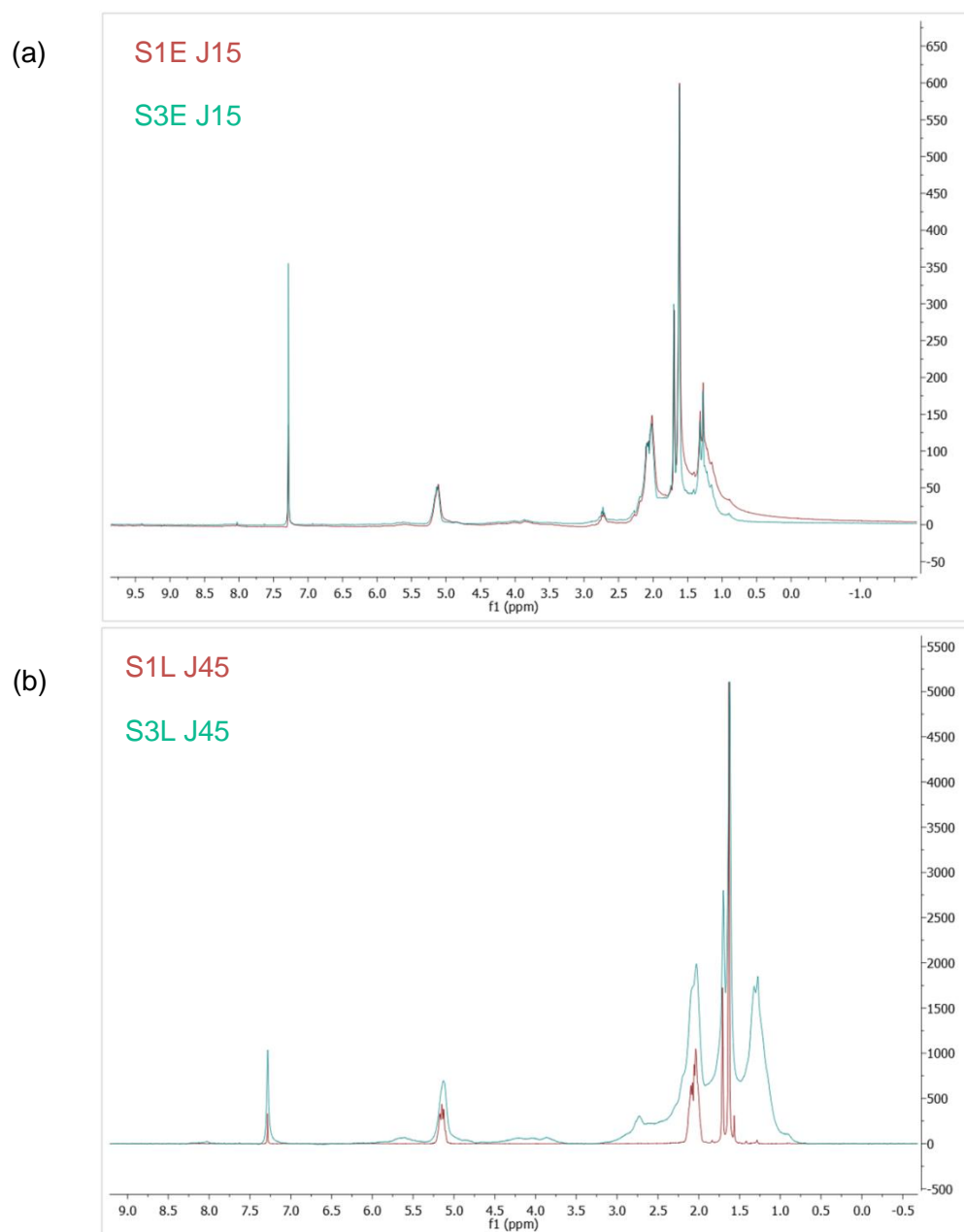


Figure 35. Spectres RMN 1H de (a) S1E et S3E après 15 jours dans les conditions (E) et (b) S1L et S3L après 45 jours dans les conditions (L) : effet du protocole de vieillissement

Squalene oxidation induced by urban pollutants: impact on skin surface physico-chemistry

EUDIER Florine, HUCHER Nicolas, PICARD Céline, SAVARY Géraldine*, GRISEL Michel*

*Normandie Univ, France; UNILEHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, EA 3221, 25 rue
Philippe Lebon BP 1123, 76063 Le Havre cedex, France*

*Corresponding authors geraldine.savary@univ-lehavre.fr,
michel.grisel@univ-lehavre.fr

Keywords

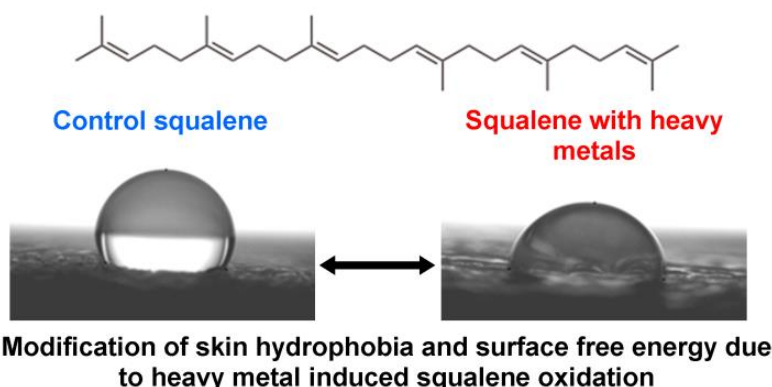
Squalene - lipid oxidation – mass spectroscopy - physico-chemistry – advancing contact angle – surface characterization – skin models

Highlights

- The presence of benzo-(a)-pyrene and heavy metals accelerates squalene degradation as highlighted by LC-MS analysis.
- Degraded squalene induces decreasing of skin hydrophobia as demonstrated by contact angle measurements performed on a non-biological human skin model.
- Among the two pollutants, heavy metals have the highest impact on skin physico-chemistry.

Table of Contents

Squalene aged 45 days, under day light and room temperature



Abstract

The effect of urban pollutants on skin properties has been revealed through several epidemiological studies. However, comprehension of involved mechanisms remains undetermined. In addition, the impact of such stressors on skin surface properties, especially skin physico-chemistry has not been investigated. Consequently, the present study aims to develop a new ageing protocol able to highlight the impact of selected urban pollutants on a model sebaceous lipid: the squalene. Its quality has been followed during ageing using LC-MS analysis. Results showed that the quality of the control solution containing only squalene remains stable during 45 days whereas the quality of the solution containing squalene mixed with pollutants appears greatly altered, especially in the presence of heavy metals: a large amount of oxidation compounds was evidenced, due to oxidation and dehydrogenation mechanisms.

In addition, a physico-chemical study was performed using a validated non-biological skin model, able to mimic skin physico-chemistry. Surface free energy components were calculated using contact angle measurements according to the Van Oss model. The application of degraded squalene significantly increased skin hydrophilic and monopolar behavior comparing to the application of control squalene. Those modifications are essentially explained by the nature of squalene oxidation products. It has to be noted from this study that squalene oxidation due to pollutants or due to high temperature did not lead to the same physico-chemical consequences neither to the same oxidation products, as shown by thermal analysis.

This study gives original and precious information to explain alterations induced by pollutants on skin surface properties, especially skin chemistry and physico-chemistry.

Introduction

The effect of pollution on skin is gaining interest since the last years. Epidemiologic studies evaluated the effect of pollutants such as ozone, particulate matters, heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, sulfur oxides, nitrogen oxides etc.

Several effects have been highlighted such as the acceleration of skin ageing, through the formation of more pronounced wrinkles and the formation of lentigines¹⁻³, the increase in skin disorders frequency (atopic dermatitis, symptoms of sensitive skin)⁴⁻⁶ and the modification of some physiological parameters such as skin surface pH or sebum excretion rate⁷⁻⁹. Those phenomenon can be explained by two mechanisms: the generation of an oxidative stress due to reactive oxygen species formation¹⁰⁻¹² and the activation of the aryl hydrocarbon cellular receptor^{13,14}.

Regarding skin surface properties, the impact of pollutants remains unknown. Further studies are consequently needed to deepen the comprehension of involved mechanisms and to highlight and understand possible alterations induced by pollutants on skin barrier function. As a first approach, this study focuses on skin surface lipids, whose role in skin barrier function is undeniable¹⁵. In particular, human sebum which is abundantly present on skin face is one of the first targets for external aggressors such as UV radiation^{16,17} or ozone^{12,18}. Sebum, with water from environment and sweat, form the hydrolipidic film which covers the skin surface. Its role is to protect human skin against excessive water loss and to reinforce its barrier function¹⁵. Any alteration of this external skin constituent implies modifications of the skin barrier function.

The present study focuses on a particular sebaceous lipid, the squalene, of molecular formula C₃₀H₅₀. It is a specific lipid of human sebum and is an intermediary molecule involved in cholesterol, hormones and vitamin D biosynthesis¹⁹. Squalene is the most unsaturated molecule of the lipids class, so it is readily oxidable²⁰. Consequently, it is indispensable to understand which impact urban pollutants can have on squalene and sebum quality. Indeed, according to Pham²⁰, squalene oxidation can have several consequences for human skin: squalene peroxides can induce comedogenesis and inflammatory acne. The comedogenicity of squalene oxidation products has also been reviewed by Chiba²¹.

The impact of ozone on human lipid oxidation and specifically on squalene oxidation has been largely studied and recognized^{6,18,22-24}. However, the impact of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on human skin lipid quality remains poorly investigated, despite their undeniable toxicity to the skin^{25,26}. So, the aim of this study is to develop an ageing protocol with the aim to evidence the impact of selected urban pollutants on squalene. The squalene molecule modification was followed using liquid chromatography and mass spectroscopy in order to validate the developed protocol. In addition, the effect of squalene degradation induced by pollutants on skin physico-chemistry was studied with using a non-biological skin model specifically developed to mimic skin physico-chemistry. Degraded and non-degraded squalenes were applied on the surface and contact angle measurements performed with three reference liquids to calculate surface free energy (SFE). Modifications observed were discussed and completed by thermal analysis.

Material and methods

Chemicals used

Ageing protocol

Squalene (>98% purity), Benzo(a)pyrene (B(a)P, >96% purity), lead (Pb powder, >99.95% purity) and nickel (Ni, >99% purity) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri).

Liquids for LC/MS analysis

Acetonitrile (ACN), formic acid (HCOOH), and dichloromethane were supplied by Fisher Scientific SAS (Illkirch, France) and were all of the high purity grade Optima®. Water used is UV-treated ultrapure water (resistivity of 18 MΩ.cm⁻¹ at 25°C).

Liquids for contact angle measurements

Three reference liquids were used to perform surface free energy calculation: ultrapure water (resistivity of 18 MΩ.cm⁻¹ at 25°C), diiodomethane (analytical grade, 99% purity) and formamide (analytical grade, 99% purity) (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri). Their SFE components values are reported in table 1.

Table 1. SFE components of water, diiodomethane and formamide ²⁷.

Liquid	γ_L (mJ.m ⁻²)	γ_L^{LW} (mJ.m ⁻²)	γ_L^+ (mJ.m ⁻²)	γ_L^- (mJ.m ⁻²)
Water	72.8	21.8	25.5	25.5
Diiodomethane	50.8	50.8	0.7	0.0
Formamide	58.0	39.0	1.9	47.0

Protocols of exposure**Squalene ageing in presence of pollutants**

Solutions were prepared in 20.7 mL vials hermetically sealed with a Teflon septum, mixed using a mechanical stirrer at 400 rpm/min at ambient temperature ($T = 22 \pm 1.5^\circ\text{C}$) and under day light. Solutions compositions as described in table 2 were prepared in triplicate for each condition. Analyses were performed after 15, 30 and 45 days of ageing.

Table 2. Composition of the exposure solutions

Condition	Composition
S1	Squalene 0.5 g
S2	Squalene 0.5 g + B(a)P 10 mg
S3	Squalene 0.5 g + Pb 10 mg + Ni 10 mg

Squalene ageing under high temperature

Solutions containing only 1 g of squalene were prepared in 20.7 mL vials hermetically sealed with a Teflon septum and stirred at 60°C under obscurity. Analyses were performed after 7 and 15 days of ageing.

Analyses methods***LC-MS analyses****Sample preparation*

7 mg of solutions previously described were dissolved in 1 mL of a solvent mixture dichloromethane/acetonitrile 1:1. Resulting mixture is filtered using a PTFE membrane filter (0.22 µm porosity) (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France) and directly used for analysis. Each sample was injected twice in LC-MS apparatus, to repeat and confirm spectra and chromatograms obtained.

Separation conditions (HPLC)

HPLC separations were performed at 25°C on a UHPLC Agilent serie 1290 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) monitored by Agilent MassHunter software (for acquisition and analysis). Injections of 5 µL were made into a Poroshell 120 EC-C18 column (Agilent Technologies), 2.1 x 55 mm, 2.7 µm particles size. A mobile phase H₂O/ACN doped with 0.1% HCOOH has been used at 0.4 mL/min. A ratio H₂O/ACN 50:50 was used from 0 min to 5 min, then increased to reach a 0:100 ratio at 8 min and held up to 17 min.

Ionization conditions (Mass spectroscopy)

Mass spectroscopy (MS) was performed on a mass spectrometer Agilent Q-ToF 6530 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) monitored by Agilent MassHunter software (for acquisition and analysis). Samples were introduced into the MS by HPLC stream. Ionization source was an APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) source in positive ion mode. Conditions were, after optimization, defined as follow: vaporization gas (N₂) 500°C, drying gas (N₂) 325°C at 8 L/min under 35 psi, corona discharge needle 4 µA, capillary voltage 1900 V, fragmentor voltage 160 V. Acquisition was performed between 50 and 1700 m/z. The QToF mass analyzer was operating at a resolving power of about 20000 at m/z 622.

Generation of compounds molecular formulas

Compounds were identified by molecular feature from mass spectra, thanks to the software algorithm. Selected peaks had height higher than 5000 counts. Positive ions species with H⁺,

Na^+ K^+ and NH_4^+ adducts were included. Molecular formulas were generated from identified compounds list using the following rules: carbon number = 30; hydrogen number between 0 and 62; oxygen number between 0 and 30; nitrogen number between 0 and 30. All molecular formulas retained had a MGF (Mascot Generic Format) score higher than 50 and a likely composition (based on both exact mass and isotopic distribution). None of the retained compounds contains nitrogen, thus the retained general molecular formula of identified compounds is $\text{C}_{30}\text{H}_x\text{O}_y$, representing the squalene peroxides^{20,28}. Those identified compounds represent at least 25% of the Total Ion Current recorded for each sample.

Physico-chemical study

Model surface

Model surface used is a non-biological human skin model specifically developed to mimic skin physico-chemistry²⁹. This surface is composed of two elements: an artificial skin made with silicon material reproducing skin surface micro topography, coated with an artificial lipid mixture (see fig 1).

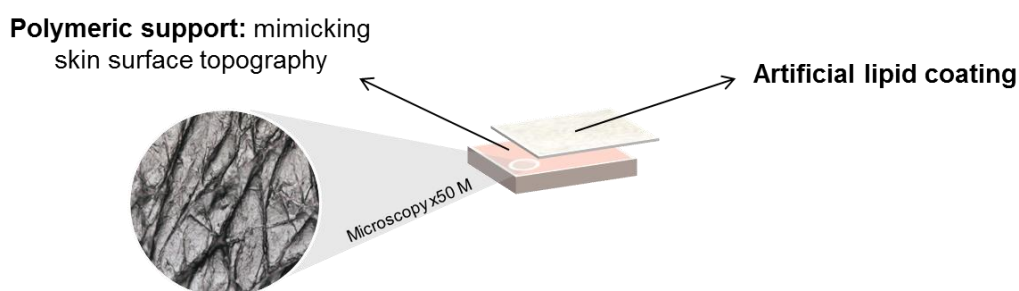


Figure 1. Presentation of the model surface: an artificial skin made with silicon coated with an artificial sebum²⁹.

Preparation protocol for the silicon support is described in details in²⁹. In the present work, the silicon support has been coated with the different squalene solutions described in table 2 after 45 days of ageing, using a thin pencil to apply liquid mixture on the silicon support, at ambient temperature. Excess of squalene was wiped off using absorbent paper.

Advancing contact angle measurements

Contact angle measurements were performed using a portable goniometer PGX+ (ScanGaule, Gravigny, France) connected to the PGPlus software. This goniometer is equipped with a high resolution camera to acquire images, with a specific lightning system associated with a mirror to visualize the droplet. The syringe used for droplets deposition has an intern diameter of 0.77 mm.

Measurements were performed at room temperature ($22 \pm 1.5^\circ\text{C}$). Advancing contact angle θ_A is the highest value of contact angle measured prior to drop baseline displacement when

the drop volume is increased. A small liquid drop was deposited on the surface and its volume was increased by the addition of five successive drops^{30,31}. The final drop reached a volume of approximately 7 μ L. Five pictures were taken immediately after the addition of each drop. Contact angle from both sides of the drop were calculated using the software program. θ_A was then the maximum value obtained from the mean of both sides of drop among these five pictures. Advancing contact angle measurements for each liquid were performed at least in triplicate.

Surface free energy determination

The Van Oss model was used to determine the SFE,^{27,32,33}. This allows splitting SFE into two components: the Lifshitz-Van der Waals component (γ^{LW}), which represents the Van der Waals interactions (Keesom, Debye, London), and the acid-base component (γ^{AB}), representing the acidic and basic interactions, according to the Lewis concept:

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (1)$$

Where acid-base component can be expressed by the geometrical mean of two parameters: γ^+ (electron acceptor) and γ^- (electron donor):

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-} \quad (2)$$

This last component includes the hydrogen bonding and the π -electron interactions.

SFE can be calculated from contact angle measurements using the Young equation:

$$\gamma_L \cos \theta = \gamma_S - \pi_e - \gamma_{SL} \quad (3)$$

Where γ_L is the liquid surface tension, θ is the contact angle, γ_S is the solid SFE, π_e the film pressure of the liquid and γ_{SL} the interfacial SFE. "L" and "S" refer to liquid and solid respectively. π_e can be neglected for low energy solids like skin³⁴.

According to Van Oss, the interfacial SFE can be expressed as follow:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S^{LW} + \gamma_L^{LW} - 2\sqrt{\gamma_S^{LW}\gamma_L^{LW}} + 2(\sqrt{\gamma_S^+\gamma_S^-} + \sqrt{\gamma_L^+\gamma_L^-} - \sqrt{\gamma_S^+\gamma_L^-} - \sqrt{\gamma_S^-\gamma_L^+}) \quad (4)$$

Combining equations (1), (2), (3) and (4), the Young equation can be written:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_L = 2\sqrt{\gamma_L^{LW}\gamma_S^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_L^+\gamma_S^-} + 2\sqrt{\gamma_L^-\gamma_S^+} \quad (5)$$

SFE of the solid surface can thus be determined using at least three reference liquids of known components values (table 1).

Thermal analysis

Thermogravimetric analyses have been performed on a Setsys apparatus (Setaram Instrumentation, Caluire-et-Cuire, France), equipped with the Calisto software (version 1.54a, Setaram Instrumentation, Caluire-et-Cuire, France). About exactly 15 mg of squalene sample are weighted in an alumina crucible. Heating procedure is performed under air atmosphere as follow:

- Equilibration at 100°C during 10 min
- Temperature ramp from 100°C to 900°C at a rate of 20°C/min
- Isotherm at 900°C during 10 min

Additional thermal analyses have been performed using a differential scanning calorimeter Pyris 1 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA), controlled by the Pyris software (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Around 6 mg of sample were weighted in an aluminum pan and sealed. Another empty aluminum pan served as reference. Heating protocol was the following:

- Equilibration at -80°C during 2 min
- Temperature ramp from -80°C to 100°C at a rate of 10°C/min
- Isotherm at 100°C during 1 min.

Statistical analysis

Statistical analysis of difference observed has been performed using XLSTAT software, from Addinsoft (version 2012.1.01). One factor analyses of variance (ANOVA) were performed on instrumental data to evaluate the effect of squalene treatment on its degradation or on surface physico-chemistry.

Results and discussion

The present study is divided into two parts. The first part deals with the development of an ageing protocol with the aim to model the exposition of human sebum lipids to urban pollutants. Selected urban pollutants (B(a)P, nickel, lead) and a model sebaceous lipid (squalene) were used to this purpose. The squalene degradation was followed during several days thanks to LC-MS analysis. The second part aims to evaluate the physico-chemical consequences of this squalene degradation using a skin surface model.

Squalene ageing in presence of urban pollutants

Samples of each solution were prepared as previously described and analyzed by LC-MS after 15, 30 and 45 days of ageing. Squalene peroxides, hydroxides or their isomers are primary oxidation products of lipids³⁵ and thus are reliable markers of squalene oxidation or degradation^{20,28}. Those degradation compounds have already been used to follow the

impact of UV exposure on squalene quality. They represent one of the major issues of squalene degradation for human skin because they are highly related to comedogenesis²⁰.

Squalene molecular formula being $C_{30}H_{50}$, its peroxide or hydroxide derivatives belong to the family of compounds of general molecular formula $C_{30}H_xO_y$. Thus, on fig 2 are given the number of identified compounds of this general molecular formula, present in the three solutions S1, S2 and S3 (see description on table 3). This number of identified compounds is consequently indicative of the ageing process: the higher the number of identified compounds, the more squalene oxidized^{20,28}. Some degradation compounds can own shorter carbon chain, but they are more volatile and thus will less affect skin surface. Compounds with longer carbon chain could also be observed due to termination step of oxidation mechanism, but in a lesser extent than compounds with C_{30} chain.

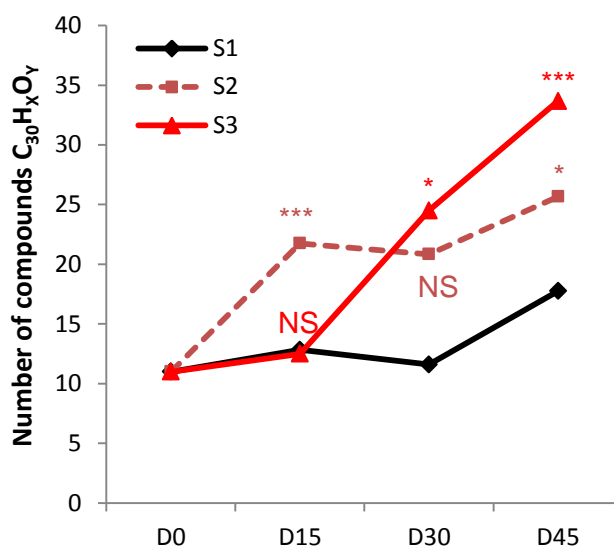


Figure 2. Number of identified compounds of general molecular formula $C_{30}H_xO_y$ in each solution after 15, 30 and 45 days of ageing. D0 corresponds to the native squalene used.

*NS: non-significant compared to S1; * $p < 0.05$ compared to S1; *** $p < 0.001$ compared to S1; **** $p < 0.0001$ compared to S1*

As evidenced on fig 2, at D15, solution S2 containing B(a)P owned a number of compounds significantly higher than solutions S1 (control solution) and S3 (containing heavy metals). Squalene degradation was so initiated for S2, whereas it remained low for solutions S1 and S3. Focusing on compounds formula presented in table A (supplementary data) for each solution at D15, S2 contained more dehydrogenated and oxygenated compounds such as $C_{30}H_{46}O$ or $C_{30}H_{34}$. Nonetheless, S3 contained one more dehydrogenated compound $C_{30}H_{34}$ when compared to S1.

After 30 days of ageing, the situation was reversed as squalene present in S3 was statistically more deteriorated than the one contained in both S2 and S1. For solution S2,

dehydrogenation continued, as highlighted by the formation of $C_{30}H_{32}$, $C_{30}H_{40}$ and $C_{30}H_{42}$, absent at D15 (table A, supplementary data). For S3, the number of identified compounds quickly increased, with a number of oxygenated compounds such as $C_{30}H_{38}O$ or $C_{30}H_{48}O_3$ formed between 15 and 30 days (table A, supplementary data).

After 45 days of ageing, solution S3 was finally the most depreciated ($p = 0.0002$). According to fig 3, which shows chromatograms obtained at D45, signal associated to squalene was reduced for S3 and the signals intensities at shorter retention time was higher if compared to S2 and to S1. Those signals correspond to more polar compounds produced during squalene degradation.

Based on the above results, we demonstrated that the protocol developed for studying the squalene degradation is well adapted to this study: we decided to work here with mild conditions in such a way that are sufficient to observe an effect of pollutants on squalene oxidation but with no marked alteration of the control solution S1 (no statistical difference between D15, D30 and D45). For instance, working at higher temperatures greatly accelerates squalene degradation. Thus, it would have been impossible to distinguish the effect of pollutants because of the high oxidation of control solution (data not shown).

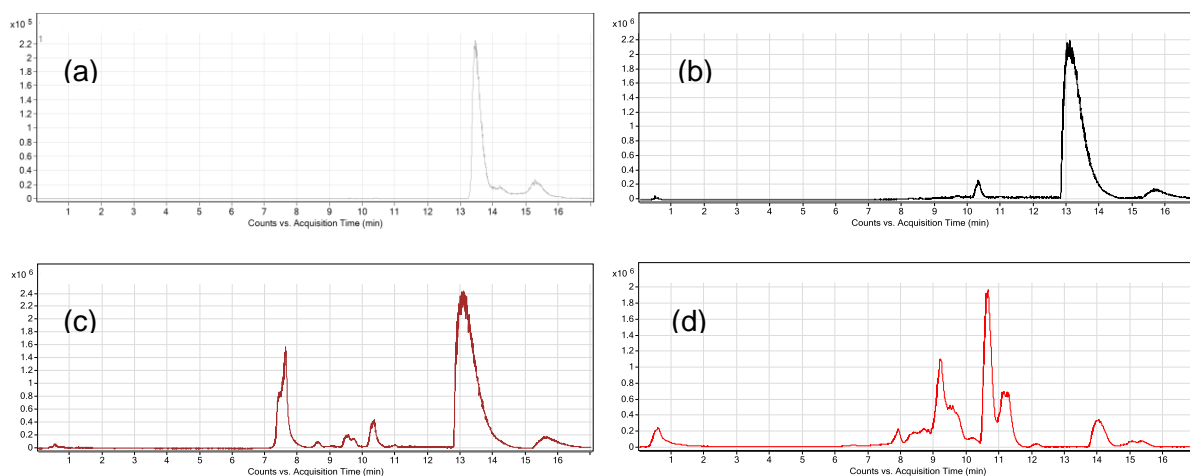


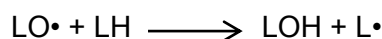
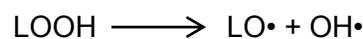
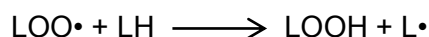
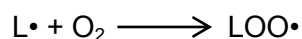
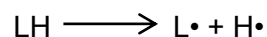
Figure 3. (a) extracted-ion chromatogram 411.39 m/z corresponding to squalene; Base peak chromatogram obtained after 45 days of ageing for (b) S1; (c) S2; (d) S3.

Table 3. Identified compounds formula present in solutions at D45. The presence in solution S1, S2 and/or S3 is indicated with a X. The bold font indicate compounds present only in S3, the italic font indicate compounds present only in S2. The underline formula corresponds to squalene molecule.

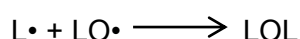
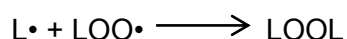
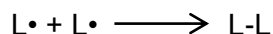
D45			
	S1	S2	S3
<i>C30 H32</i>		X	
<i>C30 H34</i>		X	
C30 H40	X	X	X
C30 H40 O			X
C30 H40 O4			X
C30 H42	X	X	X
C30 H42 O			X
C30 H42 O4			X
C30 H44	X	X	X
C30 H44 O			X
C30 H44 O3			X
C30 H46	X	X	X
C30 H46 O		X	X
C30 H48	X	X	X
C30 H48 O	X	X	X
C30 H48 O2		X	X
C30 H48 O3			X
<u>C30 H50</u>	X	X	X
C30 H50 O	X	X	X
C30 H50 O2		X	X
C30 H50 O3			X

According to obtained results, the effect of pollutants on squalene quality is undeniable as their presence induced an increasing in the formation of degraded compounds due to oxygenation or dehydrogenation. Heavy metals (Pb and Ni) seemed to have a higher effect on squalene quality as the number of identified compounds at D45 was more important in the presence of heavy metals when compared to B(a)P. In addition, squalene proportion was drastically decreased comparing to degraded products in the presence of heavy metals, as highlighted by squalene associated signal depletion on D45 chromatogram (fig 3 (d)).

The toxicity of lead and nickel is known to derive from their catalytic role in lipids peroxidation³⁶. This mechanism is described as follow^{35,37} where LH is referred to lipids:



Termination step can occur via different radical recombination ³⁵:



This lipid peroxidation involves several mechanisms (oxidation, electron transfer, hydrogen abstraction, cyclization ...) which can explain the occurrence of compounds with 1 or 2 oxygen atoms, corresponding to epoxide, hydroxide and/or peroxide functions such as $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ or $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ (shown in table 3). Other products such as hydroperoxide squalene can be formed ³⁵, explaining the formation of compounds owning more than two oxygen atoms, such as $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$. As this study focuses on compounds containing 30 carbons, known to be markers of squalene degradation ²⁰, compounds issued from the termination step have not been highlighted.

Additional MS/MS analyses have been performed for some compounds in S1, S2 and/or S3 to evaluate possible structure. The structures presented in fig 4 are example of compounds plausibly present in S2 and/or S3. For instance, the fragmentation of a compound of composition $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$ whose exact mass is 442.38 Da lead to the formation of fragments whose exact masses are 425.38 Da and 407.36 Da (among others). The first fragment corresponds to the loss of an $-\text{OH}$ structure (-17.00 Da) and the second fragment corresponds to the loss of $-\text{H}_2\text{O}$ structure (-18.02 Da). This is thus consistent with the compound structures shown on fig 4(b)). Other fragmentations performed confirm the likely formation of previously described compounds, which are in agreement with literature data ^{16,38}.

A dehydrogenation process leading to the formation of compounds such as $\text{C}_{30}\text{H}_{48}$ or $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$ is observed in presence of metals but above all in presence of B(a)P were $\text{C}_{30}\text{H}_{32}$ and $\text{C}_{30}\text{H}_{34}$ are formed. This reaction induces additional carbon-carbon double bonds, thus conjugated with double bounds already presents in squalene structure. Dehydrogenated compounds are consequently stabilized by this conjugation phenomenon.

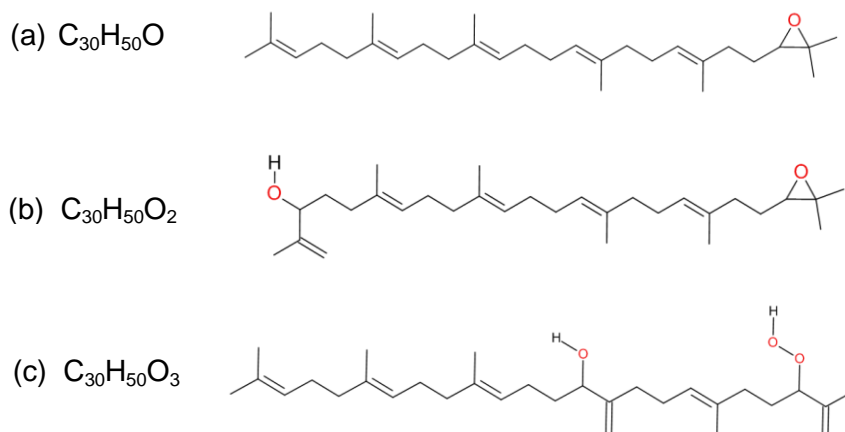


Figure 4. Possible structure of an isomer for three different squalene degradation products, as highlighted by MS/MS analyses.

This study highlights the impact of selected pollutants on squalene composition and validates the protocol developed to understand the impact of pollutants on skin surface conditions. From this first part of the study, we can already conclude that pollutants accelerate the degradation process of the selected model lipid, squalene. The second part of this study focuses on physico-chemical modifications of squalene when applied on skin surface as induced by pollutants and oxidation reactions.

Impact of squalene oxidation on skin physico-chemistry

Sebaceous lipids play a key role on skin surface properties, especially from physico-chemical aspects. The fact that squalene, an important sebaceous lipid, can be highly degraded by urban pollutants indicate that they could also induce skin surface modifications.

Oxidized squalene at ambient temperature in presence of pollutants

To evidence the effect of squalene degradation on skin physico-chemistry, fresh squalene and each previous solution S1, S2 and S3 at D45 were applied onto the non-biological skin model described in Materials and Methods section. This model surface allows mimicking skin physico-chemical modifications thanks to its surface chemistry and topography. It has the advantage to be reproducible and easy to use²⁹. Sessile drop contact angle after squalene application was measured for the three standard liquids water, diiodomethane and formamide (see fig 5).

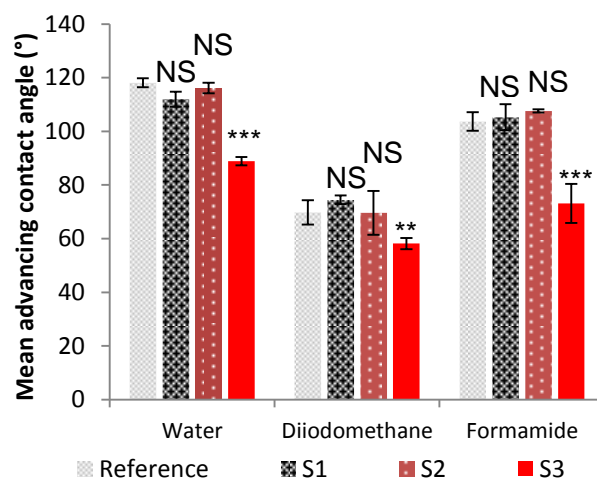


Figure 5. Contact angle measurements performed on the model surface after the application of S1, S2 and S3; comparison with a non-degraded squalene.

According to those results, squalene aged in S1 and S2 conditions did not significantly impact surface physico-chemistry. On the other hand, the application of solution S3 after 45 days of ageing significantly impacted the contact angle for water, diiodomethane and formamide (ANOVA, $p < 0.0001$; $p = 0.002$; $p < 0.0001$ respectively). This confirms that heavy metals have the highest impact on squalene oxidation. Among three tested ageing conditions, they are the only factor impacting surface physico-chemistry.

To deepen the comprehension of the impact of oxidation in presence of heavy metals on surface physico-chemistry, SFE parameters have been calculated for solution S3 at D45 once applied onto the polymeric support (fig 6). As solution S3 contains degraded squalene and heavy metals, a comparison was made between S3 at D0 and S3 at D45; this allowed focusing on the lonely effect of ageing with preventing any modifications induced by the presence of heavy metals. Thus, modifications observed are only due to ageing phenomenon.

Surface free energy determined for S3 at D0 is $\gamma_{S3_D0} = 35.8 \pm 2.6$ mJ/m², higher than the one calculated for S3 after 45 days of ageing $\gamma_{S3_D45} = 28.7 \pm 2.1$ mJ/m² (difference statistically significant, $p = 0.02$). Although only a slight and non-significant decrease of the Lifshitz-Van der Waals component (γ^{LW}) is observed, the other surface energy components show marked differences. On the one hand, the electron donor components (γ^-) is significantly increased ($p = 0.04$) while on the other hand the electron acceptor component (γ^+) is largely reduced ($p < 0.001$). Therefore, the monopolar basic behavior of the surface mimicking skin physico-chemistry is globally reinforced.

The increase in the electron donor component means that electron density is increased at the extreme surface. This is consistent with the molecular formulas and products structures

owning carbonyls, hydroxyl or epoxide functions as evidenced in the previous paragraph. Such polar groups enriched in electrons promote the surface to form new hydrogen bonding, increasing interactions with polar liquid such as water and formamide. In addition, dehydrogenation observed also increases electron density through the formation of new carbon-carbon double bond, contributing to the electron donor behavior³⁹ and decreasing the proton donor ability leading to the decrease in γ^+ . Those phenomena explain the monopolar basic behavior of the surface which modifies the way it can interact with external compounds. Indeed, it can induce repulsion with other monopolar basic compounds, which are frequently encountered among materials³⁹.

Furthermore one can notice that the total acid-base component $\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$ significantly decreases after 45 days of ageing ($\gamma^{AB}_{S3_D0} = 5.4 \pm 0.9$; $\gamma^{AB}_{S3_D45} = 2.0 \pm 0.5$; $p = 0.005$); this can be explained by the important decrease in γ^+ . Combined to the decrease in the Lifshitz-Van der Waals component, this leads to a decrease in the total SFE.

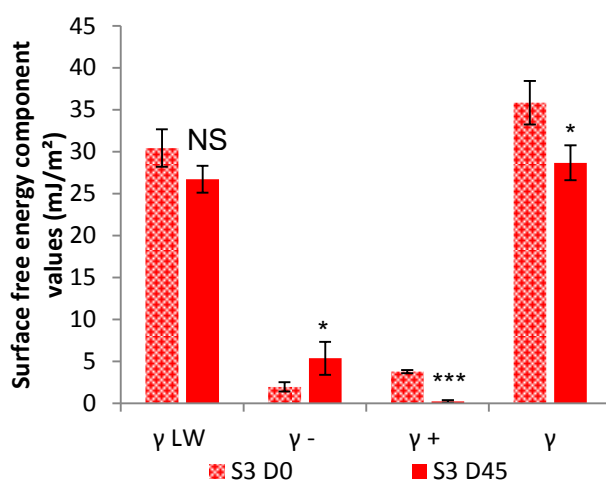


Figure 6. Comparison of SFE components values for S3 at D0 (containing fresh squalene and heavy metals) and S3 at D45 (containing aged squalene and heavy metals).

Surprisingly γ^{LW} parameter does not significantly decrease. Although this component characterizes the Keesom, Debye and London forces, it is actually mainly governed by the London dispersive force as the two other forces contribution remain negligible. The γ^{LW} slight decrease may suggest that the dispersive interactions ability of the surface is lowered³⁹. According to Van Oss and coworkers, this component can be referred as the “apolar” component of the surface free energy. Its minor decrease, even no significant, may be attributed to the formation of the more polar compounds thus partially hiding the apolar interactions.

The above results confirm that heavy metals have a huge impact on squalene ageing, those pollutants inducing modifications of squalene-coated surface physico-chemical properties. The changings of the surface physico-chemistry lead to conclude that the presence of heavy metals can modify skin surface condition by degrading its chemical and physical properties. The modifications of skin SFE necessarily alter its barrier function and its permeability²⁷. Indeed, skin permeation appears highly related to the affinity of compounds with the skin surface. Any alteration in skin surface free energy may thus induce changes in skin permeability.

Squalene oxidation at 60°C: confirmation of observed phenomenon?

In order to compare phenomenon observed with oxidized squalene in presence of heavy metals with a classic oxidation process, squalene was kept under stirring at 60°C for 2 weeks without pollutants. Potential degradation processes were followed by LC-MS analyses, as shown on fig 7.

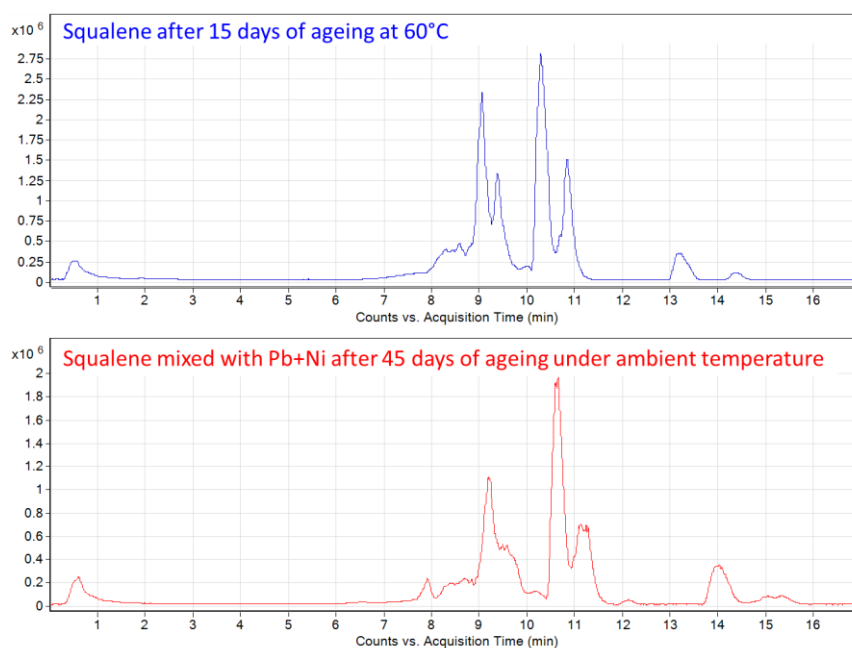


Figure 7. Base peak chromatogram obtained after 15 days of ageing of squalene at 60°C compared with base peak chromatogram obtained for S3 after 45 days.

Degradation intensity seems similar to the one observed for solution S3 at D45: the signal associated to squalene is depleted and a number of new compounds are formed that are visible at shorter retention times, thus corresponding to more polar species. Mass spectroscopy analyses confirm the formation of oxidized and dehydrogenated compounds, as in solution S3 after 45 days of ageing, whose compositions are similar to the one presented in table 3. Consequently, those two ageing protocols can be compared in terms of resulting squalene quality.

Contact angle measurements were performed on the non-biological skin model after application of oxidized squalene at 60°C, following the same protocol as described previously.

As shown on fig 8(a), the presence of degraded squalene on the model surface decreases the contact angle measured for the three liquids, in comparison with a non-degraded squalene. Differences observed appear statistically significant no later than after 1 week (ANOVA, $p < 0.001$). Consequently, squalene degradation occurring at 60°C impacts the model surface physico-chemistry, this being consistent with results previously observed for solution S3.

If considering the corresponding SFE modifications (fig 8(b)), an increasing in the different components was observed after one week for LW component ($p = 0.04$), electron donor component ($p = 0.02$) and also total SFE ($p = 0.02$).

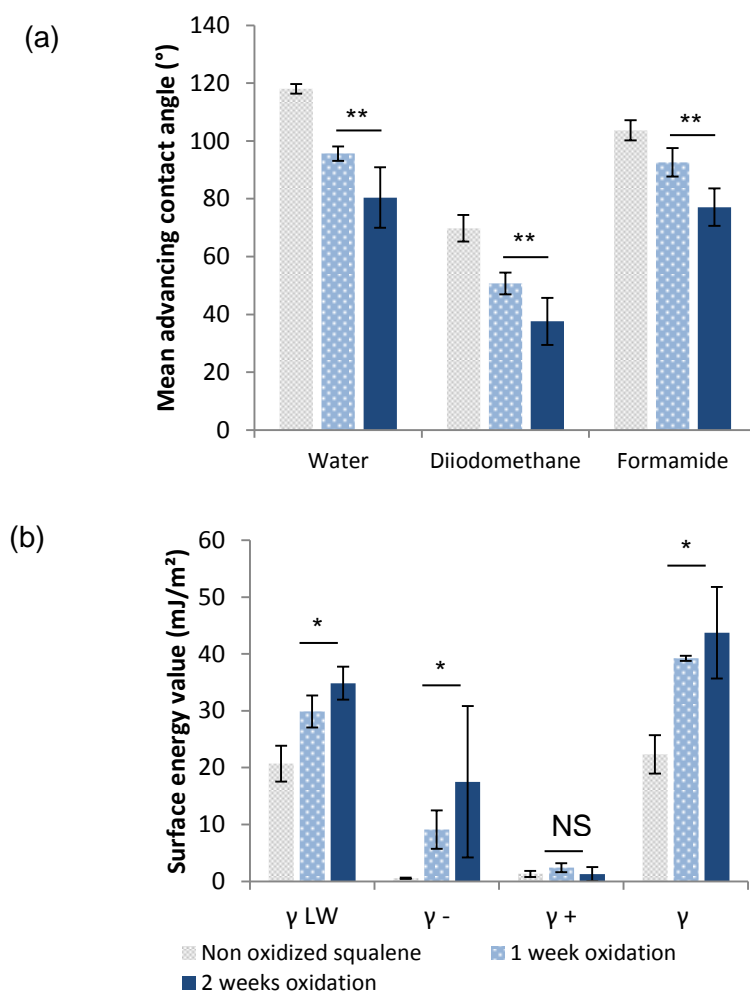


Figure 8. (a) contact angle measurements and (b) surface free energy parameters determined on the model surface after application of degraded squalene at 60°C. Results after 1 and 2 weeks of ageing.

The increase of the electron donor component is concordant with results described previously in the paper for solution S3: on the contrary, the increase of both the LW component and the total SFE is opposite to the observations related to heavy metals. Consequently, the squalene ageing in the presence of heavy metals is not similar to a simple oxidation process performed at 60°C. This means that degradation processes are different and lead to a variety of oxidation products. Therefore, thermal analysis experiments were performed in order to understand this result as exposed below.

Thermal analysis: tracks of explanations

Thermogravimetric analysis (TGA) experiments were performed under air atmosphere conditions on the two degraded squalene: one corresponding to 15 days at 60°C, the other corresponding to 45 days in the presence of heavy metals. Fresh-non degraded squalene was analyzed in the same conditions and used as a reference. Figure 9 represents the mass loss in percentage for the three. Results do illustrate and confirm that both squalene specimen own different compositions.

Solution S3 starts degrading at lower temperature when compared to both squalene oxidized at 60°C and fresh squalene. At $T = 160^{\circ}\text{C}$, around 4% of squalene S3 mass is lost while both squalene oxidized at 60°C and fresh squalene remained fully unaffected. The mass loss for squalene S3 then increases until 530°C where the remaining mass reaches a value of 7.5%, this value appearing stable until 900°C. For the two other squalene samples, mass losses begin to significantly increase around 200-225°C, until 600°C where both samples reach values close to 0%. Degradation temperatures but also mass residues are markedly different for squalene S3 compared to other samples. To conclude, the study of the thermo-oxidative degradation of aged squalene S3 highlights that squalene S3 is made of more easily degradable compounds that turns to the formation of a solid residue. The nature for the remaining solid residue still remains unclear. It may partly consist of heavy metals resulting from the treatment media used when preparing S3 (Pb and Ni). But heavy metals represent only 4% of the solution S3, the remaining mass of 7.5% is thus not completely explained by the presence of Pb and Ni.

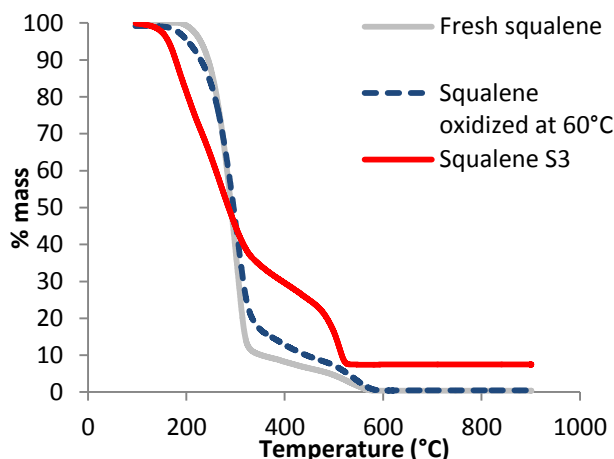


Figure 9. Thermogram obtained for fresh squalene, squalene oxidized at 60°C and S3 with Pb and Ni

Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis performed on squalene S3 after 45 days of ageing shows a glass transition temperature T_g around -20°C (data not shown) indicating the presence of a polymeric material, missing in squalene oxidized at 60°C during 15 days. Consequently, squalene ageing in the presence of heavy metals unambiguously leads to the formation of both a polymerized product and degraded compounds due to squalene oxidation as evidenced earlier in this paper. These results allow explaining the difference observed in terms of surface physico-chemistry.

Those noteworthy results clearly show that squalene ageing in the presence of heavy metals is definitely not equivalent to any ageing that may be only related to high temperature. In addition, this work do confirms that specific protocols need to be developed to efficiently evaluate the impact of model pollutants on skin physico-chemistry.

Conclusion

The aim of this work was to develop a specific protocol for studying the ageing of a model lipid in presence of urban pollutants, in order to show their impact on skin physico-chemistry. Squalene was chosen as model lipid due to the presence of carbon-carbon double bonds on its structure: this made it a good candidate to evaluate the impact of pollutants on oxidation process.

According to the first part of the study, heavy metals have a major impact on squalene degradation if compared to B(a)P, as highlighted by LC-MS analyses. Indeed the number of chemical species resulting from the degradation process during ageing in the presence of heavy metals is higher when compared to the ones formed in solution containing B(a)P mixed with squalene and solution containing only squalene. This effect can be highlighted

thanks to the mild conditions used for this protocol, which do not altered significantly squalene quality in control conditions.

The second part of this study dealt with the physico-chemical consequences of squalene ageing. Using an artificial skin model mimicking skin physico-chemical behavior, contact angle measurements performed with three probe liquids after the application of degraded squalene showed that skin surface free energy was greatly altered by the squalene aged in the presence of heavy metals. Indeed, the monopolar basic behavior of the corresponding surface was enhanced as shown by both the significant increase in the basic component and, simultaneously, the decrease in the acid component. This led to a skin surface free energy decreasing; such a modification of SFE may greatly alters the permeation behavior of compounds in contact with skin as a consequence of surface interactions changings. In addition, thermal analyses demonstrate that heavy metals induced the formation of a polymeric material, confirming their role in skin surface alterations. Thus, this methodology brings new clue to understand the impact of urban pollutants on skin surface properties, especially skin physico-chemistry, and underline the interest of non-biological skin models for skin researches.

The whole results highlighted in the present work are crucial to interpret physico-chemical damages induced by pollutants on skin; it strongly supports the fact that pollutants can greatly alter skin barrier function as clearly evidenced here in the case of heavy metals. Such a study may be easily extended to other major skin lipids such as free fatty acids or ceramides, in order to highlight the impact of pollutants on the *stratum corneum* structure. Finally, another key point related to present work is that the physiological effect of lipids degradation can be efficiently explored with using either easy-to-use non-biological surface or biological ones.

Acknowledgments

This study has been led within the framework of the URBASKIN project, selected as Project of Excellence by the General Directorate for Competitiveness Industry and Services (DGCIS) in the 20th Appel FUI (Fonds Unique Interministériel). It has been financed by BPI France and by Normandie, Val de Loire and Ile-de-France regions and supported by the Cosmetic Valley. The authors sincerely thank contributors and financers for their support.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no competing financial interest.

Supplementary data

Table A. Proposed molecular formula of compounds identified in each solution, at D15, D30 and D45. Numbers in bracket indicate the number of isomers, the bold font highlights new compounds found in S2 and S3 comparing to S1.

	S1	S2	S3
D15	C30 H46 (2)	C30 H34 (1)	C30 H34 (1)
	C30 H48 (5)	C30 H46 (3)	C30 H46 (2)
	C30 H48 O(3)	C30 H46 O (1)	C30 H48 (5)
	C30 H49 N 3 O (1)	C30 H48 (5)	C30 H48 O (1)
	C30 H50 (2)	C30 H48 O (5)	C30 H50 (2)
	C30 H50 O (4)	C30 H49 N3 (1)	C30 H50 O (3)
		C30 H49 N3 O (1)	
	C30 H50 (2)		
	C30 H50 O (4)		
D30	C30 H40 (1)	C30 H32 (1)	C30 H38 O (1)
	C30 H42 (1)	C30 H40 (1)	C30 H40 (2)
	C30 H46 (1)	C30 H42 (1)	C30 H40 O (1)
	C30 H48 (2)	C30 H46 (2)	C30 H42 (2)
	C30 H49 N3 O (1)	C30 H46 O (1)	C30 H42 O (3)
	C30 H50 (2)	C30 H48 (2)	C30 H44 (1)
	C30 H50 O (2)	C30 H48 O (3)	C30 H44 O (3)
		C30 H49 N3 O (1)	C30 H46 (4)
		C30 H50 (1)	C30 H46 O (4)
		C30 H50 O (2)	C30 H48 (2)
			C30 H48 O (4)
			C30 H48 O2 (2)
			C30 H48 O3 (3)
			C30 H49 N3 O (1)
		C30 H50 (1)	
		C30 H50 O (2)	
		C30 H50 O2 (2)	
		C30 H50 O3 (1)	
D45	C30 H40 (1)	C30 H32 (1)	C30 H40 (1)
	C30 H42 (1)	C30 H34 (1)	C30 H40 O (2)
	C30 H44 (1)	C30 H40 (1)	C30 H40 O4 (1)
	C30 H46 (1)	C30 H42 (1)	C30 H42 (1)

C30 H48 (4)	C30 H44 (1)	C30 H42 O (2)
C30 H48 O (2)	C30 H46 (3)	C30 H42 O4 (1)
C30 H50 (2)	C30 H46 O (2)	C30 H44 (1)
C30 H50 O (2)	C30 H48 (4)	C30 H44 O (2)
	C30 H48 O (3)	C30 H44 O3 (1)
	C30 H48 O2 (1)	C30 H46 (5)
	C30 H50 (3)	C30 H46 O (3)
	C30 H50 O (3)	C30 H48 (4)
	C30 H50 O2 (1)	C30 H48 O (5)
		C30 H48 O2 (3)
		C30 H48 O3 (1)
		C30 H50 (2)
		C30 H50 O (3)
		C30 H50 O2 (1)
		C30 H50 O3 (1)

References

- (1) Lanuti, E. L.; Kirsner, R. S. Effects of Pollution on Skin Aging. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (12), 2696.
- (2) Vierkötter, A.; Schikowski, T.; Ranft, U.; Sugiri, D.; Matsui, M.; Krämer, U.; Krutmann, J. Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *J. Invest. Dermatol.* **2010**, *130* (12), 2719–2726.
- (3) Vierkötter, A.; Krutmann, J. Environmental Influences on Skin Aging and Ethnic-Specific Manifestations. *Dermatoendocrinol.* **2012**, *4* (3), 227–231.
- (4) Ahn, K. The Role of Air Pollutants in Atopic Dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134* (5), 993–999.
- (5) Song, S.; Lee, K.; Lee, Y.-M.; Lee, J.-H.; Il Lee, S.; Yu, S.-D.; Paek, D. Acute Health Effects of Urban Fine and Ultrafine Particles on Children with Atopic Dermatitis. *Environ. Res.* **2011**, *111* (3), 394–399.
- (6) Xu, F.; Yan, S.; Wu, M.; Li, F.; Xu, X.; Song, W.; Zhao, J.; Xu, J.; Kan, H. Ambient Ozone Pollution as a Risk Factor for Skin Disorders. *Br. J. Dermatol.* **2011**, *165* (1), 224–225.
- (7) Lefebvre, M.-A.; Pham, D.-M.; Boussouira, B.; Bernard, D.; Camus, C.; Nguyen, Q.-L. Evaluation of the Impact of Urban Pollution on the Quality of Skin: A Multicentre Study in Mexico. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2015**, *37* (3), 329–338.
- (8) Lefebvre, M.-A.; Pham, D.-M.; Boussouira, B.; Qiu, H.; Ye, C.; Long, X.; Chen, R.; Gu, W.; Laurent, A.; Nguyen, Q.-L. Consequences of Urban Pollution upon Skin Status. A Controlled Study in Shanghai Area. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2015**, n/a-n/a.
- (9) Pan, T.-L.; Wang, P.-W.; Aljuffali, I. A.; Huang, C.-T.; Lee, C.-W.; Fang, J.-Y. The Impact of Urban Particulate Pollution on Skin Barrier Function and the Subsequent Drug Absorption. *J. Dermatol. Sci.* **2015**, *78* (1), 51–60.
- (10) Li, N.; Sioutas, C.; Cho, A.; Schmitz, D.; Misra, C.; Sempf, J.; Wang, M.; Oberley, T.; Froines, J.; Nel, A. Ultrafine Particulate Pollutants Induce Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111* (4), 455–460.

- (11) Thiele, J. J.; Traber, M. G.; Tsang, K.; Cross, C. E.; Packer, L. In Vivo Exposure to Ozone Depletes Vitamins C and E and Induces Lipid Peroxidation in Epidermal Layers of Murine Skin. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23* (3), 385–391.
- (12) Valacchi, G.; Sticozzi, C.; Pecorelli, A.; Cervellati, F.; Cervellati, C.; Maioli, E. Cutaneous Responses to Environmental Stressors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2012**, *1271* (1), 75–81.
- (13) Krutmann, J.; Liu, W.; Li, L.; Pan, X.; Crawford, M.; Sore, G.; Seite, S. Pollution and Skin: From Epidemiological and Mechanistic Studies to Clinical Implications. *J. Dermatol. Sci.* **2014**, *76* (3), 163–168.
- (14) Luecke, S.; Backlund, M.; Jux, B.; Esser, C.; Krutmann, J.; Rannug, A. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR), a Novel Regulator of Human Melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2010**, *23* (6), 828–833.
- (15) Pons-Guiraud, A. Dry Skin in Dermatology: A Complex Physiopathology. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2007**, *21* (s2), 1–4.
- (16) Mudiyansele, S. E.; Elsner, P.; Thiele, J. J.; Hamburger, M. Ultraviolet A Induces Generation of Squalene Monohydroperoxide Isomers in Human Sebum and Skin Surface Lipids In Vitro and In Vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *120* (6), 915–922.
- (17) De Luca, C.; Valacchi, G. Surface Lipids as Multifunctional Mediators of Skin Responses to Environmental Stimuli. *Mediators Inflamm.* **2010**, *2010*, e321-494.
- (18) Zhou, S.; Forbes, M. W.; Abbatt, J. P. D. Kinetics and Products from Heterogeneous Oxidation of Squalene with Ozone. *Environ. Sci. Technol.* **2016**, *50* (21), 11688–11697.
- (19) Abe, I.; Rohmer, M.; Prestwich, G. D. Enzymatic Cyclization of Squalene and Oxidosqualene to Sterols and Triterpenes. *Chem. Rev.* **1993**, *93* (6), 2189–2206.
- (20) Pham, D.-M.; Boussouira, B.; Moyal, D.; Nguyen, Q. L. Oxidation of Squalene, a Human Skin Lipid: A New and Reliable Marker of Environmental Pollution Studies. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2015**, *37* (4), 357–365.
- (21) Chiba, K.; Yoshizawa, K.; Makino, I.; Kawakami, K.; Onoue, M. Comedogenicity of Squalene Monohydroperoxide in the Skin After Topical Application. *J. Toxicol. Sci.* **2000**, *25* (2), 77–83.
- (22) Mehlman, M. A.; Borek, C. Toxicity and Biochemical Mechanisms of Ozone. *Environ. Res.* **1987**, *42*, 36–53.
- (23) Petrick, L.; Dubowski, Y. Heterogeneous Oxidation of Squalene Film by Ozone under Various Indoor Conditions. *Indoor Air* **2009**, *19* (5), 381–391.
- (24) Thiele, J. J.; Traber, M. G.; Polefka, T.; Cross, C. E.; Packer, L. Ozone-Exposure Depletes Vitamin E and Induces Lipid Peroxidation in Murine Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1997**, *108*, 753–757.
- (25) Franken, A.; Eloff, F. C.; Du Plessis, J.; Du Plessis, J. L. In Vitro Permeation of Metals through Human Skin: A Review and Recommendations. *Chem. Res. Toxicol.* **2015**, *28* (12), 2237–2249.
- (26) Chen, L.; Devanesan, P. D.; Higginbotham, S.; Ariese, F.; Jankowiak, R.; Small, G. J.; Rogan, E. G.; Cavalieri, E. L. Expanded Analysis of Benzo[a]Pyrene–DNA Adducts Formed in Vitro and in Mouse Skin: Their Significance in Tumor Initiation. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9* (5), 897–903.
- (27) Mavon, A.; Zahouani, H.; Redoules, D.; Agache, P.; Gall, Y.; Humbert, P. Sebum and Stratum Corneum Lipids Increase Human Skin Surface Free Energy as Determined from Contact Angle Measurements: A Study on Two Anatomical Sites. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **1997**, *8*, 147–155.
- (28) Nakagawa, K.; Ibusuki, D.; Suzuki, Y.; Yamashita, S.; Higuchi, O.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. Ion-Trap Tandem Mass Spectrometric Analysis of Squalene Monohydroperoxide Isomers in Sunlight-Exposed Human Skin. *J. Lipid Res.* **2007**, *48* (12), 2779–2787.
- (29) Eudier, F.; Grisel, M.; Picard, C.; Savary, G. Non-Biological Skin Model. EP18306149.8.

- (30) Timmons, C. O.; Zisman, W. A. The Effect of Liquid Structure on Contact Angle Hysteresis. *J. Colloid Interface Sci.* **1966**, *22* (2), 165–171.
- (31) Drelich, J. Guidelines to Measurements of Reproducible Contact Angles Using a Sessile-Drop Technique. *Surf. Innov.* **2013**, *1* (4), 248–254.
- (32) Van Oss, C. J.; Good, R. J.; Chaudhury, M. K. Additive and Nonadditive Surface Tension Components and the Interpretation of Contact Angles. *Langmuir* **1988**, *4* (4), 884–891.
- (33) Van Oss, C. J.; Chaudhury, M. K.; Good, R. J. Interfacial Lifshitz-van Der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. *Chem. Rev.* **1988**, *88* (6), 927–941.
- (34) Mavon, A.; Redoules, D.; Humbert, P.; Agache, P.; Gall, Y. Changes in Sebum Levels and Skin Surface Free Energy Components Following Skin Surface Washing. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **1998**, *10* (5), 243–250.
- (35) Schaich, K. M. Thinking Outside the Classical Chain Reaction Box of Lipid Oxidation. *Lipid Technol.* **2012**, *24* (3), 55–58.
- (36) Stohs, S. J.; Bagchi, D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18* (2), 321–336.
- (37) Frankel, E. N. Lipid Oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1984**, *61* (12), 1908–1917.
- (38) Camera, E.; Ludovici, M.; Galante, M.; Sinagra, J.-L.; Picardo, M. Comprehensive Analysis of the Major Lipid Classes in Sebum by Rapid Resolution High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry. *J. Lipid Res.* **2010**, *51* (11), 3377–3388.
- (39) Van Oss, C. J.; Chaudhury, M. K.; Good, R. J. Monopolar Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1987**, *28*, 35–64.

En résumé, cet article présente le protocole de vieillissement permettant d'étudier l'effet du B(a)P et de métaux lourds (plomb et nickel), sur l'oxydation du squalène. Les conditions (L) sélectionnées permettent de mettre en évidence l'impact des polluants, notamment des métaux lourds, sur l'accélération de l'oxydation lipidique. Les conditions (E) trop oxydantes n'auraient pas permis de conclure quant à l'effet des polluants, et n'ont donc pas été considérées.

Ensuite, il a été montré que l'application de ce squalène oxydé en présence de métaux lourds sur la SFS modifiait grandement l'énergie de surface de la peau, en raison de la nature des composés de dégradation lipidique. Néanmoins, les produits d'oxydation dus aux polluants ne sont pas identiques à ceux issus de l'oxydation naturelle du squalène observée dans les conditions (E). En effet, les propriétés physico-chimiques de la SFS après application de squalène S3L ou S1E ne sont pas identiques : l'oxydation induite par les métaux lourds renforce le caractère monopolaire basique de la SFS et diminue son énergie libre de surface tandis que l'oxydation induite par la température renforce également ce caractère monopolaire basique mais augmente aussi les interactions dispersives, induisant une augmentation de son énergie libre de surface. De plus, le squalène S3L présente des propriétés thermiques différentes par rapport au squalène S1E, ce qui a été démontré par analyses thermogravimétriques et par calorimétrie différentielle à balayage. Les processus de dégradation en présence de métaux lourds sont donc différents de ceux qui ont lieu à 60°C, ce qui induit divers produits de dégradation. Notamment, les analyses thermiques ont confirmé la possible polymérisation du squalène en présence de métaux lourds, grâce à l'observation d'une transition vitreuse autour de -20°C.

Ainsi, il apparaît que les polluants atmosphériques modifient très probablement les propriétés chimiques de surface de la peau, ce qui peut avoir des conséquences physiologiques concernant sa fonction barrière. Afin de confirmer la validité et la pertinence de cette étude, les résultats obtenus seront comparés, dans la prochaine partie, aux modifications induites par la fumée de cigarette sur la surface d'explants de peau humaine. Nous verrons que ces éléments serviront à la compréhension des phénomènes observés *ex vivo*.

II. Effet de la fumée de cigarette sur explants de peau humaine

II.1. Impact de la fumée de cigarette sur la fonction barrière : mise en évidence chimique et physico-chimique

La précédente étude a permis de démontrer que l'oxydation lipidique induite par les polluants atmosphériques peut modifier l'énergie de surface du modèle de peau SFS. Ainsi,

afin de confirmer ces observations, une nouvelle étude a été réalisée cette fois-ci sur le modèle *ex vivo* plus complexe, et plus proche de la peau *in vivo*. Nous avons cherché à mettre en évidence l'impact d'un modèle de pollution sur la surface des explants de peau, à partir de mesures de l'angle de contact mais aussi à travers des mesures chimiques et biométriologiques, permettant d'avoir une caractérisation complète des propriétés surfaciques des explants exposés aux polluants.

Plusieurs expositions à des modèles de pollution ont été testées :

- Exposition par nébulisation d'un mélange de polluants contenant du benzène, du B(a)P, de l'arsenic, du cadmium, du nickel, du plomb et des particules de Diesel, à différentes concentrations
- Exposition à l'ozone
- Exposition à la fumée de cigarette

Les études préliminaires menées sur explants ont montré que seule la fumée de cigarette impactait de façon significative l'énergie de surface des explants de peau. Ainsi, les études ont été poursuivies en utilisant ce modèle de pollution.

Trente explants issus de trois donneurs ont été analysés, la moitié ayant été traitée pendant 2h par la fumée de deux cigarettes à l'aide de la Pollubox® (lot traité) et l'autre moitié ayant simplement été placée 2h dans la Pollubox® sans exposition à la pollution (lot témoin). Toutes les caractérisations ont été réalisées 5 jours après leur préparation et 2 jours après leur exposition en Pollubox® (voir Partie 2, chapitre 1). Les 30 explants ont été analysés instrumentalement afin de déterminer leur énergie de surface, leur perte insensible en eau et leur pH surfacique. 26 explants ont été analysés par spectroscopie infrarouge pour étudier l'organisation des bicouches lipidiques de leur SC.

Les mesures de l'angle de contact et les paramètres physico-chimiques calculés après analyses des deux lots d'explants issus de trois donneurs sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 36).

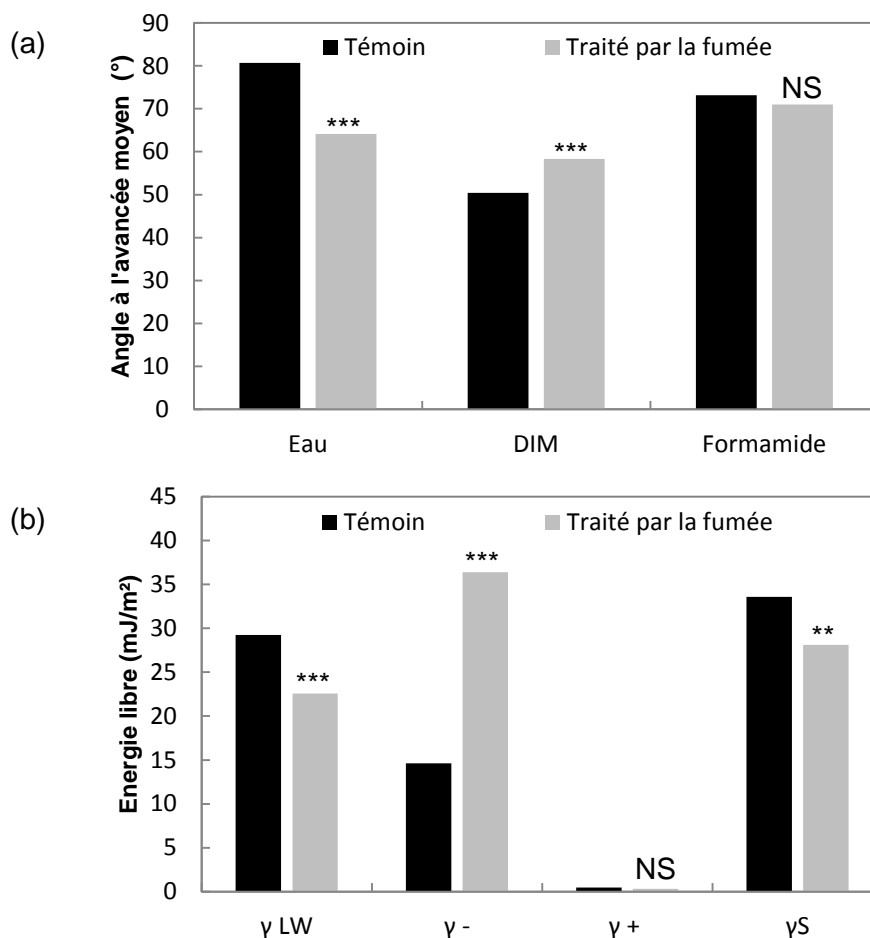


Figure 36. (a) Angle de contact à l'avancée avec l'eau, le DIM et le formamide mesurés sur explants témoins et traités par la fumée de cigarette (b) Paramètre d'énergie libre déterminé grâce au modèle de Van Oss

D'après l'ANOVA réalisée sur les données physico-chimiques, il apparaît que le traitement par la fumée de cigarette altère de façon très significative à la fois les mesures de l'angle de contact mais aussi les paramètres d'énergie libre de surface. En effet, le traitement par la fumée diminue significativement l'angle de contact avec l'eau (diminution de 15°, $p < 0,0001$) et augmente significativement l'angle de contact avec le DIM (augmentation de 8°, $p < 0,0001$). L'angle de contact avec le formamide diminue également légèrement mais de façon non significative. Ces évolutions indiquent que la fumée de cigarette tend à augmenter les interactions polaires et à diminuer les interactions apolaires, modifiant ainsi la polarité de la surface de la peau.

Ces observations sont confirmées par le calcul des paramètres d'énergie libre de surface, réalisé selon le modèle de Van Oss. Le traitement par la fumée de cigarette diminue significativement la composante apolaire γ^{LW} et augmente significativement la composante basique γ^- . Ainsi, la surface des explants de peau traités par la fumée développe beaucoup moins d'interactions dispersives. Cependant, la composante acide γ^+ étant très peu impactée et restant proche de zéro, la composante acido-basique γ^{AB} n'est pas impactée par le

traitement ($p > 0,05$) mais le caractère monopolaire basique est fortement renforcé. Ces évolutions des paramètres physico-chimiques induisent une diminution significative de l'énergie libre de surface des explants traités γ_s ($p = 0,002$).

La modification des paramètres d'énergie libre de surface des explants traités par la fumée de cigarette avait déjà été observée sur le modèle SFS recouvert de squalène oxydé par les métaux lourds. Ainsi, d'après la première étude réalisée sur SFS, il semblerait que l'oxydation des lipides cutanés puisse être responsable de ces modifications physico-chimiques. En effet, les produits d'oxydation des lipides sont riches en composés peroxydés, hydroxylés et carbonylés. Ces composés enrichis en électrons sont capables de développer des interactions de type basique ou des liaisons hydrogènes, augmentant ainsi la composante γ^- de la surface de la peau. De plus, cette augmentation de la densité électronique induit une diminution des interactions dispersives (Van Oss, Chaudhury, and Good 1987), expliquant la diminution du paramètre γ^{LW} .

L'oxydation des surfaces cutanées induite par la fumée de cigarette est un phénomène fréquemment reporté (Egawa, Kohno, and Kumano 1999; Park, Park, and Gwak 1998; Isik, Ceylan, and Isik 2007; Frei et al. 1991). En effet, il a été démontré que la fumée de cigarette était impliquée dans un mécanisme de stress oxydatif, induisant une peroxydation lipidique et une diminution de la quantité d'antioxydants au sein de la peau, confirmant les phénomènes observés en termes de physico-chimie de surface.

En modifiant la physico-chimie de surface des explants de peau, la fumée de cigarette altère la façon dont la peau interagit avec son environnement (Mavon et al. 1997). L'augmentation très significative de sa mouillabilité peut aussi impacter sa fonction barrière et modifier sa perméabilité. Ces éléments ont été investigués grâce à l'utilisation des sondes biométries.

Tout d'abord, il s'avère que le pH surfacique moyen mesuré évolue après traitement par la fumée de cigarette. Les explants témoins possèdent un pH de surface de $5,42 \pm 0,74$, valeur cohérente avec les données mesurées *in vivo* dans la littérature (Wagner et al. 2003), tandis que les explants traités par la fumée présentent un pH moyen de $5,92 \pm 0,68$. Cette augmentation statistiquement significative de pH surfacique ($p < 0,0001$) est cohérente avec les données physico-chimiques indiquant une augmentation du caractère monopolaire basique des explants de peau. Ceci peut avoir un grand impact sur la pénétration cutanée, puisque le pH influence le phénomène de diffusion des molécules et leur distribution dans les différentes couches de la peau (Wagner et al. 2003).

De plus, la PIE moyenne mesurée sur les explants témoins est de $15,5 \pm 4,8$ g/h/m² contre $21,4 \pm 6,9$ g/h/m² pour les explants traités par la fumée de cigarette. Cette augmentation significative ($p = 0,011$) indique que la fonction barrière des explants traités est fortement altérée. En effet, selon Elkeeb et al. (Elkeeb et al. 2010), la mesure de PIE *ex vivo* est représentative de la qualité de la fonction barrière cutanée.

Les mesures de spectroscopie infrarouge ont permis de corroborer cette observation. Nous nous sommes focalisés sur les longueurs d'ondes associées aux chaînes CH₂ des bicouches lipidiques ($v_{\text{sym}}\text{CH}_2$), autour de 2849 cm^{-1} . En effet, selon Mendelsohn et al. (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006), le suivi de cette longueur d'onde permet d'estimer la conformation des chaînes et leur organisation au sein du *stratum corneum*, comme présenté dans la partie 2 de ce manuscrit. Pour des longueurs d'ondes inférieures à $2849,5\text{ cm}^{-1}$, les chaînes sont organisées de façon orthorhombique ; entre $2859,5$ et 2852 cm^{-1} , les chaînes sont organisées de façon hexagonale ; au-delà de 2852 cm^{-1} , les chaînes sont à l'état liquide. Pour les explants témoins, la longueur d'onde moyenne observée est de $2851,01 \pm 0,35\text{ cm}^{-1}$, correspondant à un empilement hexagonal, ce qui est cohérent avec l'organisation usuelle des bicouches lipidiques à l'extrême surface de la peau (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006). En revanche, pour les explants traités par la fumée de cigarette, cette longueur d'onde augmente de façon significative ($p = 0,016$) et atteint la valeur de $2851,43 \pm 0,46\text{ cm}^{-1}$. Une telle longueur d'onde est associée avec une augmentation de la flexibilité des chaînes lipidiques et à un empilement plus désordonné.

Cette organisation des chaînes CH₂ des bicouches lipidiques reflète l'intégrité de la fonction barrière cutanée (Denda et al. 1994). Des lipides organisés de façon très compacte (orthorhombique) apporteront une très grande imperméabilité de la peau tandis qu'un empilement désordonné ou liquide conduira à une augmentation de la perméabilité cutanée (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006). Ainsi, les explants traités par la fumée de cigarette présente une plus grande désorganisation de leurs bicouches lipidiques, indiquant une plus grande perméabilité, ce qui confirme l'augmentation de la PIE observée (Denda et al. 1994; Forslind 1994). Des effets similaires avaient déjà été mentionnés dans la littérature après exposition de souris aux rayonnements UV, fortement oxydant (Jiang et al. 2006). Une telle désorganisation des chaînes de bicouches lipidiques s'explique probablement par la formation de lipides oxydés qui perturbent l'organisation initiale des lipides (Figure 37).

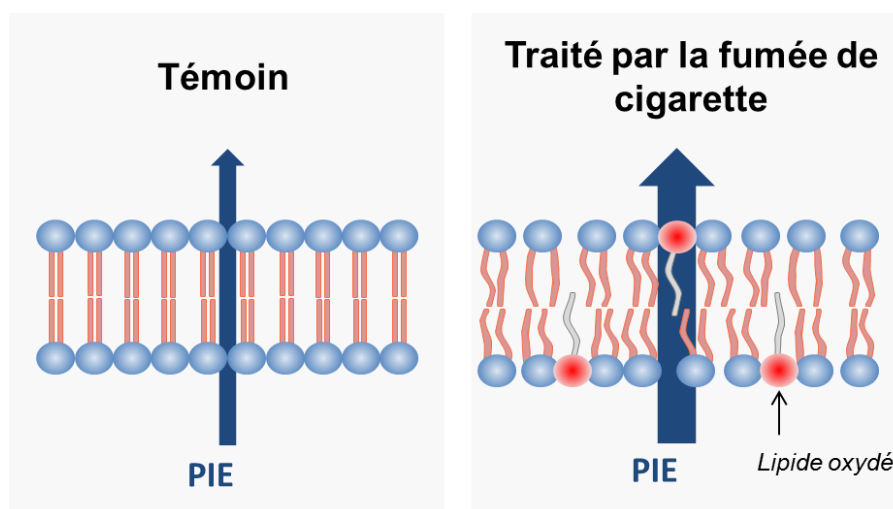


Figure 37. Représentation schématique de l'impact de la fumée de cigarette sur la fonction barrière de la peau : bilan des observations réalisées

L'ensemble de ces résultats démontre que la fumée de cigarette altère grandement la fonction barrière de la peau. Le mécanisme principal semble être la génération d'un stress oxydatif, induisant une oxydation des lipides cutanés. Cette oxydation induit de nombreuses modifications dans les propriétés de surface de la peau : la mouillabilité de la peau est fortement augmentée ainsi que son caractère monopolaire basique ; son pH de surface augmente également ; l'organisation des bicouches lipidiques est ainsi perturbée, provoquant une plus grande perte insensible en eau.

En définitive, l'approche physico-chimique envisagée au cours de cette étude apporte des résultats originaux, qui n'avaient jamais été reportés dans la littérature. De plus, l'utilisation du modèle SFS lors de la précédente étude a permis de conclure quant au rôle de l'oxydation lipidique dans les altérations physico-chimiques observées. L'ensemble des éléments évoqués ci-dessus apporte de nouvelles explications quant à l'impact des polluants sur les propriétés de surface de la peau et sur sa fonction barrière, répondant aux objectifs du projet UrbaSkin.

Il est à noter que nous n'avons pas pris en compte, lors de cette étude *ex vivo*, le possible impact du résidu de fumée de cigarette sur les propriétés de surface des explants, notamment concernant les phénomènes physico-chimiques observés. Une étude complémentaire a donc été réalisée en utilisant le modèle de peau SFS pour comprendre si les phénomènes surfaciques mis en évidence sont uniquement dus à l'oxydation des lipides cutanés ou à un éventuel dépôt de résidus fumée sur la surface.

II.2. Comparaison avec les résultats obtenus sur Surfaskin

Afin de vérifier que les modifications observées *ex vivo*, notamment en termes de physico-chimie, ne sont pas uniquement dues à la présence d'un dépôt de fumée de

cigarette mais bel et bien à l'oxydation des lipides de surface, une étude complémentaire a été réalisée sur SFS. Quatre lots de SFS ont été préparés et envoyés chez BIO-EC pour traitement :

- SFS témoin, notées TAS (Témoin Avec Sébum), placées 2h en Pollubox®, sans fumée de cigarette.
- SFS traitées pendant 2h dans la Pollubox® par la fumée de cigarette, dans les mêmes conditions d'analyse qu'*ex vivo*, notées FAS (Fumée Avec Sébum).
- SFS sans sébum témoin, notées TSS (Témoin Sans Sébum), placées 2h en Pollubox®, sans fumée de cigarette et considérées comme des surfaces « inertes » pour lesquelles il n'y aura pas de phénomènes d'oxydation lipidique.
- SFS sans sébum traitées pendant 2h dans la Pollubox® par la fumée de cigarette, notées FSS (Fumée Sans Sébum).

Des mesures de l'angle de contact ont été réalisées dans les mêmes conditions que sur explants de peau, 48h après exposition. La comparaison entre les lots TSS et FSS permettra d'étudier le résidu de fumée éventuellement présent, sans prise en compte des phénomènes d'oxydation lipidique. Les comparaisons entre les lots TAS et FAS permettront de confirmer le rôle de l'oxydation lipidique dans les modifications physico-chimiques observées *ex vivo* (Figure 38).

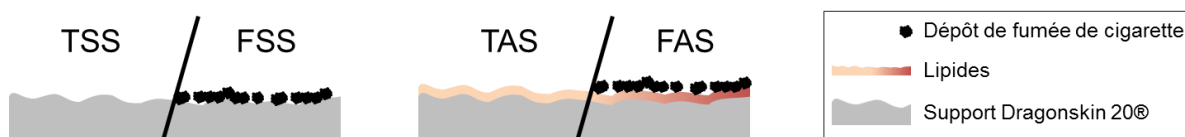


Figure 38. Représentation des différents lots de SFS de cette étude : modifications physico-chimiques dues au dépôt de fumée et/ou à l'oxydation lipidique.

Les résultats obtenus pour les mesures de l'angle de contact sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 39).

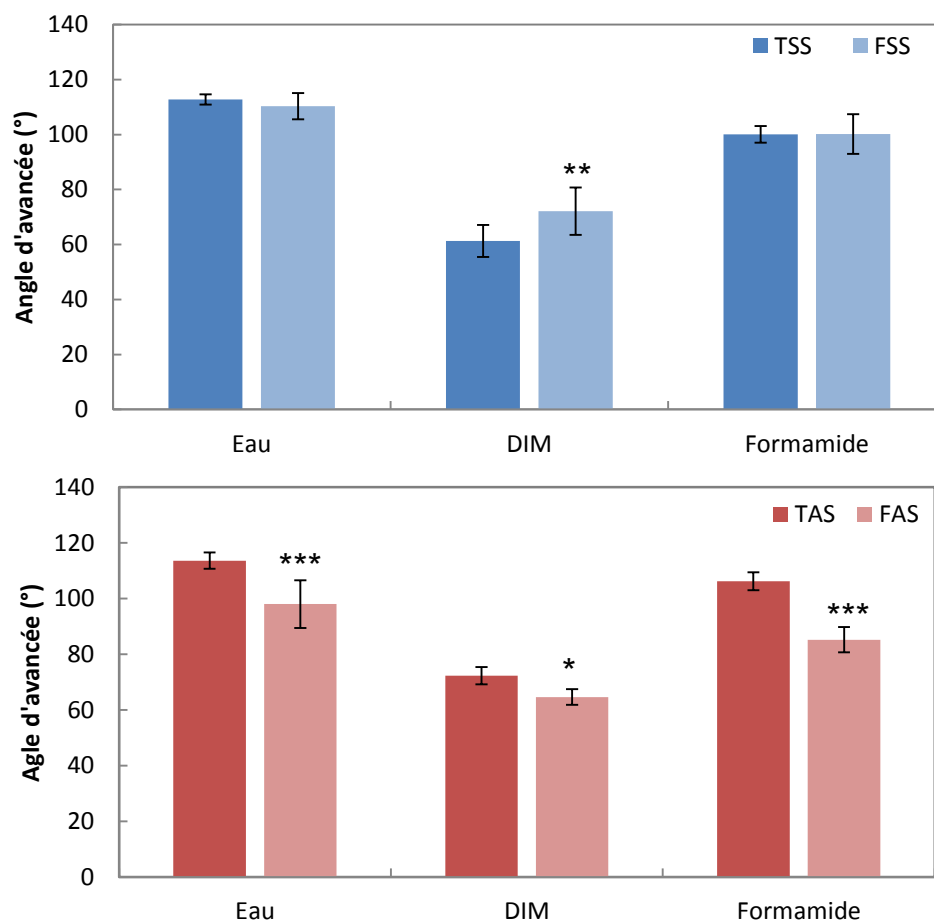


Figure 39. Mesures de l'angle de contact réalisées sur les 4 lots de SFS, avec et sans sébum, témoin et traité par la fumée de cigarette.

On constate dans un premier temps que les surfaces les plus impactées par la fumée de cigarette sont les SFS du lot FAS, c'est-à-dire les surfaces avec sébum. En effet, pour les lots TAS et FAS, les angles de contact mesurés avec les trois liquides présentent des différences statistiquement significatives ($p < 0,0001$ pour l'eau, $p = 0,023$ pour le DIM et $p = 0,001$ pour le formamide), tandis que pour les lots TSS et FSS, seul l'angle de contact mesuré avec le DIM présente une différence significative entre le lot témoin et le lot traité ($p = 0,003$). Ces résultats démontrent donc que l'effet de la fumée de cigarette est majoritairement dû à l'oxydation des lipides cutanés, ce qui confirme que l'exposition à ce polluant peut provoquer des modifications chimiques, comme présenté dans la partie I et II.1. de ce chapitre. C'est donc bien la détérioration des lipides qui est responsable de la modification de l'énergie libre de surface de la peau.

Néanmoins, il semble que le dépôt de fumée de cigarette puisse légèrement impacter l'interaction entre la surface et le DIM. Ceci pourrait être dû à la nature du dépôt de fumée, qui peut contenir différents composés de polarité variée (hétérocycles, hydrocarbures, phénols, alcools, métaux ... (Borgerding and Klus 2005)). Cette augmentation d'angle de

contact observé également sur explants de peau pourrait donc être due aux composés constituant le dépôt de fumée.

L'augmentation marquée de l'hydrophilie de la peau observée sur explants est en revanche, elle, confirmée à partir de ce modèle SFS. Ainsi, cette étude valide l'impact de la fumée de cigarette sur la physico-chimie de surface de la peau, expliquée en grande partie par un phénomène d'oxydation du film hydrolipidique.

III. Conclusion du chapitre

L'ensemble des résultats regroupés dans ce chapitre apporte de nouvelles informations quant à l'impact des polluants sur la surface de la peau, et répond donc à l'une des problématiques du projet Urbaskin. Deux modèles d'étude, les explants de peau humaine et la SFS, ont été utilisés de façon complémentaire, chacun apportant des informations et éléments de compréhension indispensables.

La première étude présentée, portant sur l'oxydation du squalène en présence de polluants et les conséquences observées en termes de physico-chimie, apporte des éléments de compréhension importants pour interpréter les résultats obtenus sur explants. En effet, il a été constaté que l'oxydation du squalène en présence de polluants conduit à un renforcement du caractère monopolaire basique de la SFS, induisant une diminution de son énergie libre de surface. Les mêmes conséquences ont été observées après exposition des explants de peau à la fumée de cigarette. Ainsi, il fut aisé de conclure que la fumée de cigarette a induit une oxydation des lipides de surface de la peau. Ceci a également été confirmé par l'étude additionnelle, visant à exposer la SFS à la fumée de cigarette.

Cette oxydation lipidique conduit à des modifications physiologiques sur la surface des explants. En effet, d'après les analyses réalisées, les explants exposés présentent une perte insensible en eau significativement plus élevée que les explants témoins, accompagnée d'une désorganisation des chaînes CH_2 des bicouches lipidiques de leur SC. Cette exposition à la fumée de cigarette contribue donc à la détérioration de la fonction barrière de la peau.

Ces phénomènes surfaciques observés sont en accord avec les conséquences biologiques mises en évidence après exposition à la fumée de cigarette. En effet, les partenaires du projet Urbaskin, les laboratoires BIO-EC et Genex, ont observé de fortes modifications dans l'expression de gènes des explants de peau exposés à la fumée. Notamment, certains gènes liés à des mécanismes de défenses contre le stress oxydatif ont été surexprimés. Le gène HMOX1, codant pour une protéine liée à la réponse anti-oxydante de la peau, est très fortement surexprimé après exposition à la fumée de cigarette. De plus,

le facteur de transcription Nrf2, qui permet de réguler la résistance des cellules à l'oxydation (Ma 2013), est activé après exposition, induisant une activation transcriptionnelle de la réponse anti-oxydante. Des immunomarquages ont également montré une immunolocalisation accrue dans l'épiderme de certaines protéines, notamment la protéine PINK1, marqueur d'altérations mitochondriales liées au stress oxydatif. Tous ces éléments sont corroborés par la forte augmentation de quantité de MDA (MalonDiAldéhyde) dans le milieu de culture des explants exposés à la cigarette, un marqueur de la peroxydation lipidique. Ce dialdéhyde est en effet un sous-produit de l'oxydation des lipides cutanés, permettant d'évaluer le stress oxydatif, auquel est soumise la peau humaine (Alonso et al. 2009). Tous ces éléments confirment donc le fort pouvoir oxydant de la fumée de cigarette sur la peau humaine, induisant une oxydation des lipides de surface, ce qui a des conséquences sur sa fonction barrière et sur ses propriétés physico-chimiques.

Au final, deux des objectifs du projet Urbaskin ont été atteints : la mise en évidence de l'impact de polluants sur la fonction barrière cutanée et la corrélation entre des phénomènes biologiques et surfaciques.

Au regard des résultats exposés à l'issue de ces deux chapitres, le prochain chapitre de ce manuscrit fera référence à des stratégies de protection de la peau contre les effets néfastes des polluants atmosphériques. Plusieurs questions seront soulevées, notamment pour savoir comment protéger la surface de la peau ou quelles méthodologies et stratégies adopter face à l'agression des polluants. Pour cela, nous chercherons à comprendre comment les produits cosmétiques impactent la surface de la peau, quel lien existe entre les propriétés du film résiduel des produits et leurs propriétés anti-adhésion de particules pour pouvoir développer des produits protégeant efficacement la peau humaine des particules polluantes.

Chapitre 3 – Etude de l'impact de produits cosmétiques sur les propriétés de surface de la peau : de nouvelles stratégies pour protéger la peau contre les polluants atmosphériques.

Les chapitres précédents ont montré l'impact indéniable des polluants atmosphériques sur la peau. Ainsi, l'exposition quotidienne à un environnement pollué aura un effet négatif sur la qualité de la fonction barrière cutanée, risquant d'induire une déshydratation de la peau, une augmentation des symptômes de peau sensible mais également une accélération du vieillissement extrinsèque. Il est donc nécessaire de limiter l'exposition de la peau aux polluants et/ou de lutter contre leurs effets délétères. Ainsi, deux stratégies pour contrer les effets de la pollution existent : le développement d'actifs préventifs ou curatifs, visant à corriger ou à limiter l'impact des polluants sur la peau, ou d'actifs à effet « barrière », visant à empêcher le contact entre la peau et les polluants. Ces deux stratégies complémentaires seront adoptées par les Laboratoires Dermatologiques d'Uriage et par Bio-Europe, afin de développer de nouveaux actifs et produits cosmétiques anti-pollution.

Les effets curatifs ou préventifs des actifs et produits sont essentiellement liés à des activités anti-oxydantes, pour éviter l'oxydation lipidique de surface mise en évidence précédemment, ou à des activités anti-inflammatoires et détoxifiantes (Biatry 2000; Pauly 1999; Catroux, Cotovio, and Duche 2003). Les effets « barrière » eux sont principalement liés à la formation d'un film ou d'un écran protecteur à la surface de la peau, permettant de diminuer le contact entre la peau et les polluants, réduisant ainsi l'adhésion et la pénétration des particules (Afriat and Biatry 2000; Shen et al. 2017; Koike et al. 2017). Ainsi, dans le cadre de notre étude des propriétés de surface de la peau, nous nous sommes intéressés à cette deuxième stratégie, plus particulièrement au rôle du film protecteur. En effet, il n'existe à l'heure actuelle aucune méthodologie d'étude du film formé par un produit cosmétique appliqué sur la peau humaine. Quelques études s'intéressent à la mouillabilité ou à la sensorialité de ce film (Millerioux et al. 2009; Maria Emma Parente, Gambaro, and Solana 2005) sans faire de lien entre ses différentes propriétés, ni expliquer comment un tel produit est susceptible de protéger la peau.

Ce film formé par le produit sur la peau, appelé film résiduel, est pourtant très important à connaître et à caractériser. Il s'agit d'une problématique fondamentale, nécessaire pour comprendre les interactions entre la peau et les produits topiques, évaluer et expliquer des effets barrière ou anti-adhésion de particules, mais aussi pour comprendre d'autres propriétés des produits topiques comme leurs propriétés sensorielles résiduelles.

Pour étudier ce film résiduel et ses propriétés anti-adhésion de particules, une nouvelle méthodologie a dû être mise en place. Les différentes étapes suivies pour mettre en place cette méthode sont présentées dans la figure ci-dessous (Figure 40).



Figure 40. Mise en évidence et caractérisation du film résiduel de produits cosmétiques : une nouvelle méthodologie d'étude

Dans un premier temps, nous avons sélectionné divers produits cosmétiques possédant des galéniques (gel, émulsions,...) et utilisations très variées (crème mains, produits capillaires, shampooing ...). Le premier objectif a été de mettre en évidence leur film résiduel, ce qui à notre connaissance n'a jamais été décrit dans la littérature. Puis, une méthodologie d'étude des propriétés résiduelles des produits cosmétiques a été mise en place, grâce aux modèles non-biologiques de peau présentés précédemment. L'objectif a été de répondre à diverses questions telles que : comment étudier l'effet d'un produit sur la surface de la peau ? Comment un produit modifie l'état de surface de la peau ?

Une fois cette nouvelle méthodologie mise en place, les 11 produits cosmétiques présentés dans la partie 2 de ce manuscrit ont été caractérisés instrumentalement et sensoriellement. Nous avons ensuite étudié leur propriété anti-adhésion de particules, grâce à un protocole développé spécifiquement. Le but de ces travaux était de démontrer si ce phénomène d'adhésion pouvait ou non être expliqué à partir de la caractérisation de propriétés résiduelles sensorielles et instrumentales des produits.

L'ensemble des résultats obtenus seront présentés dans les paragraphes suivants. Le lien entre ces différentes propriétés sera souligné et les perspectives seront détaillées. Ce chapitre sera appuyé par l'article scientifique « *Prediction of residual film perception of cosmetic products using an instrumental method and non-biological surfaces: the example of stickiness after skin application.* » accepté dans le journal *Colloids and Surface B: Biointerfaces*. Celui-ci présente la nouvelle méthodologie d'étude sensorielle développée durant ce projet grâce à l'utilisation de surfaces non-biologiques.

I. Mise en évidence du film résiduel de produits cosmétiques

L'application d'un produit cosmétique sur la surface de la peau a pour objectif de « nettoyer », « parfumer » ou de modifier son « aspect » (ANSM 2017), grâce à des agents hydratants, émoullissants ou à des molécules actives. D'après cette définition, il apparaît qu'un produit cosmétique peut modifier les propriétés de surface de la peau, qu'elles soient sensorielles ou instrumentales. La modification sensorielle de la peau par un produit a été mise en évidence depuis longtemps (Schwartz 1975; Civile and Dus 1991) à travers l'étude de la texture de la peau après application. Néanmoins, il existe peu d'études expliquant les modifications sensorielles induites par un produit en fonction de ses propriétés ou de sa composition (Gilbert et al. 2012; Montenegro et al. 2015; Dubuisson et al. 2018).

De plus, la caractérisation instrumentale complète de ce film résiduel reste très peu investiguée. Pourtant, de nombreuses méthodes d'analyse de surface de la peau existent (Wilhelm et al. 1996). Mais il est encore aujourd'hui difficile, pour un formulateur, de développer un produit aux propriétés résiduelles contrôlées car les études se limitent généralement à l'évaluation d'efficacité (hydratante, antirides ...) (Dzwigalowska et al. 2013). Ainsi, l'objectif de cette première partie est de démontrer l'impact *in vivo* de divers produits cosmétiques sur deux propriétés essentielles de surface de la peau : sa physico-chimie et sa composition chimique surfacique. Ceci permettra de mettre en évidence les différences existantes entre divers produits cosmétiques et d'étudier la persistance d'un produit sur la peau. Ensuite, la comparaison entre les caractérisations réalisées *in vivo* et sur surface non-biologiques permettra de définir une nouvelle méthodologie d'étude de la surface de la peau après application topique.

1.1. Analyse physico-chimique de la peau in vivo après application de produits cosmétiques : présence d'un film résiduel (étude préliminaire)

L'analyse de la peau humaine après application d'un produit cosmétique démontre une évolution indéniable de ses propriétés, en fonction du type de produit appliqué. La figure ci-dessous (Figure 41) présente les mesures de l'angle de contact avec l'eau réalisées 3 min

après application de plusieurs produits cosmétiques *in vivo* sur deux panélistes femmes : des émoullients (notés I_i), des émulsions eau-dans-huile ou huile-dans-eau (notées E_i), des gels et des solutions aqueuses (notés S_i) (Tableau 7), de composition non spécifiée.

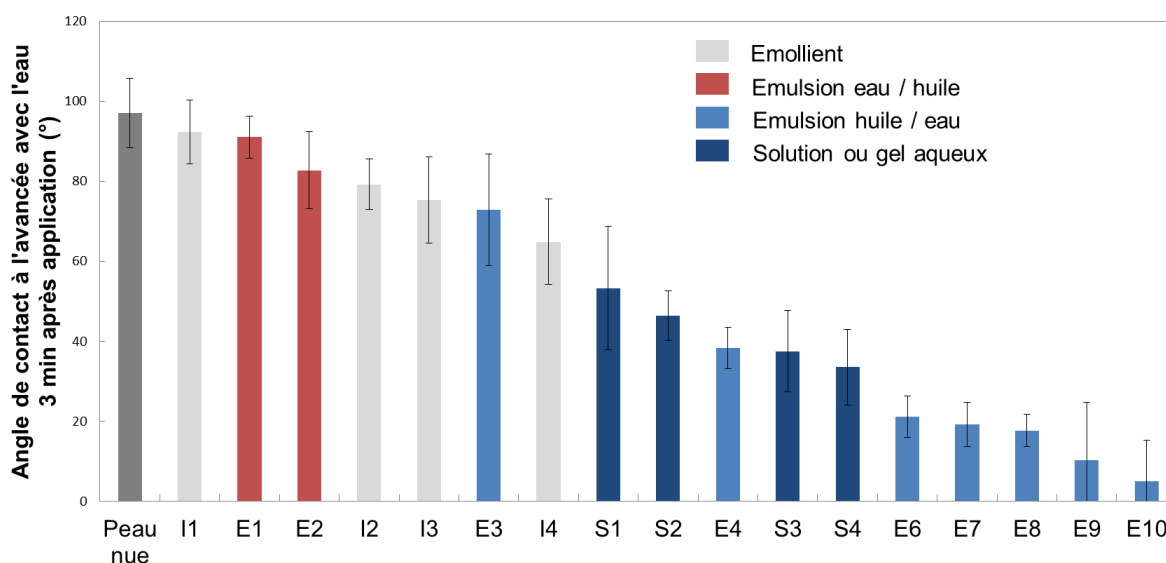


Figure 41. Angles de contact avec l'eau (°) mesurés 3 min après application de produits cosmétiques (I : Ingrédient ; E : Emulsion ; S : solution ou gel)

Dans un premier temps, on constate que les produits appliqués ont tous tendance à diminuer l'hydrophobie de la peau. Ceci n'est pas surprenant étant donné que la peau possède une énergie de surface relativement faible (environ 38 mJ/m²) (Mavon et al. 1997). Ainsi, l'application d'un produit, même lipidique comme les émoullients, a tendance à augmenter son énergie de surface et à augmenter sa mouillabilité. Le même phénomène avait été observé dans le cas de la teneur en lipides de la surface de la peau : malgré leur caractère lipophile, les lipides, notamment les acides gras libres, avaient tendance à augmenter la mouillabilité de la peau (Elkhyat et al. 1996; Mavon et al. 1997) du fait de leur capacité à augmenter le caractère monopolaire basique de la surface cutanée.

Globalement, la mouillabilité la plus élevée est obtenue après application d'émulsions à phase continue aqueuse (huile-dans-eau H/E) ($\theta_{\text{eau}} < 60^\circ$), tandis que les émulsions à phase continue lipophile (eau-dans-huile E/H) et les émoullients maintiennent un angle de contact avec l'eau supérieur à 60°.

Dans le cas des émulsions E/H, bien que généralement majoritairement constituées d'eau, leur phase continue lipophile est la phase exposée et restante sur la surface de la peau après application. Les angles de contact mesurés seront donc similaires à ceux mesurés après application de composés lipophiles comme les émoullients. A l'inverse, dans le cas des émulsions H/E, la phase externe aqueuse restante à la surface de la peau

augmentera considérablement l'hydrophilie de cette dernière (Figure 42). Les différences observées entre les émulsions sont ensuite dues à leur teneur en eau, à la nature des différents constituants de l'émulsion, etc.

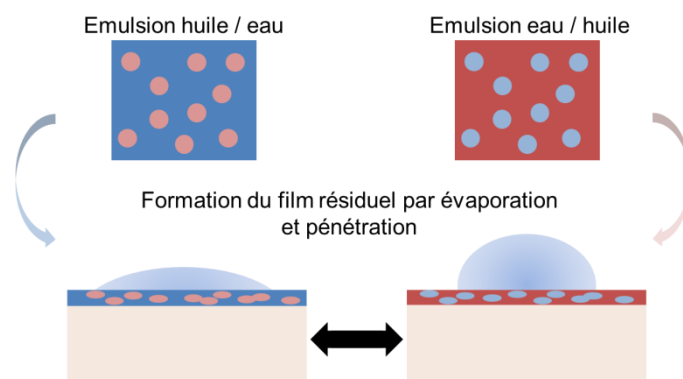


Figure 42. Représentation schématique du film résiduel d'une émulsion hydrophile et d'une émulsion lipophile : conséquence sur la mouillabilité de la peau

Les différences observées entre les quatre émoullissants peuvent être expliquées par la valeur de leur tension de surface (Tableau 12). En effet, plus la tension de surface de l'émoullissant appliqué est faible, plus la mouillabilité de son résidu est faible.

Tableau 12. Tension de surface des 4 émoullissants testés et valeur de l'angle de contact avec l'eau après application

Emollient	Nature	γ_L (mJ/m ²)	θ_{eau}
I1	Cyclopentasiloxane	18,0	92,4
I2	Isohexadecane	24,4	79,3
I3	Huile d'Argan	31,7	75,3
I4	Propanediol dicaprylate	33,1	64,9

Ces observations réalisées *in vivo* permettent de démontrer que le film résiduel de produits cosmétiques modifie l'état de surface de la peau et sa mouillabilité, et que ces modifications peuvent être expliquées par la nature des produits et leurs propriétés physico-chimiques. L'enjeu de ces travaux ne réside cependant pas dans la compréhension de l'impact de la composition de l'émulsion sur ses propriétés résiduelles. Néanmoins, il peut s'agir d'un point de départ pertinent, qui suggère des perspectives très intéressantes pour l'industrie et la recherche cosmétique.

Ce film résiduel implique également une modification chimique de la surface de la peau. Cette modification chimique a pu être mise en évidence par spectroscopie infrarouge (Figure 43). En effet, les spectres infrarouges obtenus permettent de visualiser l'apport des produits par rapport à la peau nue. La présence du cyclopentasiloxane est très visible grâce à l'absorption de longueurs d'ondes à 1060 cm⁻¹, absorption caractéristique des composés siliconés (Launer and Arkles 2013). Les émulsions enrichissent la surface de la peau en composés lipidiques, comme mis en évidence par l'augmentation de l'absorption à 2920 et

2850 cm^{-1} , caractéristique des chaînes CH_2 des lipides, et à 1650 et 1550 cm^{-1} , caractéristiques des amides I et II (Keirsse 2003). Elles apportent également des composés possédant des fonctions $-\text{OH}$ (3500-3000 cm^{-1}). Dans l'exemple de la Figure 43, la nature de l'émulsion (H/E ou E/H) ne semble pas être un facteur différenciant pour la composition chimique du film résiduel, puisque leurs spectres respectifs présentent des absorptions similaires. Les spectres infrarouges des films résiduels seront donc plus pertinents pour étudier la présence de certains composés ayant une absorption particulière, en surface de la peau, comme des filtres solaires par exemple. Des études ont déjà été réalisées par spectroscopie Raman, pour mettre en évidence la répartition des filtres solaires lipophiles ou hydrophiles en surface de la peau (Sohn, Buehler, and Imanidis 2016).

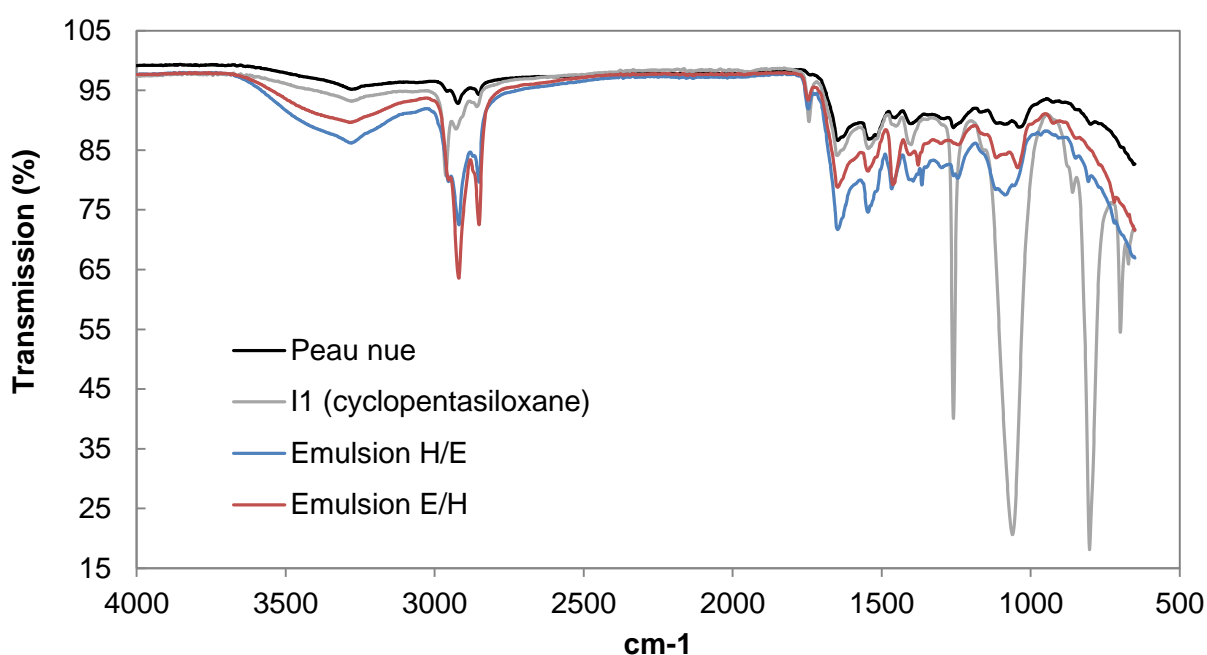


Figure 43. Spectres infrarouges enregistrés *in vivo* 3 min après application de produits cosmétiques

Ce film résiduel évolue dans le temps, ce qui peut également être mis en évidence par spectroscopie infrarouge (Figure 44). L'évolution du spectre, et donc du film résiduel, diffère en fonction du produit appliqué. Un produit volatil comme l'émollient I1 (cyclopentasiloxane) ne laisse plus aucun résidu 1h après application : on retrouve dans ce cas le spectre de la peau nue (Figure 44(a)). Le film résiduel de l'émulsion H/E évolue légèrement (Figure 44(b)) : la bande d'absorption correspondant aux fonctions $-\text{OH}$ diminue et devient similaire à la peau nue. Il en va de même pour les bandes d'absorptions correspondant aux amides : les composés associés se sont soit évaporés soit ont pénétré au sein de la peau. Il semble rester une part importante de composés contenant des chaînes CH_2 , indiquée par l'absorption toujours forte après 1h des longueurs d'ondes autour de 2920 et 2850 cm^{-1} . Enfin, le film résiduel de l'émulsion E/H évolue très peu (Figure 44(c)),

synonyme d'un film résiduel important et persistant, et ce même 1h après application. Là encore, les caractéristiques spectrales et l'évolution du résidu dans le temps dépendront de la nature des constituants de l'émulsion et de leur concentration.

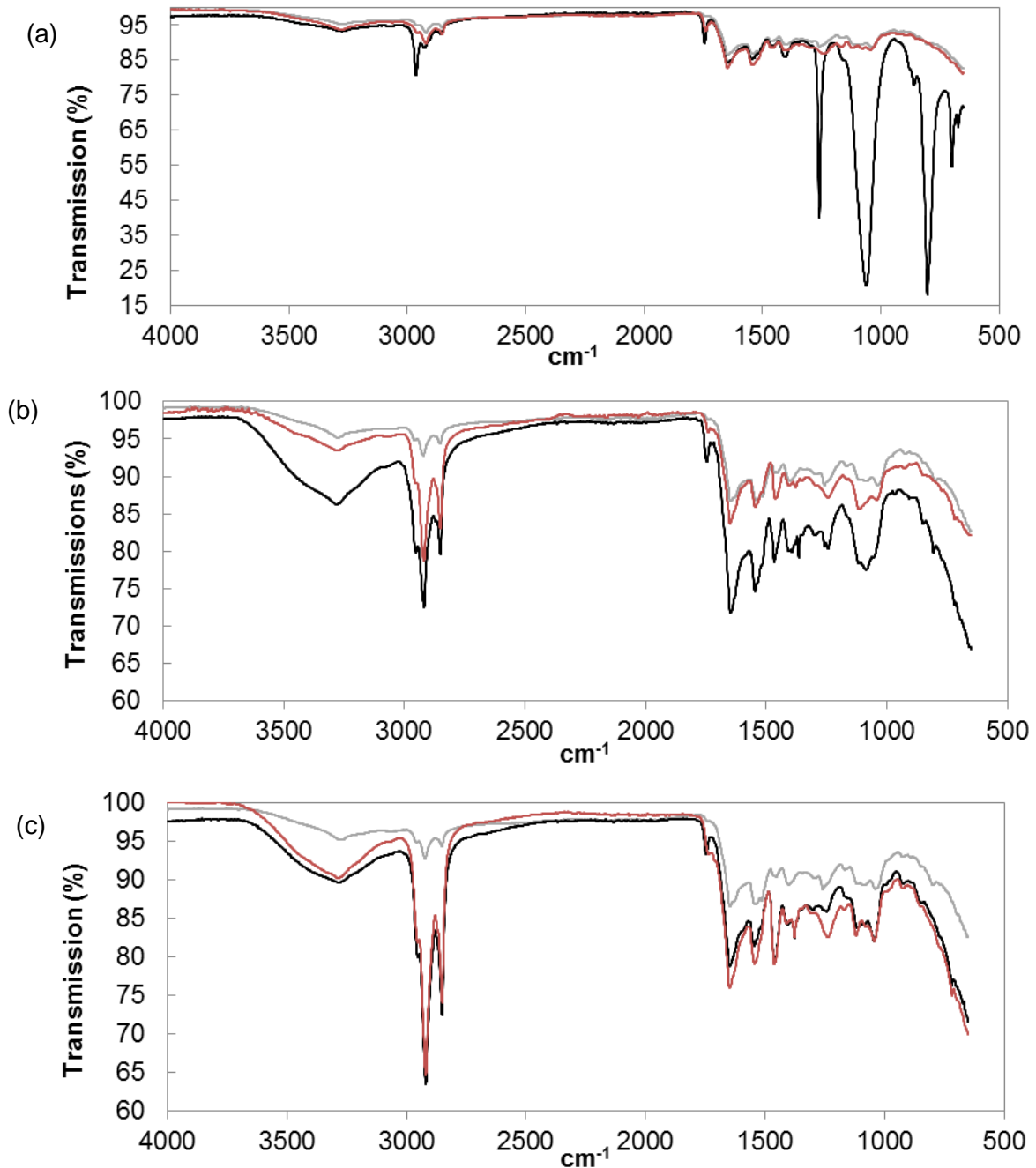


Figure 44. Spectres infrarouges enregistrés 3 min (en noir) et 1h (en rouge) après application de (a) l'émollient I1 (b) d'une émulsion huile/eau et (c) d'une émulsion eau/huile ; en comparaison avec la peau nue (en gris)

Cette première partie constitue donc une mise en évidence introductive du film résiduel de produits cosmétiques restant après application sur la peau. Ce film peut présenter des propriétés très diverses en termes de composition chimique et de propriétés

physico-chimiques. Sa persistance dans le temps peut également différer en fonction des produits appliqués. Cette étude préliminaire va permettre maintenant de comparer les modèles non-biologiques avec la peau *in vivo* pour vérifier si ces surfaces permettent de reproduire le film résiduel de produits tel qu'il peut être observé *in vivo*. De plus, il sera intéressant de comparer les propriétés de ces résidus pour comprendre les liens qu'il peut exister et ainsi mettre en évidence les films résiduels capables d'empêcher l'adhésion des particules.

1.2. Mise en place d'un modèle prédictif pour l'étude physico-chimique du film résiduel

L'étude complète *in vivo* du film résiduel peut s'avérer délicate puisque les résultats peuvent varier d'un individu à l'autre, dépendre des conditions environnementales (température, taux d'humidité ...) etc. En outre, les manipulations nécessitent la disponibilité des volontaires. De plus, il n'est pas possible *in vivo* d'utiliser certaines méthodes de caractérisation du film résiduel qui peuvent s'avérer destructives pour les tissus biologiques. Il serait donc très intéressant de pouvoir caractériser ce film résiduel à partir de mesures réalisées sur surfaces modèles non-biologiques. Une telle approche permettrait une meilleure standardisation des protocoles de mesures et de pouvoir envisager des méthodes de mesure complémentaires.

Comparaison des films résiduels des produits appliqués sur 3 surfaces modèles

La comparaison entre les différentes surfaces modèles et la peau *in vivo* doit être réalisée pour définir quelle surface est la plus adaptée selon le critère physico-chimie et le critère composition chimique. Ainsi, divers produits cosmétiques ont été appliqués sur les trois modèles décrits dans la partie 2 de ce manuscrit : la BS, la VS et la SFS. L'angle de contact avec l'eau a été mesuré 3 min après application des produits, comme précédemment réalisé *in vivo*. Les corrélations entre les mesures sur surfaces modèles et sur la peau sont présentées dans la figure ci-dessous (Figure 45).

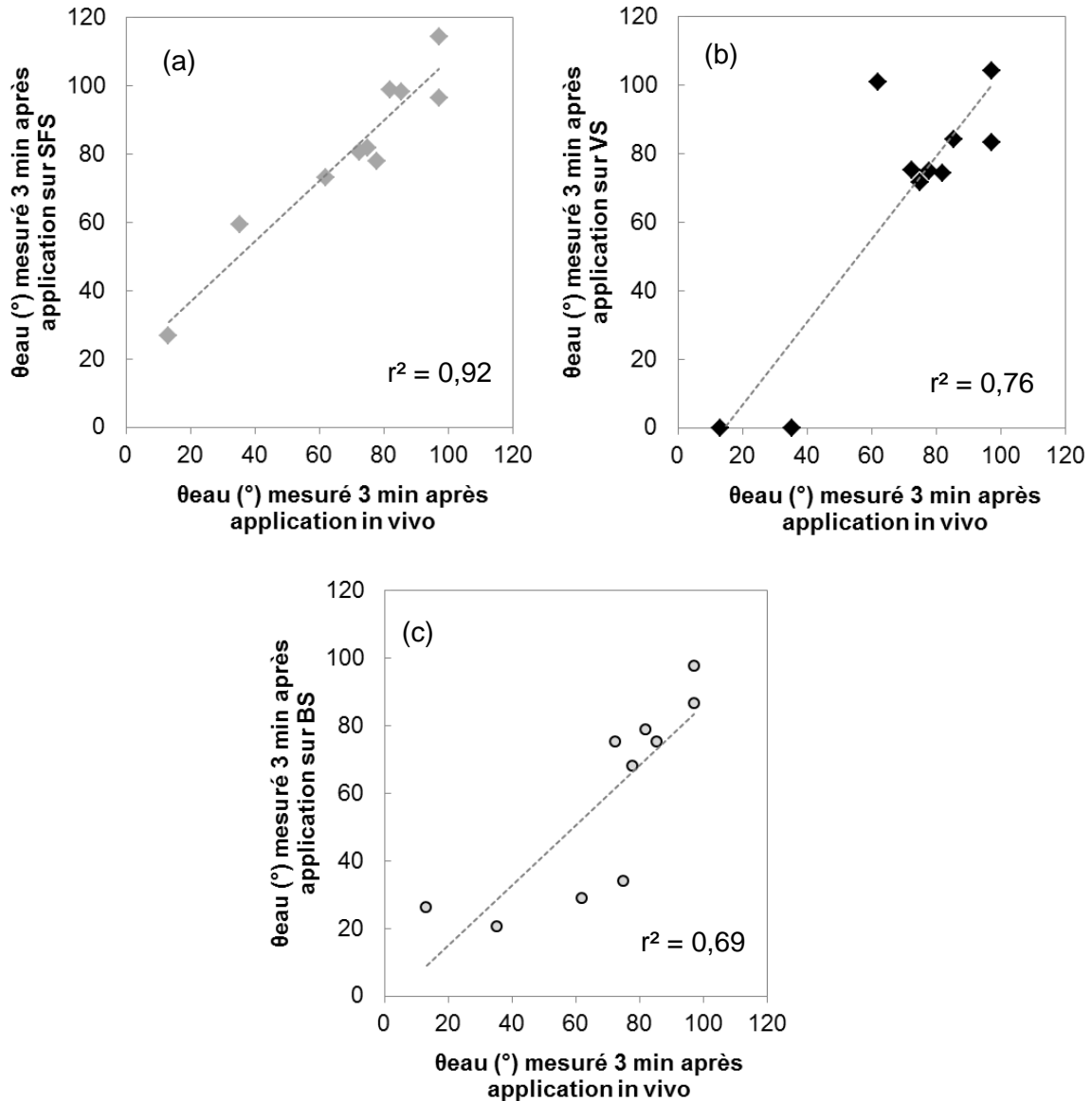


Figure 45. Corrélations obtenus entre les mesures réalisées *in vivo* et (a) sur SFS, (b) sur VS et (c) sur BS

D'après ces résultats, la SFS présente d'excellents résultats, avec un coefficient de détermination r^2 supérieur à 0,90. Les deux autres surfaces VS et BS présentent respectivement un r^2 de 0,76 et 0,69, insuffisant pour reproduire la physico-chimie du film résiduel *in vivo*.

L'équation du modèle mis au point à partir des mesures sur SFS est la suivante :

$$\theta_{\text{eau_in vivo}} = 1,04 \times \theta_{\text{eau_SFS}} - 14,12$$

Le calcul du RPD (Ratio of Prediction to Deviation) pour le modèle mathématique précédemment défini permet d'obtenir une valeur de 2,84 ; valeur caractéristique d'un très bon modèle prédictif (Cozzolino et al. 2004; François et al. 2008; Gilbert et al. 2013). Les valeurs des RPD déterminées pour les mesures sur VS et BS sont inférieures à 2,5 ;

synonymes d'une capacité prédictive insuffisante des modèles mathématiques correspondants.

Les différences observées entre les surfaces et la peau pourraient s'expliquer par une vitesse de pénétration différente des constituants des émulsions et solutions à travers les surfaces, due à des interactions ou à une porosité différente. Cette valeur de porosité n'a pas été déterminée mais pourrait être pertinente à prendre en compte pour mieux interpréter ces différences. Quoi qu'il en soit, la surface SFS est la plus adéquate pour caractériser l'impact de divers produits cosmétiques sur la mouillabilité de la peau.

Une caractérisation chimique du film résiduel a également pu être réalisée sur les modèles non-biologiques BS, VS et SFS, afin de définir quelle surface est la plus adaptée. Comme décrit pour la peau *in vivo*, des spectres infrarouges ont été réalisés sur les différentes surfaces 3 min après application de produits. Un exemple de spectre obtenu pour chaque surface est présenté ci-dessous (Figure 46).

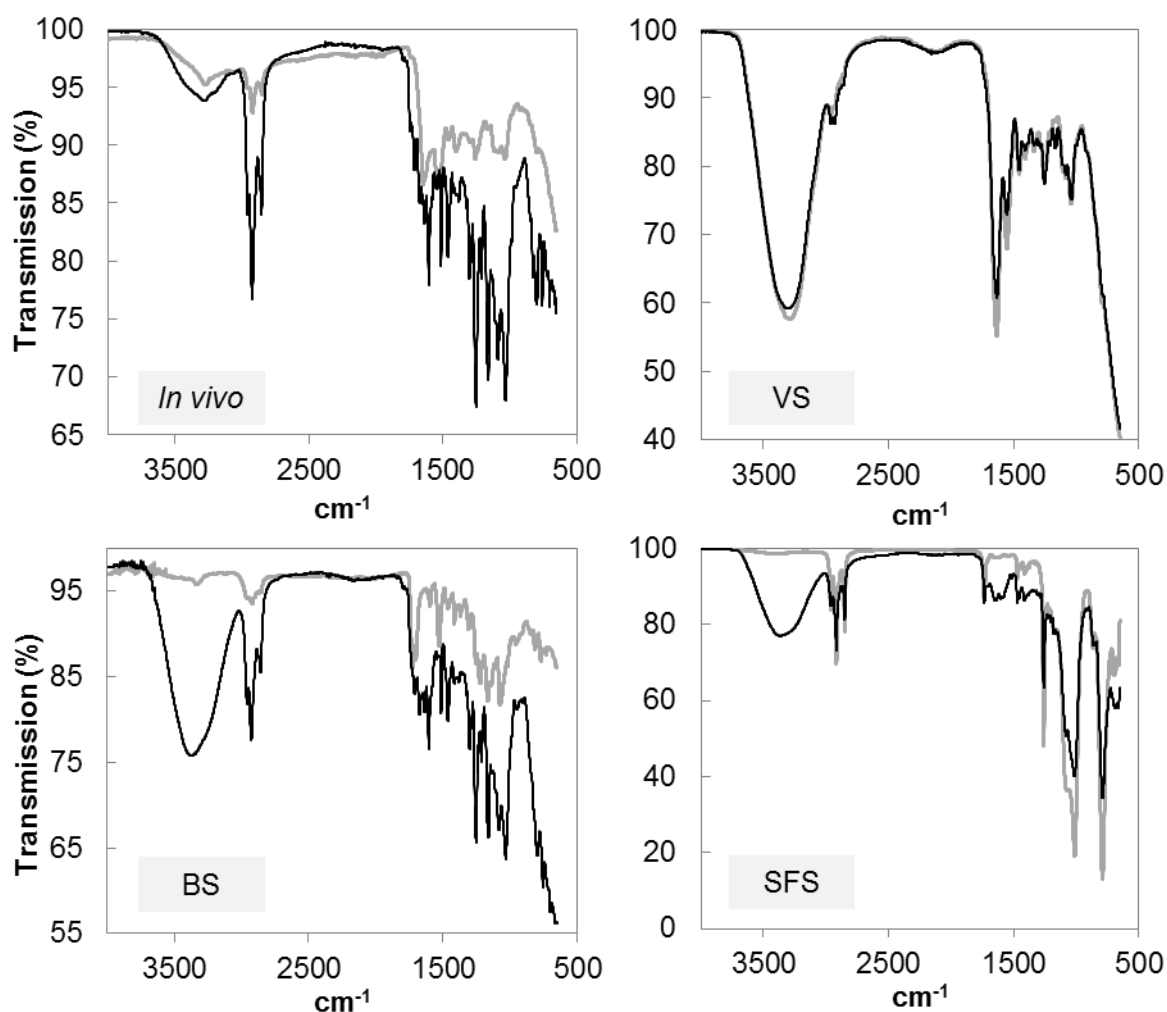


Figure 46. Spectres infrarouges obtenus 3 min après application d'une émulsion H/E (en noir) en comparaison à la surface nue (en gris)

On constate sur ces exemples de spectres, que les effets du produit appliqué sur les caractéristiques spectrales des surfaces sont très différents. Sur la VS, l'application du produit ne modifie quasiment pas les bandes d'absorption initialement présentes sur la surface. Il est donc impossible de caractériser le film résiduel du produit en utilisant cette surface.

Sur la SFS, les importantes bandes d'absorption aux alentours de 1000 cm^{-1} , caractéristiques du support Dragonskin20®, masquent une grande partie des effets du produit. De plus, les absorptions déjà marquées à 2920 et 2850 cm^{-1} sont peu impactées par l'application du produit, contrairement à la peau *in vivo*, pour laquelle ces absorptions sont initialement plus faibles. La caractérisation spectrale des produits sur ce support SFS est donc limitée.

En revanche, sur la BS, la caractérisation chimique du film résiduel est très proche de la caractérisation réalisée *in vivo*. Il est donc possible de suivre certaines longueurs d'ondes caractéristiques du produit sur cette surface, de la même façon que cela pourrait être réalisé *in vivo*. Ces résultats démontrent l'intérêt d'utiliser différents surfaces modèles de peau, de façon complémentaire, en fonction des propriétés étudiées.

A l'issue de cette étude comparative entre la peau *in vivo* et les différents modèles d'étude non-biologiques, deux modèles semblent très pertinents pour évaluer l'impact de produits cosmétiques sur les propriétés de surface : la SFS pour analyser la physico-chimie du film résiduel et la BS pour étudier ses propriétés chimiques. Ainsi, chacun des deux modèles a été utilisé pour caractériser les 11 produits cosmétiques décrits dans la partie 2 de ce manuscrit, qui seront également les produits supports des études sensorielles et anti-adhésion de particules.

Caractérisation du film résiduel de 11 produits cosmétiques

Le calcul d'énergie libre du film résiduel est réalisé sur SFS, la surface la plus proche de la peau *in vivo* en termes de physico-chimie. Cette mesure, qui n'était pas réalisable après application *in vivo* en raison de la toxicité des liquides de référence DIM et formamide, permettra de caractériser très finement le film résiduel des produits topiques.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 47). Les produits présentent ainsi des caractéristiques très variées. On retrouve les mêmes évolutions que décrites précédemment pour l'angle de contact avec l'eau : le produit P10 est du cyclopentasiloxane de faible tension de surface, qui maintient une certaine hydrophobie pour la surface SFS. Le produit P11 est une émulsion E/H et forme le film le plus hydrophobe parmi les émulsions étudiées. La solution aqueuse d'actifs (P9), les émulsions H/E et le gel

(P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 et P8) forment quant à eux un film résiduel hydrophile. En revanche, les angles de contact avec le formamide et le diiodométhane ne semblent pas dépendre de la nature de l'émulsion (E/H ou H/E) et seraient plus vraisemblablement reliés à leur composition. Dans le cas des émulsions commerciales, seule la liste INCI des produits étant disponible, il est difficile d'expliquer ces mesures de l'angle de contact. D'un point de vue fondamental, il serait intéressant d'approfondir le lien entre la composition des produits topiques et la mouillabilité de leur film résiduel.

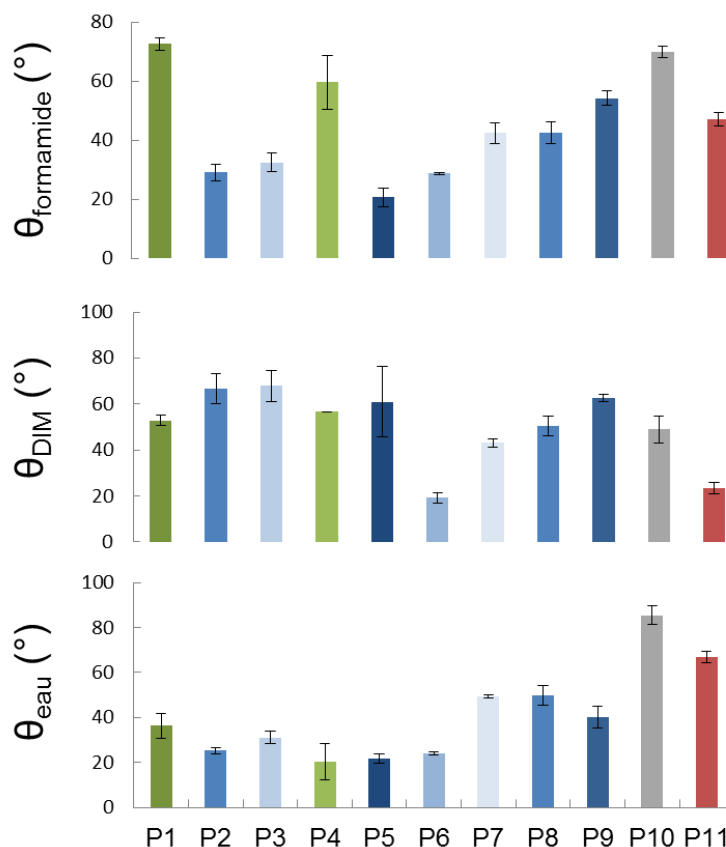


Figure 47. Mesures de l'angle de contact avec l'eau, le DIM et le Formamide 3 min après application des 11 produits étudiés (vert : produits capillaires ; bleu : émulsions H/E ; gris : émollient ; rouge : émulsion E/H)

Une ACP a été réalisée pour visualiser les 11 produits en fonction des 5 variables physico-chimiques déterminées à partir de ces mesures de l'angle de contact : γ^{LW} , γ^- , γ^+ , γ^{AB} , γ_{S} (Figure 48, données en annexe 1). D'après cette ACP, plusieurs produits possèdent des caractéristiques physico-chimiques similaires, faisant apparaître trois groupes de produits : le groupe P1, P4, correspondant aux deux produits capillaires, dont le résidu a une faible énergie de surface, un caractère monobasique très marqué et une composante polaire faible ; le groupe P2, P3, P5 dont le résidu a une énergie de surface plus élevée et un caractère plutôt bipolaire (γ^{AB} élevée) ; le groupe P6, P7, P8 ayant un résidu au caractère apolaire plus important. Trois autres produits (P9, P10 et P11) possèdent des caractéristiques différentes des autres groupes de produits. Il sera donc intéressant de voir si

ces groupes de produits possèdent également des caractéristiques sensorielles similaires ou interagissent de la même façon avec des particules.

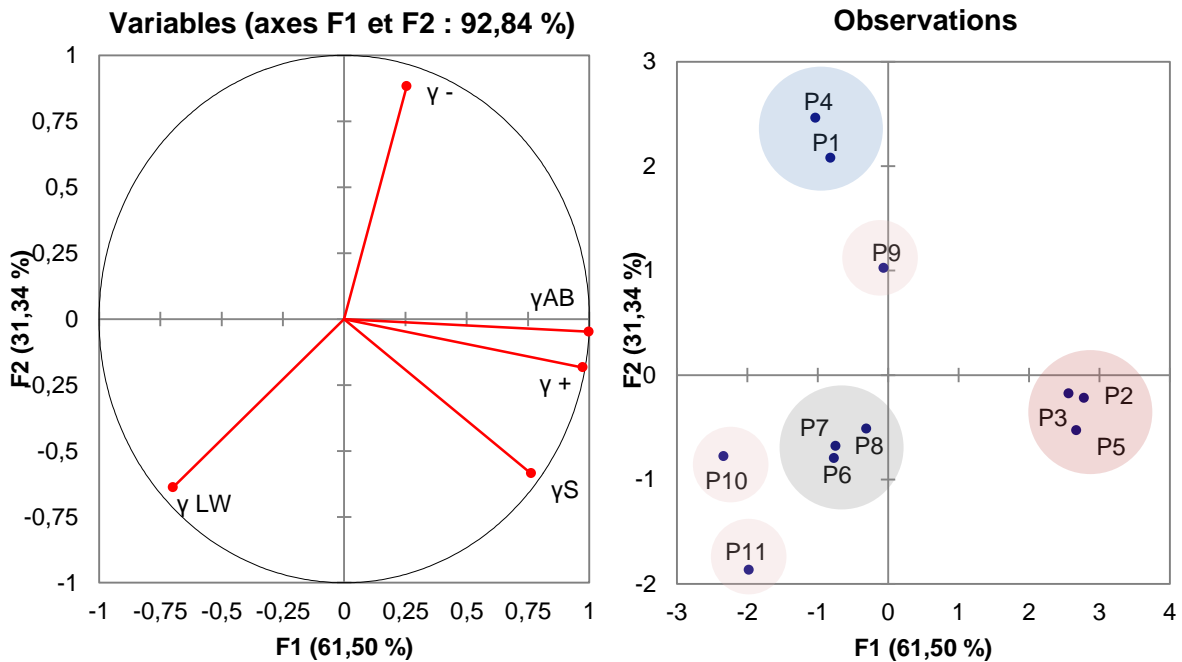


Figure 48. ACP réalisée sur les grandeurs physico-chimiques caractéristiques des films résiduels

Une caractérisation spectrale des films résiduels a été réalisée, cette fois-ci sur BS, pour analyser leur composition chimique. On constate sur certains spectres (Figure 49) les mêmes similitudes entre les produits, qui permettent en partie d'expliquer les valeurs de leurs paramètres d'énergie libre.

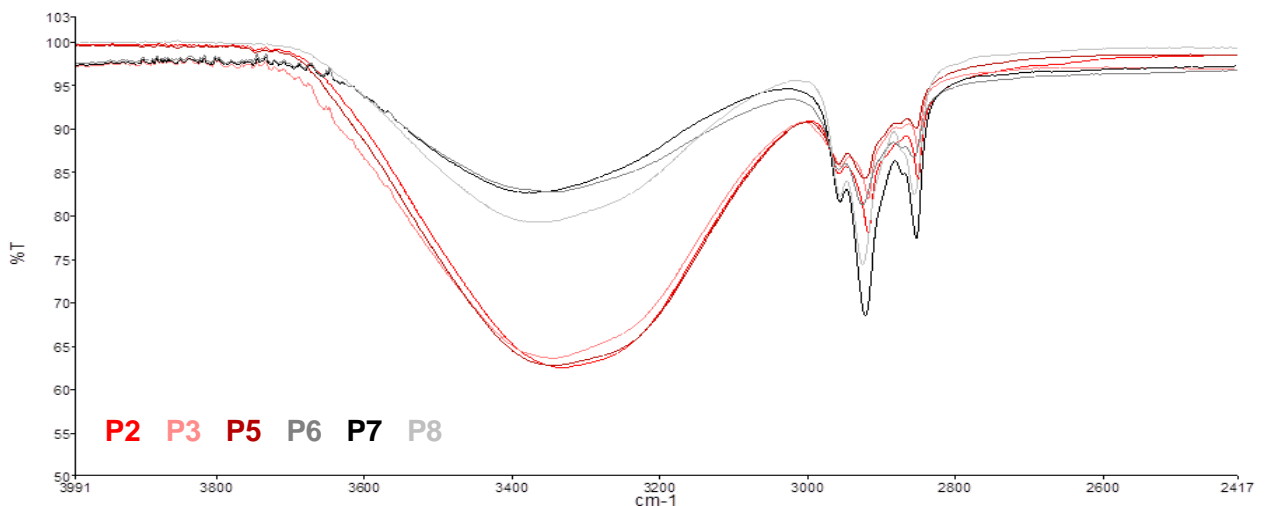


Figure 49. Spectres obtenus après application des produits P2, P3, P5, P6 ; P7 et P8 sur BS (zoom sur la zone d'intérêt entre 2417 et 3991 cm^{-1})

Notamment, les produits présentant une énergie de surface élevée et un γ^{AB} élevé (P2, P3, P5) présentent une absorption importante autour de 3300 cm^{-1} , correspondant aux

fonctions –OH et à l'eau présente dans le film ; et une absorption plutôt modérée au niveau des longueurs d'onde 2920 et 2850 cm^{-1} , correspondants aux chaînes CH_2 apolaires. A l'inverse, les produits plutôt apolaires (P6, P7, P8) absorbent beaucoup moins les longueurs d'ondes associées aux fonctions –OH mais absorbent plus les longueurs d'ondes associées aux chaînes lipidiques. Ainsi, les résidus des produits P2, P3, P5 sont plus riches en eau, expliquant leur énergie de surface plus élevée et leur plus grande hydrophilie. Les films des produits P6, P7, P8 sont eux enrichis en composés apolaires contenant des chaînes CH_2 et présentent donc une plus grande affinité avec le diiodométhane et une composante γ^{LW} plus élevée.

Cette comparaison n'est néanmoins pas généralisable aux autres produits. D'autres paramètres de composition devraient être pris en compte pour expliquer les caractéristiques physico-chimiques des films résiduels. Ceci suggère là encore des perspectives intéressantes pour le développement de produits cosmétiques, afin de mieux comprendre comment un produit modifie la surface de la peau.

En conclusion de cette partie, nous avons pu démontrer que les produits cosmétiques affectent de façon non négligeable les propriétés physico-chimiques et chimiques de la surface de la peau. L'évolution de ces différentes propriétés dépend de la nature et de la composition des produits appliqués : les conséquences sur l'hydrophilie de la peau sont très différentes selon si l'on applique une émulsion E/H ou H/E, ou simplement un émollient. Ainsi, nous allons chercher à vérifier, à travers les prochains paragraphes, si ces différences en termes de chimie et de physico-chimie se retrouvent d'un point de vue sensoriel. De plus, nous chercherons à déterminer si ces propriétés influencent ou non l'adhésion de particules polluantes.

Cette partie fut également l'objet de la présentation d'une nouvelle méthodologie d'étude des propriétés de surface de la peau. En effet, les caractérisations instrumentales de films résiduels ont été réalisées sur des surfaces non-biologiques afin de comparer leurs propriétés à celle de la peau *in vivo*. Il ressort de cette étude que deux modèles sont pertinents pour étudier les propriétés des résidus des produits : la SFS et la BS. Ces deux modèles seront donc utilisés dans les études sensorielles et anti-adhésion des particules qui suivent dans ce chapitre.

II. Caractérisation sensorielle du film résiduel après application de produits

Afin de compléter les caractérisations instrumentales présentées précédemment, les films résiduels des produits cosmétiques ont été caractérisés d'un point de vue sensoriel. Les objectifs de cette approche sensorielle étaient doubles. Le premier objectif était d'étudier

si l'adhésion des particules sur la surface de la peau pouvait être expliquée par le caractère collant du film résiduel perçu par des évaluateurs. C'est pourquoi, le descripteur de texture « collant après application » a été étudié. En effet, nous avons émis l'hypothèse que si un film résiduel est perçu comme collant, la force d'adhésion de ce film pourrait également être impliquée dans l'adhésion de particules polluantes.

Un deuxième objectif était de déterminer s'il était possible d'utiliser les caractérisations instrumentales réalisées précédemment, pour prédire la sensorialité du film résiduel. Cet apport méthodologique représenterait un gain de temps et d'argent considérable puisque cela permettrait de déterminer une propriété sensorielle du film résiduel uniquement à partir de mesures instrumentales. Pour renforcer l'intérêt de cette approche, il fallait que cette mesure puisse être réalisée sur l'une des surfaces non-biologiques précédentes, à savoir la BS et/ou la SFS. Ainsi, une comparaison entre les propriétés résiduelles sensorielles sur la peau *in vivo* et sur les deux surfaces modèles a été réalisée pour le descripteur « collant après application ».

II.1. Analyse sensorielle du film résiduel *in vivo* et sur modèles non-biologiques

Des séances d'analyse sensorielle ont été réalisées sur trois surfaces : la peau *in vivo*, support usuel pour l'évaluation sensorielle, ainsi que les deux modèles non-biologiques BS et SFS. Pour rappel, comme explicité dans la partie 2 de ce manuscrit, pour des raisons de simplification, la SFS a été utilisée sans sébum et a été colorée pour rapprocher son aspect visuel de la peau *in vivo*, limitant ainsi l'influence d'une différence de couleur sur la perception des panélistes.

Comparaison tactile des surfaces étudiées

Dans un premier temps, la perception sensorielle de ces surfaces a été comparée avant application de produits. Trois descripteurs ont été analysés : le collant, le brillant et le rugueux, comme décrit dans la partie 2. L'objectif était de détecter d'éventuelles différences entre les propriétés tactiles des surfaces, qui pourraient influencer la perception du film résiduel de produits cosmétiques. La somme des rangs attribués à chaque surface pour chaque descripteur est présentée ci-dessous (Figure 50). D'après le test statistique de Friedman (voir partie II), la BS ne présente aucune différence statistiquement significative par rapport à la peau *in vivo*. Sa perception tactile selon ces trois descripteurs est donc très similaire à la peau, ce qui en fait une surface très prometteuse pour l'évaluation sensorielle du film résiduel. En revanche, la SFS présente deux différences statistiquement significatives par rapport à la peau, pour les descripteurs « rugueux » et « collant ». Ceci pourrait

engendrer des différences dans les perceptions des films résiduels. La texture plus rugueuse de la SFS, malgré sa topographie très proche de la peau, pourrait être due à une plus grande rigidité de la surface, contrairement à la BS qui présente des propriétés viscoélastiques similaires à la peau (Jachowicz, McMullen, and Prettypaul 2007). Le caractère collant quant à lui peut être dû à la nature du matériau utilisé comme support pour la SFS. En effet, le support Dragonskin20® sans le revêtement de lipide possède une très faible énergie de surface ($19,7 \pm 5,0$ mJ/m² indiqué dans le chapitre 1), qui peut induire une plus grande adhésion de ce matériau sur la peau (Venkatraman and Gale 1998). La BS quant à elle possède une énergie de surface de 28,5 mJ/m² (Eudier et al., n.d.), plus proche de la peau, ce qui peut réduire la force d'adhésion entre cette surface et la peau. Il sera intéressant de voir si ces différences peuvent modifier les perceptions sensorielles des produits appliqués sur ces surfaces.

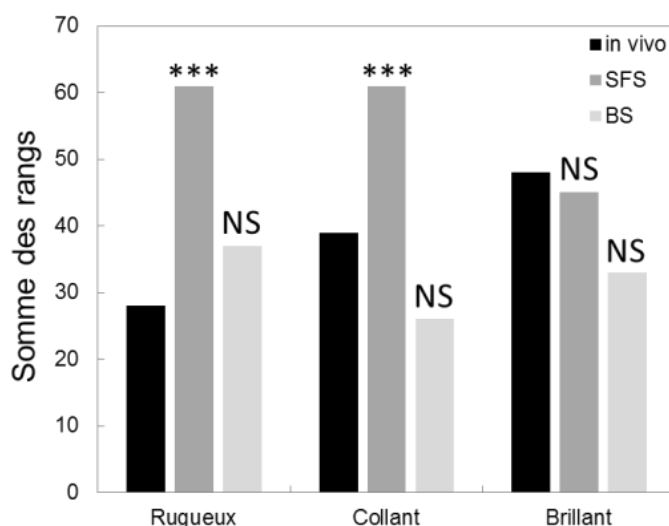


Figure 50. Résultats du test de classement des trois surfaces selon les descripteurs Rugueux, Collant et Brillant (indication statistique par rapport à la peau *in vivo*)

Comparaison de la perception de collant après application en fonction des surfaces utilisées

Les notes attribuées, sur une échelle de 0 à 7, pour chaque produit sur chaque surface correspondant à la perception de collant après application sont présentées ci-dessous (Figure 51).

Tout d'abord, concernant les notes obtenues *in vivo*, les produits analysés sont très bien discriminés par les panélistes (ANOVA, $p < 0,0001$), ce qui signifie que les produits possèdent des propriétés résiduelles sensorielles bien distinctes. Ensuite, les notes obtenues sont comprises entre 0,60 pour le produit P10 et 6,08 pour le produit P1, et le test de comparaison multiple de Tukey forme 5 groupes de produits. Cela signifie que les

produits sont bien répartis sur l'échelle du collant et donc que l'échelle choisie est adaptée à cette étude. Le produit P1 est le gel coiffant, une galénique riche en polymères et copolymères synthétiques filmogènes, qui forment un film résiduel important sur la peau. Il n'est donc pas surprenant qu'il s'agisse du produit le plus collant. Le produit P10, le cyclopentasiloxane, est connu pour être un émollient très peu collant, ce qui a déjà été mis en évidence dans la littérature (María Emma Parente, Gámbaro, and Ares 2008). Les résultats obtenus par les panélistes sont donc cohérents. De ce fait, le protocole d'évaluation mis au point permet d'évaluer de façon précise les produits et apparaît bien discriminant.

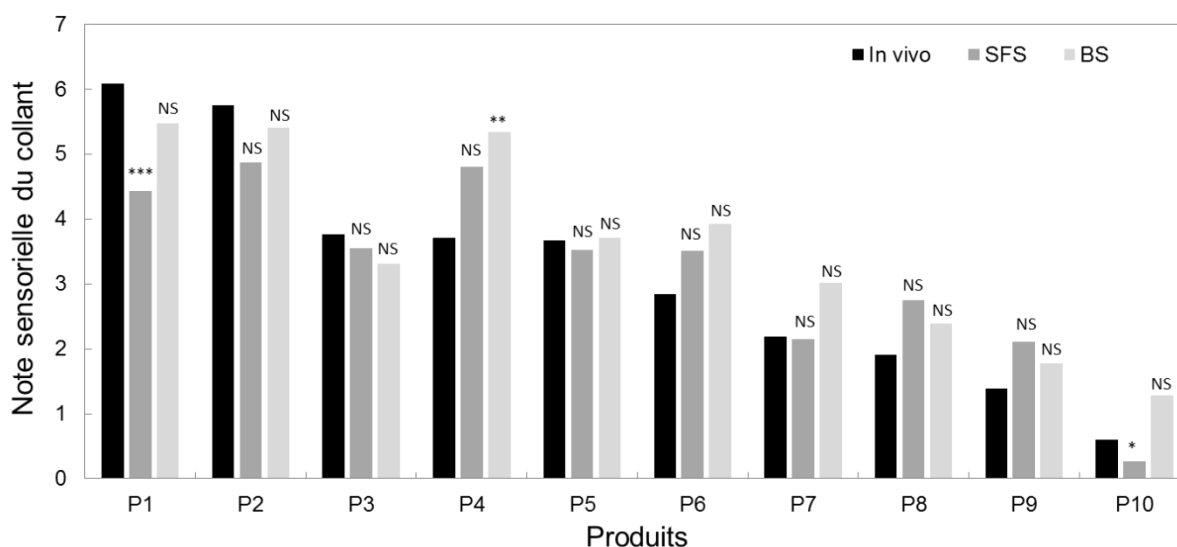


Figure 51. Notes obtenues pour chaque produit sur chaque surface (indication statistique par rapport à la peau *in vivo*)

Ensuite, ces 10 mêmes produits ont été évalués selon le même protocole sur les surfaces BS et SFS afin de vérifier si ces surfaces permettent de reproduire la sensorialité du film résiduel pour le descripteur « collant ». D'après l'ANOVA réalisée, la différence entre les trois surfaces n'est pas statistiquement significative ($p = 0,20$). Les valeurs moyennes de collant obtenues, tous produits et juges confondus sont de 3,19 pour la peau *in vivo*, 3,20 pour la SFS et 3,56 pour la BS. De ce fait, le caractère plus collant de la surface SFS nue ne semble pas avoir impactée de façon importante la perception de collant des films résiduels. Les produits sont également bien discriminés sur SFS et BS ($p < 0,0001$ pour les deux surfaces) et bien répartis sur l'échelle de collant (notes entre 0,27 et 4,87 pour la SFS et entre 1,27 et 5,47 sur la BS). La SFS est tout de même légèrement moins discriminante que la BS et la peau *in vivo*, ce qui est mis en évidence par la comparaison multiple de Tukey, formant seulement 3 groupes de produits évalués sur SFS contre 5 pour la BS et la peau *in vivo*.

Certains produits sont perçus statistiquement différemment selon la surface sur laquelle ils sont appliqués (Figure 51) : l'effet surface x produit est donc significatif. En effet,

la note attribuée au produit P1 appliqué sur la SFS est statistiquement plus faible ($p = 0,001$) que celle attribuée après application *in vivo* et sur BS, de même que pour le produit P10 ($p = 0,024$). Le produit P4 est perçu statistiquement plus collant après application sur BS que sur les deux autres surfaces ($p = 0,009$). Ces quelques différences démontrent donc que selon la surface sur laquelle est appliqué un produit, sa sensorialité résiduelle peut être perçue légèrement différemment.

Pour vérifier quelle surface est la plus proche de la peau *in vivo* en termes de sensorialité du film résiduel, des corrélations linéaires entre les notes de collant obtenues *in vivo* et obtenues sur SFS (Figure 68 (a)) et sur BS (Figure 68 (b)) ont été réalisées.

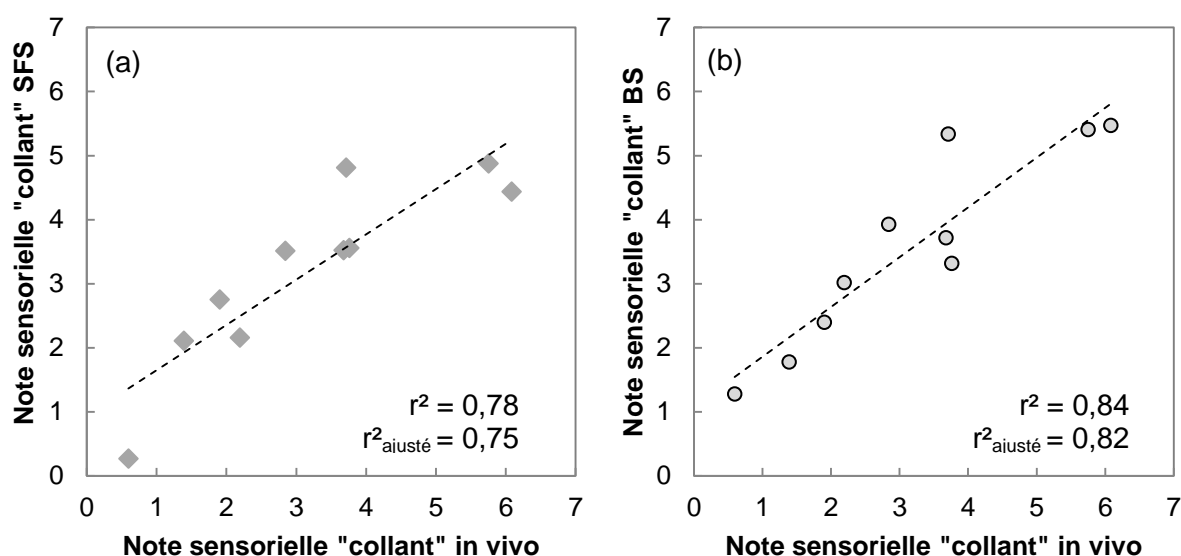


Figure 52. Corrélation entre les notes de « collant » obtenues *in vivo* et sur (a) SFS (b) BS

L'équation obtenue pour la corrélation entre les données *in vivo* et sur BS est la suivante :

$$\text{Collant BS} = 1,08 + 0,78 \times \text{Collant in vivo}$$

Le r^2 et le $r^2_{\text{ajusté}}$ sont supérieurs à 0,80 ce qui démontre que les données sont très bien corrélées entre les deux surfaces. Ainsi, la perception sensorielle du collant sur BS est très proche de celle perçue *in vivo* par les panélistes.

L'équation obtenue pour la corrélation entre les données *in vivo* et sur SFS est la suivante :

$$\text{Collant SFS} = 0,94 + 0,71 \times \text{Collant in vivo}$$

Le r^2 et le $r^2_{\text{ajusté}}$ sont inférieurs à 0,80, les données sont donc moins bien corrélées qu'avec la BS. Ainsi, la SFS ne reproduit pas suffisamment bien le collant résiduel qui peut être perçu *in vivo*.

D'après l'ensemble de ces résultats, la BS semble être la surface la plus adaptée pour reproduire la sensorialité du film résiduel, selon le descripteur « collant après application ». Le produit P4, perçu statistiquement différemment sur la BS et qui réduit la corrélation, est le shampoing Head&Shoulders, par essence destiné à une application sur cheveux. De ce fait, il est très difficile à étaler de façon homogène à la fois sur les surfaces synthétiques et sur la peau *in vivo*. Cette inhomogénéité d'étalement pourrait expliquer cette différence de perception. Les autres produits de soin cutanés sont eux tous perçus de façon très proche *in vivo* et sur BS.

A l'issue de cette étude, nous avons pu caractériser le film résiduel des produits cosmétiques étudiés, selon le descripteur « collant après application ». Nous verrons dans les prochaines parties si ce caractère collant est relié à d'autres propriétés du film résiduel et s'il permet d'expliquer l'adhésion des particules.

II.2. Apport méthodologique de l'étude de surfaces non-biologiques : développement d'une méthode 100% instrumentale pour prédire une propriété sensorielle résiduelle

Cette partie a fait l'objet d'un article accepté dans le journal Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

Nous avons démontré précédemment que l'analyse sensorielle du collant résiduel sur surface synthétique pouvait être une approche pertinente puisque certaines surfaces, notamment la BS, sont capables de reproduire la sensorialité de la peau après application de produits. Ceci peut être très intéressant lorsque l'on étudie des produits en cours de développement dont la toxicité n'est pas encore évaluée, puisque l'utilisation d'une surface synthétique permet d'éviter l'application *in vivo* du produit. Néanmoins, cela nécessite encore de faire appel à un panel, qui devra évaluer la surface après application et donc qui entrera en contact avec le produit testé.

Pour aller plus loin dans notre démarche, nous avons donc développé un protocole instrumental capable de mesurer, à la place d'un panéliste, la sensation de collant après application. Pour cela, un texturomètre a été utilisé. Cet appareil mesure la force appliquée par une sonde lorsqu'elle se déplace verticalement à travers ou au contact d'un échantillon. Le protocole mis au point vise à reproduire le protocole sensoriel d'évaluation du collant :

une sonde sphérique (remplaçant la tranche de la main) est pressée contre la zone d'application du produit puis est décollée lentement. Le travail nécessaire pour décoller la sonde de la surface est alors mesuré, correspondant au « collant » instrumental. La publication suivante décrit de façon précise le protocole utilisé et discute de la validité du protocole *in vivo*, puis sur surfaces synthétiques.

Deux surfaces synthétiques ont donc été utilisées dans cette étude : la BS, précédemment décrite, et une surface simple et standard, le polypropylène. Ce polymère a été choisi car il a déjà été utilisé dans des protocoles de prédiction des propriétés sensorielles (Gilbert et al. 2013) et possède une énergie de surface similaire à la peau *in vivo* ($26,6 \pm 2,2$ mJ/m²). En outre, elle présente l'avantage d'être très facilement accessible, à faible coût. L'évaluation sensorielle du collant sur ces deux surfaces est ainsi comparée à la perception sensorielle du collant *in vivo*, puis la surface la plus pertinente sera utilisée dans le développement du protocole instrumental.

L'ensemble des résultats présentés permet de définir un modèle hautement prédictif permettant de mesurer le collant après application sans faire intervenir de panel et sans application *in vivo*. Il s'agit donc d'un outil de prédiction efficace pour évaluer rapidement et objectivement le comportement après application d'ingrédients ou de formules cosmétiques. Le caractère collant est généralement perçu négativement par l'utilisateur et le formulateur sera donc plutôt amené à rechercher une minimisation de cet attribut de texture. L'approche développée pourra être très utile dans le cadre d'un premier screening, par exemple, dans toute démarche de développement de nouveaux produits.

Prediction of residual film perception of cosmetic products using an instrumental method and non-biological surfaces: the example of stickiness after skin application.

EUDIER Florine, HIREL Déborah, GRISEL Michel, PICARD Céline, SAVARY Géraldine*

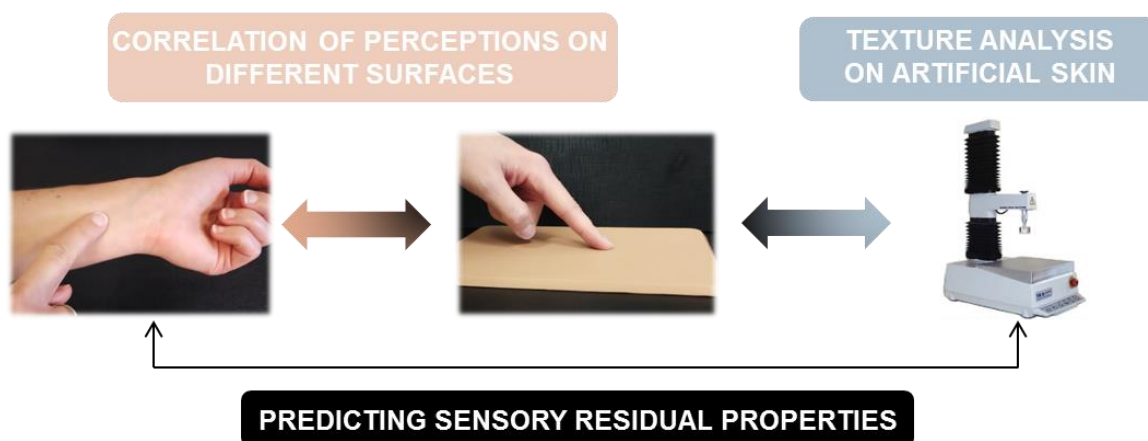
*Normandie Univ, France; UNILEHAVRE,FR 3038 CNRS, URCOM, EA 3221, 25 rue
Philippe Lebon BP 1123, 76063 Le Havre cedex, France*

*Corresponding author geraldine.savary@univ-lehavre.fr

Abstract

Prediction of sensory texture attributes using instrumental measurements is a very important challenge for cosmetic industry because *in vivo* sensory studies are expensive, time consuming and limited by the safety issue of applied products. The aim of this work is to investigate how residual sensory properties of cosmetic products can be predicted without using a panel of assessors, focusing on the residual film attribute “Stickiness”. 10 cosmetic products with different galenics have been selected and evaluated *in vivo* using a classical sensory protocol, developed according to the Spectrum™ Descriptive Analysis method. In addition to this study, products were evaluated after their application on non-biological skin models in order to compare perceptions onto *in vivo* skin and artificial surfaces. Results obtained show that *in vivo* perceptions can be compared with the ones on artificial surfaces meaning that residual film stickiness is similar between *in vivo* skin and non-biological skin models. An instrumental protocol using a texture analyzer has been set up to evaluate residual film adhesiveness. This protocol has been tested and validated *in vivo* ($r^2_{\text{adjusted}} = 0.904$; RPD = 3.065) before being optimized on a selected non-biological skin model Bioskin® (Beaulax, Co. Ltd. Tokyo, Japan) owning good correlation with *in vivo* perceptions. Established model shows excellent predictive ability with a r^2_{adjusted} of 0.941 and a RPD of 3.384, as highlighted by the 4 steps cross-validation performed. It proves that physical stimulus responsible for cosmetic film stickiness can be instrumentally measured on both *in vivo* skin and artificial skin.

Graphical abstract



Highlights

- *In vivo* sensory perceptions of stickiness after application have been correlated with evaluation performed on Bioskin®, an artificial skin model ($r^2_{\text{adjusted}} = 0.822$).
- The physical stimulus responsible for cosmetic film stickiness has been measured using texture analyzer *in vivo* and on Bioskin®.
- A predictive model has been set up and cross-validated to evaluate instrumentally the stickiness after application on non-biological skin model ($r^2_{\text{adjusted}} = 0.941$; RPD = 3.384).

Keywords

Skin models – Sensory – Prediction – Adhesion – Texture analyzer – Residue

Statistical summary

Total number of words: 6740

Total number of figures and/or tables: 8

Introduction

Cosmetics market is very competitive, with a huge number of attractive products. To be distinguished from competitors, a cosmetic product has to be efficient but also pleasant to use, through its color, fragrance and texture [1]. Cosmetic products texture is a complex and multidimensional property [2] which can be studied instrumentally on the one hand, thanks to rheological or texture measurements [3], and through sensory analysis on the other hand [4]. Sensory methods are largely applied in cosmetic field, especially the Quantitative Descriptive Analysis (QDA) method and the Spectrum™ Descriptive analysis (SDA) method which have proved to be efficient and relevant to obtain the texture profile of skincare products [3,5,6]. Although those methods are widely used, formation and training of a panel of assessors is

time-consuming and expensive [7]. In addition, evaluated products are applied on skin so their safety has to be highly controlled, which can be a huge limitation when developing new active ingredients, texture agents or innovative formulations. In order to reduce the time and cost of sensory evaluation, several studies were led to developed instrumental protocols with the aim to estimate or predict sensory perceptions of a trained panel [2,7–9]. In most cases, protocols were adapted from food researches [10,11].

Most of studies focused on pick-up and / or application attributes, such as *difficulty of spreading* [8], *Consistency* [12] or *Stringiness* [13]. Very few studies attempted to predict residual properties of cosmetic products, such as *Quantity of residue*, *Stickiness*, *Glossiness* or *Greasiness*, especially because those attributes involved the interaction between the skin and products applied on its surface [9]. Nacht et al [14] studied the sensory perception of greasiness after the application of different emollients. They developed an instrumental apparatus to measure skin friction coefficient and showed that changes in friction coefficient after emollient application were anti-correlated with sensory evaluation of greasiness. Nevertheless, they could not evidence any correlation between friction measurements and skin stickiness.

Friction was also studied by Lodén et al [15] through sensory assessment of the *ease of moving fingertips on the skin* after the application of five moisturizing creams. In this case friction measurements and sensory attribute were well correlated. Friction also seemed to be linked to moisturizing properties of creams and skin hydration [16].

Parente et al [9] evaluated the relation between emollient instrumental properties and residual sensory attributes such as *glossiness*, *oiliness* or *stickiness*. Partial least squares regression analysis allowed them to find relation between physico-chemical properties of emollients (surface tension, spreadability) and skin after-feel.

To summarize, the cited studies highlighted correlations but no clear predictive models have been defined and validated. In addition, the study of ingredients and cosmetic creams always involved application onto *in vivo* skin which does not allow countering the problem of product safety. Indeed, residual properties studies conducted using only instrumental measurements without *in vivo* application focused on one ingredient, such as emollient [9], and have not been extended to a wider range of complex matrices. Consequently, new methodologies are needed to extend correlation and prediction to cosmetic colloids containing usually more than 10 ingredients. In addition, *in vivo* application has to be avoided in order to develop a 100% instrumental protocol, without the use of a panel of volunteers. To set up such a protocol, several artificial surfaces [17–21] are available and can be an interesting alternative that need to be investigated.

From those statements, the present study aims at developing an original methodology to evaluate *Stickiness* after application of diverse cosmetic products. 10 products chosen among haircare, skincare or raw materials have been evaluated by an expert panel according to the SDA method. Sensory evaluation has also been performed on two specific artificial surfaces mimicking some skin surfaces properties: Bio Skin Plate #30 (Beaulax, Co. Ltd, Tokyo, Japan) and Polypropylene sheet. These commercial materials have been selected for their availability, ease-to-use and relative low cost. Comparison between sensory perceptions *in vivo* and on artificial surfaces by a trained panel was discussed, following by the choice of the most appropriate surface to evaluate stickiness. Then, the development of an instrumental protocol using a texture analyzer was performed, then validated *in vivo* and adapted to the selected artificial surface. The predictive model set up was described and validated in order to demonstrate its validity and its robustness.

Materials & Methods

1. Studied cosmetic products and raw materials

Ten cosmetic products and raw materials have been selected for this study. Their commercial name, code and classical use are given in table 1. A standard O/W emulsion has been prepared according to the composition and protocol described in details in [3]. All products own various galenic forms and uses in order to extend the scope of the study to a wide products universe.

Table 1: Names, codes, applications and texture analyzer measurements performed on studied products

Product name	Code	Application	Log(AUC _{IV}) measured <i>in vivo</i>	Log(AUC _{BS}) measured on Bioskin® condition C
L'Oreal Paris Studio Line Out of Bed	P1	Styling hair gel	0.139 ^a	0.109 ^a
Aderma Hand cream with oat milk	P2	Hand cream	0.054 ^a	-0.098 ^a
Standard O/W Emulsion	P3	Skincare	-0.529 ^b	-0.946 ^{bc}
Head & Shoulders Classic	P4	Shampoo	0.114 ^a	-0.692 ^b

Uriage Age Protect Multi-actions serum	P5	Face care	-0.862 ^c	-1.116 ^{bcd}
Uriage Depiderm Anti-tasks fluid SPF 15	P6	Face care	-1.385 ^d	-1.401 ^{cde}
Uriage Roseliane Anti-redness rich cream	P7	Face care	-1.382 ^d	-1.444 ^{cde}
Uriage Detox night cream	P8	Face care	-1.371 ^d	-1.550 ^{de}
Invincity® Solabia (INCI: Water (and) Ascophyllum nodosum Extract)	P9	Active ingredient	-2.323 ^e	-1.817 ^{ef}
Decamethylcyclopentasiloxane Evonik Goldschmidt (INCI: Cyclopentasiloxane)	P10	Silicon ingredient	-2.161 ^e	-2.271 ^f
Bare skin	/	/	-2.797 ^f	-3.000 ^g

^{a-g}Values with the same letter in one column indicate that corresponding products are not significantly different from the considered measurements.

2. Non-biological skin surfaces

Two standardized non-biological surfaces have been chosen for this study. The artificial Bio Skin Plate #30 was supplied by Beaulax, Co. Ltd, Tokyo, Japan (referred as BS). This 4mm-thickness surface is a multilayer structure comprising two layers of polyurethane elastomer [22] mimicking skin elastic and viscoelastic properties [19]. This surface has been successfully used to evaluate powder foundation properties [23] or the properties of thin films applied on skin [24].

Polypropylene sheets (referred as PP) were also used as substrate (A4 Lyreco Budget Polypropylene Pocket 5,5/100E ref 119.374, Lyreco, Valenciennes, France). It is a simple surface, already used to predict sensory properties during application phase [8].

Contact angle measurements have been performed on both surfaces to determine their physico-chemical properties. Corresponding surface free energies (γ) were the following: $\gamma_{BS} = 28.5 \pm 1.1$ mJ/m² and $\gamma_{PP} = 26.6 \pm 2.2$ mJ/m². According to literature data, skin surface free energy value is 38.7 ± 6.4 mJ/m² measured on the forearm [25]. The three studied surfaces

belonged to the low surface free energy materials, as usually observed for polymeric materials [26]. These surfaces owned similar physico-chemical properties which is important when considering product application and residual film homogeneity. To conclude, the surface free energy measurement supported the choice of BS and PP for studying residual properties of cosmetic products in comparison with *in vivo* skin.

3. Sensory analysis

3.1. Assessors

The aim of the sensory test with volunteers was approved by the Ethical committee from Normandie University. Twenty-one expert women aged from 22 to 26 were selected among Normandie University's employees and students. After one training session and a familiarization with the non-biological skin models, evaluation was performed in two sessions lasting around 30 minutes (5 products evaluated by sessions) for each surface evaluation. The whole twenty-one assessors performed the *in vivo* evaluation and fourteen of them performed the evaluation on each artificial skin surface.

Evaluation was performed in a sensory laboratory composed of individual booths, according to the NF EN ISO 8589. Each product sample was presented in a 5 ml jar and identified with a randomly assigned three digit code. Presentation order was randomly defined and changed for each session to reduce bias in evaluation.

3.2. Surfaces evaluation

Before the evaluation of the residual properties of cosmetic products, assessors were asked to rank each surface (*in vivo* skin, referred as IV, BS and PP) according to the intensity of the three descriptors: *roughness*, *stickiness* and *glossiness*. This comparison will be the starting point for characterizing the sensory properties of each non-biological surface in comparison with *in vivo* skin. Differences observed could influence the perceptions of assessors.

The surface roughness was defined as the perception of small asperities which give a relief more or less important to this surface. To evaluate roughness, assessors were asked to slip their finger on the surface with a light pressure in multiple directions.

The stickiness was defined as the force needed to unstick the side of the hand pressed against the surface. To evaluate stickiness, they were asked to firmly press their hand's side onto the surface and to slowly raise it and assess the force needed to unstick.

The glossiness was defined as the tendency of the surface to reflect light. To evaluate glossiness, they were asked to place their arm or surface at 15cm under white light and move it horizontally to assess the amount of reflected light.

Ranking was from 1 (lower intensity of descriptor) to 3 (higher intensity of descriptor). Sum of ranks attributed for each surface was calculated and reported in the Results & Discussion section.

3.3. Products evaluation

Products sensory analysis have been performed according to the Spectrum™ Descriptive Analysis (SDA) method [5] which uses universal scales to rate sensory attributes to describe cosmetic products, based on physical concepts of tactile perception [8]. The studied sensory descriptor of skin feel after cosmetic products application is *stickiness*, as defined previously. To perform the evaluation, assessors were asked to draw a circle of 3.5 cm of diameter on their forearm or on artificial surfaces and to apply 30 µL of product in 10 uniform rotations in 7 seconds, with keeping the surface of application within the circle area. After 3 minutes, they were asked to press firmly the side of their hand on the application zone and then to remove it slowly to evaluate residual film stickiness.

A 0-7 scale was used to rate film stickiness and three products were used as reference to reduce variability between judges: bidistilled water scored at 0.5 ; Mixa - Intensive Dry Skin Body milk repairing extra dry skin scored at 3 ; Auchan Dishwashing liquid for sensitive skin scored at 6.5.

4. Texture analyzer measurements

4.1. *In vivo* skin measurements

The twenty-one assessors involved in the sensory evaluation also participated in the instrumental measurements, as volunteers.

In order to evaluate the adhesive property of the residual film, an instrumental protocol using the Texture Analyzer TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Cardiff, UK) connected to the Texture Exponent software was developed. The Texture analyzer measures the force applied onto a probe as a function of time and/or the distance traveled by the probe through a sample. In the present study an indentation protocol was performed as follow: the probe first moves vertically until it comes into contact with the surface and, then, sinks to a defined distance (phase 1), is maintained during 2 second (phase 2) and, finally, returns to its initial position (phase 3) (fig 1 (a)). The part of interest was the detachment phase of the probe (during phase 3 on fig 1), more precisely the work needed to unstick the probe from the surface [27,28].

The conditions of the *in vivo* application of the products were as follow:

- 35 µl of product were applied on a surface of 9.60 cm² by making 10 rotations
- Measurements were performed 3 min after the end of the application.

- Each product was tested on 4 areas of the same forearm.

Texture analyzer measurement conditions are reported in the figure below (fig 1 (a)). Apparatus was equipped with a 500g force captor and a 6.3 mm diameter steel spherical probe. Trigger force was set at 0.1 g.

To analyze measurements, force curve as function of time was reported. For each trial, the area under curve (AUC) was calculated (fig 1 (b), zoom phase 3) using the Texture Exponent software. This AUC correspond to the area for which measured forces showed negative values. This area corresponds to the work needed to unstick the probe from the skin [27,28]. Mean values obtained for each product are logarithmically transformed and reported in table 1.

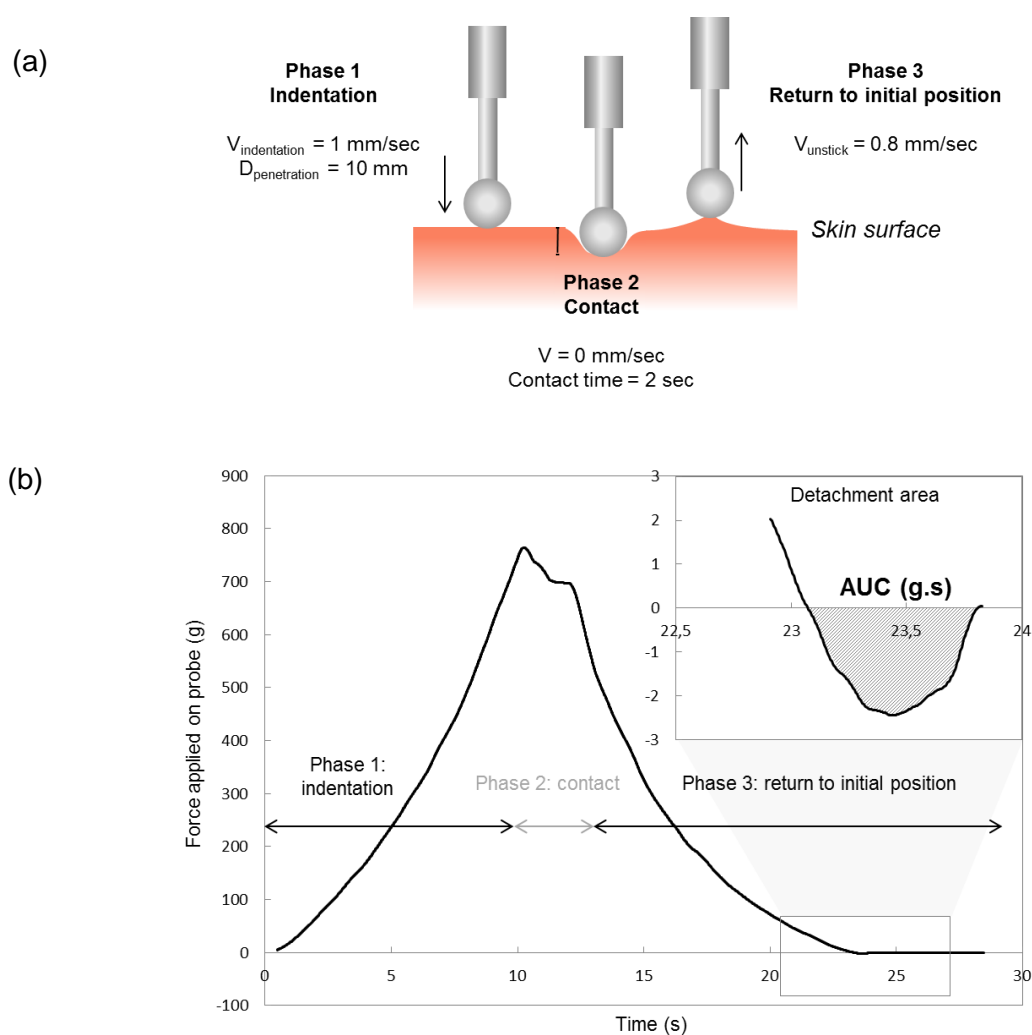


Fig 1: (a) Indentation protocol used for *in vivo* skin evaluation and (b) evaluated parameter

4.2. BS measurements

The same apparatus was used to evaluate the adhesiveness of residual film formed on BS surface. Measurements and application parameters have been optimized to reach the best

correlation with *in vivo* sensory data. Three conditions were tested, as reported in table 2, and are discussed in Results & Discussion section. Each condition was performed five times on the surface. AUC values measured on BS using condition C and logarithmically transformed are reported in table 1.

Table 2: measurement and application conditions tested for BS instrumental evaluation.

Condition	A	B	C
Waiting time after application	30 sec	3 min	3 min
Applied product quantity (μL)	35	35	35
Number of laps	10	10	10
Indentation speed (mm/s)	1	1	1
Unstick speed (mm/s)	0.8	0.8	0.4
Contact time (s)	2	2	2
Penetration distance or force	3 mm	3 mm	500g

5. Statistical analysis

Statistical analysis of data has been performed using XLSTAT software, from Addinsoft (version 2012.1.01). Two or three factors analyses of variance (ANOVA) were performed on sensory data to evaluate product discrimination, panel performance, surface effect or interaction surface x product. When discrimination between products or surfaces was significant ($p < 0.05$), mean scores obtained were compared using the Tukey multiple comparison test to form groups of similar products or surfaces.

Difference in sensory perception between the three evaluated surfaces (IV, BS and PP) according to the ranking performed on three descriptors was analyzed using the Friedman test. This test allows determining statistically significant difference between the sums of ranks for each descriptor and surface. When difference between surfaces was significant ($p < 0.05$), a multiple comparison test using Bonferroni correction was carried out to form groups of similar surfaces.

Linear correlations between sensory data obtained on the three surfaces were assessed using Pearson's correlation coefficients. These coefficients were also calculated between *in vivo* sensory data and linear or logarithmically transformed instrumental data [8].

Linear regressions were carried out to set up predictive models. A cross-validation with 4 segments was performed to validate robustness of predictive models. The 10 products plus

the instrumental value measured on bare skin or bare surface were included in the validation process. The data set of 11 values was then randomly divided into a calibration group (8 products) and a validation group (3 products), representing a segment. 4 segments were thus defined in order to use each value at least once in the validation group. Mean adjusted determination coefficient (r^2_{adjusted}) for the 4 calibration sets were calculated as well as the Root Mean Square Error of calibration (RMSE_{cal}), the Root Mean Square Error of validation (RMSE_{val}) and the Ratio to Deviation (RPD corresponding to the ratio between standard deviation and RMSE_{val}). All model parameters were used to evaluate the prediction robustness. The RPD characterized the accuracy of predictive models: when $\text{RPD} < 1.5$, the model leads to unreliable results; for $2.0 < \text{RPD} < 2.5$, the model gives crude quantitative prediction; for $2.5 < \text{RPD} < 3.0$, the model is able to predict quantitatively; and, finally, for $3.0 < \text{RPD}$ the model prediction is considered as excellent [29,30].

Results & Discussion

The present study is divided into several steps. First, a regular sensory analysis of 10 cosmetic products has been performed to evaluate their *stickiness* after application, defined as the force needed to unstick the side of the hand from skin surface. This first study aimed validating the evaluation protocol. Then, a second sensory evaluation has been performed after the application of the 10 products on two non-biological surfaces: BS and PP. A study of their bare surface properties allowed comparing those surfaces with *in vivo* skin. The sensory scores obtained for each product applied on both surfaces were compared with the first *in vivo* evaluation to select the most appropriate and performing surface for sensory analysis of residual stickiness.

Finally, an instrumental protocol using a Texture Analyzer has been developed for *in vivo* skin measurements of residual film adhesiveness, and adapted onto the selected non-biological surface. The objective was to compare the *in vivo* sensory scores and the instrumental measurements in order to set up a reliable predictive model.

Results of each study are presented and discussed in the following paragraphs.

1. *In vivo* sensory perception of film stickiness: protocol validation

An *in vivo* sensory characterization of residual film stickiness has been performed for 10 cosmetic products and raw materials. Mean scores obtained for each product are presented in fig 2. According to the ANOVA, differences between evaluated products are highly significant ($p < 0.0001$) which means that assessors were able to discriminate the 10 products. Scores are comprised between 0.60 and 6.08 and the Tukey multiple comparison test formed five groups of products (group A: P1-P2; group B: P3-P4-P5-P6; group C: P6-P7-

P8; group D: P7-P8-P9; group E: P10), showing that products are well distributed on the residual stickiness rating scale.

To develop consistent predictive models, it is necessary to well discriminate products and give accurate scores. Indeed, to define correlation between two data sets, it is important to have as many points as possible spread on the correlation line. With the high products discrimination ($p < 0.0001$) and the formation of 5 products groups, one can expect to set up reliable correlations and models.

Consequently, the statistical analysis of *in vivo* sensory evaluation data confirms the consistency of the 10 selected products, which own markedly different intensities of stickiness. Unsurprisingly, hair styling gel appears as the stickiest product, this being consistent with its usual application. On the opposite, the less sticky product is cyclopentasiloxane, a classical emollient frequently used in cosmetic products. Its non-sticky behavior was already highlighted by Parente et al [31], thus showing that panel and protocol results are consistent with literature data. To conclude the first part of this study, data confirm that the proposed protocol is adapted to the evaluation of stickiness after application and that products are well discriminated by panel and own well defined stickiness intensities.

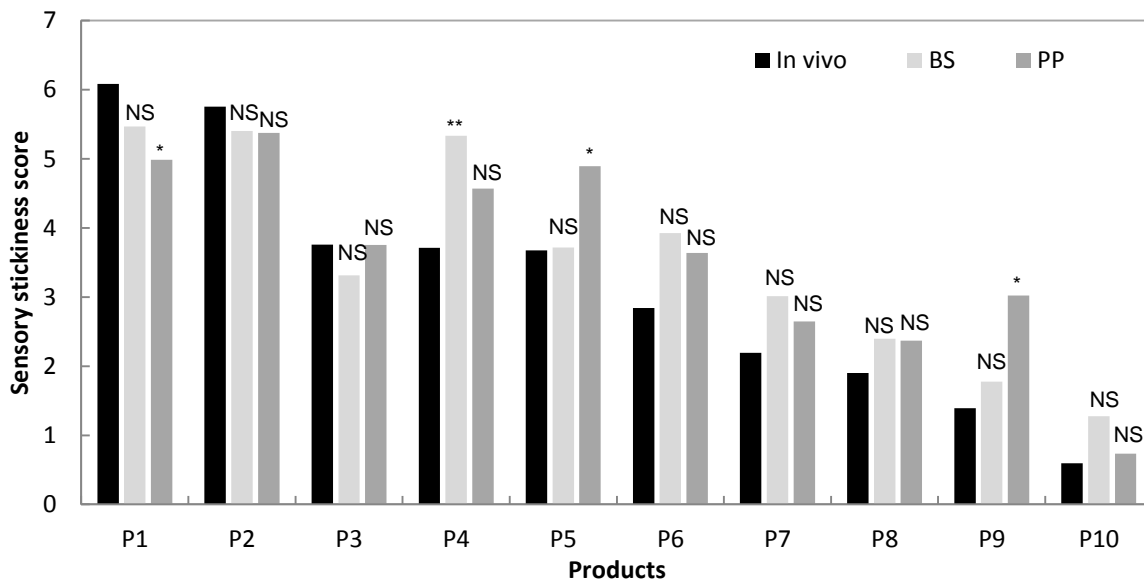


Fig 2: Mean sensory scores for the different products as obtained *in vivo*, on BS and PP.

A-E: Tukey's groups of products; NS: non-significant compared to *in vivo*; * $p < 0.05$ compared to *in vivo*; ** $p < 0.01$ compared to *in vivo*

2. Sensory evaluation of film stickiness on artificial surfaces: choice of the most performing surface

2.1. Sensory characterization of non-biological surfaces

In order to study the sensory properties of the three surfaces, namely *in vivo* skin, BS and PP, and to highlight possible differences between them, assessors were asked to rank the bare surfaces from 1 (lowest intensity) to 3 (highest intensity) according to three descriptors: roughness, stickiness and glossiness. Sum of ranks obtained are presented in fig 3. According to the Friedman test and the multiple comparison test, BS was not statistically significantly different from *in vivo* skin for roughness, stickiness and glossiness. Inversely, PP presented highly significant differences from BS and *in vivo* skin for roughness and glossiness. As a consequence, on the basis of bare sensory characteristics, BS seems closer to *in vivo* skin than PP.

Results also point out that the three surfaces did not show significant differences for the descriptor “stickiness”. Consequently, the stickiness of these bare surfaces should not influence sensory perception of stickiness after application of cosmetic products. In the case of other residual properties such as the *glossiness*, PP would not be adapted because its bare surface glossiness is significantly different from *in vivo* skin.

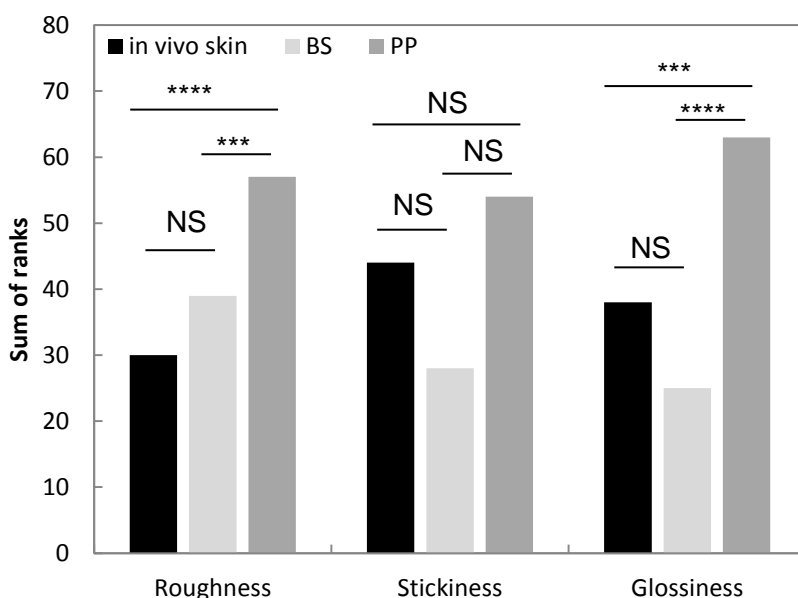


Fig 3: Sum of ranks for each descriptor evaluated on the three surfaces before product application

NS: non-significant; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

2.2. Comparison between *in vivo* skin evaluation and perception on non-biological surfaces

The 10 previously evaluated products have been rated according to the stickiness attribute after application on BS and PP, using the same protocol as *in vivo* skin evaluation. Results are presented on fig 2, in comparison with the *in vivo* data. The ANOVA carried out on data of the three surfaces shows that surfaces presented significant differences ($p = 0.006$). The Tukey multiple comparison test indicated that mean scores on PP (3.65) was significantly higher ($p = 0.008$) than the one obtained on *in vivo* skin (3.19), whereas the mean scores on BS (3.54) did not show significant difference ($p > 0.05$) with *in vivo* skin data. Nevertheless, products were well discriminated by the panel on BS and PP ($p < 0.0001$ for both surfaces). The Tukey multiple comparison test formed 5 groups of products on each surface, whose result is comparable to *in vivo* skin data.

The interaction surface x product was also significant ($p = 0.010$) meaning that among products, some were perceived differently from one surface to another (as indicated on fig 2). One product (P4) evaluated on BS was perceived significantly different from *in vivo* skin ($p = 0.009$) whereas 3 products (P1, P5, P9) evaluated on PP were perceived significantly differently from *in vivo* skin ($p < 0.05$). Consequently, PP seemed to impact more markedly the surface x product interaction when compared to BS.

From those results, linear correlations were established between *in vivo* skin data and scores obtained on BS (fig 3a) and on PP (fig 3b).

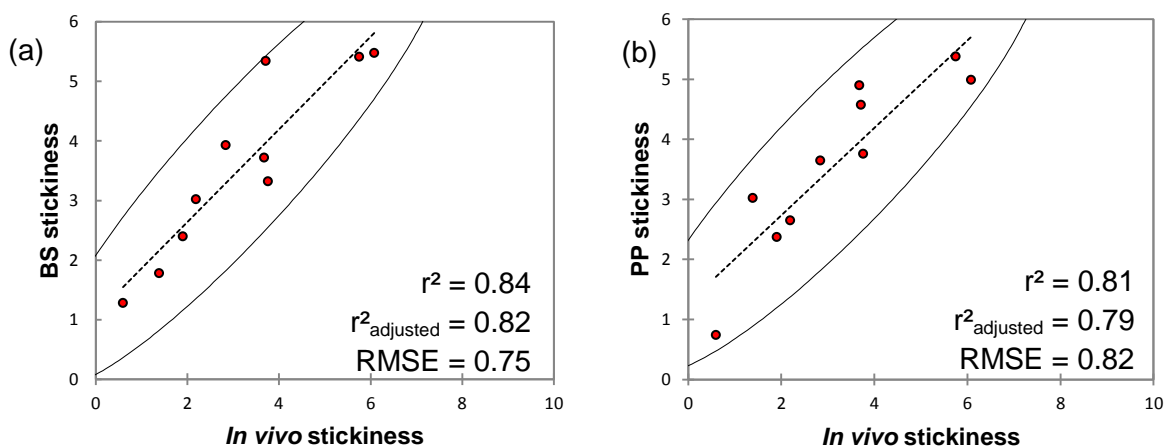


Fig 3: Linear correlation between *in vivo* data and scores obtained on (a) BS, (b) PP

Equation obtained for the correlation between *in vivo* skin data and BS data is (fig 3 (a)):

$$BS \text{ sensory stickiness} = 0.78 \times IV \text{ sensory stickiness} + 1.08$$

Both r^2 and r^2_{adjusted} being higher than 0.80, results clearly indicate that data are well correlated. This means that assessors' perception of stickiness on BS is very similar to the *in vivo* skin one.

Equation obtained for the correlation between *in vivo* skin data and PP data is:

$$PP \text{ sensory stickiness} = 0.73 \times IV \text{ sensory stickiness} + 1.27$$

Determination coefficients are lower than the ones obtained with BS data. Indeed, r^2_{adjusted} is lower than 0.80 meaning that correlation is not sufficient. In addition, RMSE is higher using PP data comparing to BS data meaning that scores variability is higher on PP.

According to those results, evaluation performed on BS seems to be closer to *in vivo* skin evaluation than PP evaluation. This can be due to a difference in terms of product penetration, making the residual film different on PP compared to residue on BS and *in vivo* skin. In addition, BS is visually and tactilely closer to *in vivo* skin than PP, which can influence assessors in terms of sensory perception, especially regarding their mechanical properties.

Moreover, PP presents some differences in terms of sensory properties on bare surface. So, aiming to choose the most suitable surface to predict residual stickiness, BS seems better adapted and able to reproduce *in vivo* sensory perception. Consequently, for the rest of the study, instrumental protocols were tested on BS.

3. Prediction of film stickiness using non-biological skin model: 100% instrumental measurement

3.1. Instrumental evaluation of stickiness after application on *in vivo* skin: protocol validation

In order to measure the physical stimulus responsible for sensory perception of stickiness, an instrumental protocol using a texture analyzer was developed in the present work. This apparatus has already been used to evaluate stickiness or tackiness in food and bioengineering researches [27,28]. The developed protocol is based on peel off force measurement, i.e. the force needed to unstick two surfaces. Two instrumental data can be plotted: the maximal measured force or the area under curve (AUC), corresponding to the work of adhesion also called "adhesiveness" [1,27] that was chosen for this study. The choice of a spherical stainless steel probe for testing is based on two reasons. First, as explained by Hosney and Smewing [28], stainless steel own a high surface free energy when compared to polymeric surfaces or skin. Consequently, adhesion between skin and steel is higher comparing to adhesion between skin and a polymeric surface such as Delrin®, frequently used in texture analysis [8,32,33]. Adhesion intensity of cosmetics products being

generally low, it is preferable to use probe material which increases adhesion to better discriminate tested products.

Then, a spherical probe has higher contact surface with skin compared to a cylindrical probe with same diameter. Increasing surface contact also enhances adhesion between the skin and the probe, thus improving adhesiveness values. In addition, as measurements were performed on *in vivo* skin, it was important to use a non-wounding probe. The spherical shape is smoother so more adapted for *in vivo* skin measurements [34].

AUC measurements have been performed on the *in vivo* skin after the application of the 10 products and on the bare skin of human volunteers. We assumed that sensory evaluation of stickiness on bare skin was scored at 0 for correlation [35].

Linear correlation between sensory data (*S*) and instrumentally measured (*I*) AUC under the form $S = a \times I + b$ did not allow to obtain a determination coefficient higher than 0.80. Nonetheless relations between physical stimulus and sensory perception are not necessarily linear: they can also be logarithmic or semi-logarithmic [36,37]:

$$S = a \times \log(I) + b \text{ or } S = a \times (I)^n + b$$

Consequently, instrumental data were logarithmically transformed and values obtained are reported on table 1.

Linear correlation obtained with sensory data is presented on fig 4.

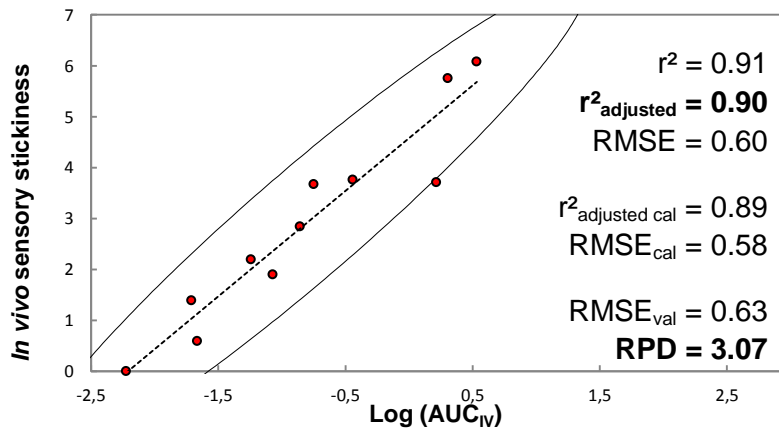


Fig 4: Predictive model of *in vivo* sensory stickiness using texture analyzer data and validation parameters.

The built predictive model equation is the following:

$$IV \text{ sensory stickiness} = 2.07 \times \log(AUC_{IV}) + 4.58$$

The above equation owns a r^2_{adjusted} higher than 0.90 meaning that correlation between data is very good. Then, the 4 steps cross-validation leads to very good results: $r^2_{\text{adjusted cal}} = 0.89$

and RPD = 3.07, thus highlighting a reliable predictive model. In addition, ANOVA performed on logarithmically transformed data shows that products are very well discriminated using this instrumental protocol ($p < 0.0001$). The Tukey multiple comparison test built 6 groups of products, confirming the high discriminative ability of the instrumental protocol.

Thus, the above results demonstrate that the protocol developed is able to measure the adhesiveness responsible for the perception of stickiness after application of cosmetic products, even with very different galenics and applications. Those results validate the protocol using a texture analyzer to evaluate the stickiness after application on skin.

3.2. Prediction of residual film stickiness on BS using texture analysis

The final aim of this study was to predict *in vivo* sensory perception of products stickiness after application without any intervention of a panel of assessors. Indeed, panel formation and training is very expensive and time consuming. In addition, the safety of product has to be carefully checked, which can be an important limitation when working on the development of new compounds or formulations. Previous results have shown that we used a pertinent protocol to evaluate cosmetic products residual stickiness, as illustrated by the good product discrimination by assessors. Then, this evaluation protocol can be transferred to a non-biological skin surface on which sensory perception is well correlated with *in vivo* skin sensory perception. The most performing surface was BS according to the linear correlations previously studied. In parallel, an instrumental protocol has been developed and validated to evaluate the stickiness after application and the obtained model appeared highly predictive. The final stage of this study was to adapt this *in vivo* protocol on the non-biological surface BS. To this end an optimization of the operating and application parameters has been performed (table 2) by varying waiting time after application, post-test speed and contact condition (penetration distance or target force). Linear correlations established between *in vivo* skin sensory data and logarithmically transformed instrumental data are shown on fig 5.

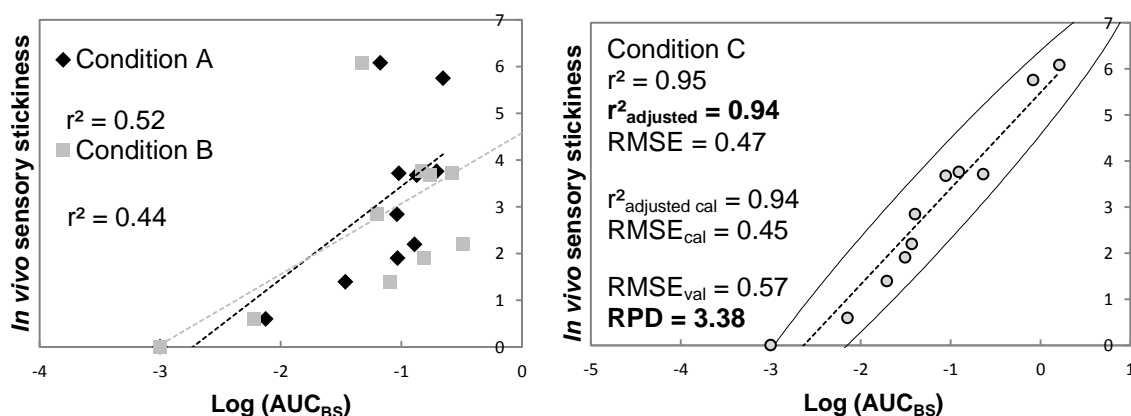


Fig 5: Optimization of measurements parameters and definition of predictive model for condition C

Conditions A and B (unstick speed of 0.8 mm/s, Table 2) showed very low correlations with *in vivo* skin sensory data, whereas condition C (unstick speed of 0.4 mm/s, Table 2) had a very good correlation with a r^2_{adjusted} higher than 0.90. Thus, the reduction of unstick speed and the use of high target force allowed increasing surface contact and contact time, improving physical stimuli measurements. Changes in those parameters compared to *in vivo* skin are due to the different mechanical properties of the two surfaces: *in vivo* underlying tissues made it possible to set a penetration distance at 10 mm whereas BS surface is too thin and too hard. Then, the choice of fixing a target force is more adapted and assures a good contact between BS and the probe.

Validation has been performed only for condition C because correlations were too low with conditions A and B. RPD value calculated of 3.38 is high, even higher than RPD calculated for *in vivo* skin measurements. The predictive model equation is presented below:

$$IV \text{ sensory stickiness} = 2.08 \times \log(AUC_{BS}) + 5.48$$

ANOVA analysis performed on the logarithmically transformed instrumental data also showed a good discrimination between products ($p < 0.0001$). The Tukey multiple comparison test formed 7 products groups confirming the good discrimination of the model.

These last results clearly prove that it is possible to predict *in vivo* sensory perception of stickiness after application, using an instrumental protocol of texture analysis and a non-biological skin model. This surface reproduces *in vivo* skin perception with a good correlation, which can then be reliably measured by indentation test.

Conclusion

First part of this study dealt with the sensory analysis of *Stickiness* after application performed on *in vivo* skin and on non-biological skin models. Results showed that it was possible to perceive the same after-feel on both types of surface. Whatever, the Bioskin® behavior was closer to *in vivo* skin ($r^2_{\text{adjusted}} = 0.82$) than Polypropylene ($r^2_{\text{adjusted}} = 0.79$). Differences between artificial surfaces probably resided in different penetration rate of formulas thus inducing modification in residual film: we assumed that some products penetrate into the BS whereas they remain at the surface of PP.

The second part on the study dealt with the development of an instrumental protocol in order to measure the physical stimulus responsible for residual film stickiness. Predictive model built on *in vivo* skin measurements showed very good predictive ability ($r^2_{\text{adjusted}} = 0.90$; RDP = 3.07).

Finally, the adaptation of this protocol on Bioskin® gave unexpected results, allowing the development a very good predictive and discriminative model ($r^2_{\text{adjusted}} = 0.94$; RDP = 3.38). It

made possible to evaluate stickiness after application without the use of expert assessors which can drastically reduce the time and the cost of such an evaluation: the *in vivo* sensory study involved more than twenty persons during three months against only one operator during two hours for the instrumental study performed on BS. In addition, such a protocol can be used for screening steps or first evaluation step of new compounds or formulas because no *in vivo* skin application was needed. Finally, this model seemed no limited to a particular type of topical products as the model has been set up and validated using very different products (gels, emulsions, aqueous solutions or emollients) with different uses (skincare and haircare).

The use of non-biological skin model for sensory prediction can interestingly be extended to other sensory attributes such as greasiness or glossiness. It opens new ways to understand the interactions between skin and cosmetic products and their sensory consequences.

Acknowledgments

This study has been led within the framework of the URBASKIN project, selected as Project of Excellence by the General Directorate for Competitiveness Industry and Services (DGCIS) in the 20th Appeal FUI (Fonds Unique Interministériel). It has been financed by BPI France and by Normandie, Val de Loire and Ile-de-France regions and supported by the Cosmetic Valley. The authors sincerely thank contributors and financers for their support.

References

- [1] M. Pons, S. m. Fiszman, Instrumental Texture Profile Analysis with Particular Reference to Gelled Systems, *J. Texture Stud.* 27 (1996) 597–624. doi:10.1111/j.1745-4603.1996.tb00996.x.
- [2] A.S. Szczśniak, Correlation sensory with instrumental texture measurements - an overview of recent developments, *J. Texture Stud.* 18 (1987) 1–15. doi:doi/10.1111/j.1745-4603.1987.tb00566.x/.
- [3] L. Gilbert, C. Picard, G. Savary, M. Grisel, Impact of Polymers on Texture Properties of Cosmetic Emulsions: A Methodological Approach, *J. Sens. Stud.* 27 (2012) 392–402. doi:10.1111/joss.12001.
- [4] N.O. Schwartz, Adaptation of the Sensory Texture Profile Method to Skin Care Products, *J. Texture Stud.* 6 (1975) 33–42. doi:10.1111/j.1745-4603.1975.tb01116.x.
- [5] A.M. Muñoz, G.V. Civille, The Spectrum Descriptive Analysis Method, *Man. Descr. Anal. Test. Sens. Eval.* (1992). doi:10.1520/MNL10524M.
- [6] G.V. Civille, C.A. Dus, Evaluating tactile properties of skincare products: a descriptive analysis technique, *Cosmet. Toilet.* 106 (1991).
- [7] G. Savary, M. Grisel, C. Picard, Impact of emollients on the spreading properties of cosmetic products: A combined sensory and instrumental characterization, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 102 (2013) 371–378. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.07.028.
- [8] L. Gilbert, G. Savary, M. Grisel, C. Picard, Predicting sensory texture properties of cosmetic emulsions by physical measurements, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 124 (2013) 21–31. doi:10.1016/j.chemolab.2013.03.002.

- [9] M.E. Parente, A. Gambaro, G. Solana, Study of sensory properties of emollients used in cosmetics and their correlation with physicochemical properties, *J. Cosmet. Sci.* 56 (2005) 175–182.
- [10] E. Mehinagic, G. Royer, R. Symoneaux, D. Bertrand, F. Jourjon, Prediction of the sensory quality of apples by physical measurements, *Postharvest Biol. Technol.* 34 (2004) 257–269. doi:10.1016/j.postharvbio.2004.05.017.
- [11] A.K. Thybo, P.M. Szczypiński, A.H. Karlsson, S. Dønstrup, H.S. Stødkilde-Jørgensen, H.J. Andersen, Prediction of sensory texture quality attributes of cooked potatoes by NMR-imaging (MRI) of raw potatoes in combination with different image analysis methods, *J. Food Eng.* 61 (2004) 91–100. doi:10.1016/S0260-8774(03)00190-0.
- [12] K. Suzuki, T. Watanabe, Relationship Between Sensory Assessment and Rheological Properties of Cosmetic Creams*, *J. Texture Stud.* 2 (1971) 431–440. doi:10.1111/j.1745-4603.1971.tb00591.x.
- [13] L. Gilbert, V. Loisel, G. Savary, M. Grisel, C. Picard, Stretching properties of xanthan, carob, modified guar and celluloses in cosmetic emulsions, *Carbohydr. Polym.* 93 (2013) 644–650. doi:10.1016/j.carbpol.2012.12.028.
- [14] S. Nacht, J.A. Close, D. Yeung, E.G. Gans, Skin friction coefficient: changes induced by skin hydration and emollient application and correlation with perceived skin feel, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 32 (1980) 55–65.
- [15] M. Lodén, H. Olsson, L. Skare, T. Axéll, Instrumental and sensory evaluation of the frictional response of the skin following a single application of five moisturizing creams, *J. Soc. Cosmet. Chem.* 43 (1992) 13–20.
- [16] R.K. Sivamani, J. Goodman, N.V. Gitis, H.I. Maibach, Coefficient of friction: tribological studies in man – an overview, *Skin Res. Technol.* 9 (2003) 227–234. doi:10.1034/j.1600-0846.2003.02366.x.
- [17] M. Douguet, C. Picard, G. Savary, F. Merlaud, N. Loubat-bouleuc, M. Grisel, Spreading properties of cosmetic emollients: Use of synthetic skin surface to elucidate structural effect, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 154 (2017) 307–314. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.03.028.
- [18] D.J. Cottenden, A.M. Cottenden, A study of friction mechanisms between a surrogate skin (Lorica soft) and nonwoven fabrics, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 28 (2013) 410–426. doi:10.1016/j.jmbbm.2013.04.024.
- [19] J. Jachowicz, R. McMullen, D. Prettypaul, Indentometric analysis of in vivo skin and comparison with artificial skin models, *Skin Res. Technol.* 13 (2007) 299–309. doi:10.1111/j.1600-0846.2007.00229.x.
- [20] S. Chen, B. Bhushan, Nanomechanical and nanotribological characterization of two synthetic skins with and without skin cream treatment using atomic force microscopy, *J. Colloid Interface Sci.* 398 (2013) 247–254. doi:10.1016/j.jcis.2013.02.026.
- [21] Y. Nonomura, T. Fujii, Y. Arashi, T. Miura, T. Maeno, K. Tashiro, Y. Kamikawa, R. Monchi, Tactile impression and friction of water on human skin, *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 69 (2009) 264–267. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.11.024.
- [22] F. Giron, F. Ghiglione, F. Flament, Device for evaluating a product on application, 2016.
- [23] N. Ikeda, K. Miyashita, R. Hikima, S. Tominaga, Reflection measurement and visual evaluation of the luminosity of skin coated with powder foundation, *Color Res. Appl.* 39 (2014) 45–55. doi:10.1002/col.21753.
- [24] N. Sato, A. Murata, T. Fujie, S. Takeoka, Stretchable, adhesive and ultra-conformable elastomer thin films, *Soft Matter.* 12 (2016) 9202–9209. doi:10.1039/C6SM01242F.

- [25] A. Mavon, D. Redoules, P. Humbert, P. Agache, Y. Gall, Changes in sebum levels and skin surface free energy components following skin surface washing, *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 10 (1998) 243–250. doi:10.1016/S0927-7765(98)00007-1.
- [26] D.K. Owens, R.C. Wendt, Estimation of the surface free energy of polymers, *J. Appl. Polym. Sci.* 13 (1969) 1741–1747. doi:10.1002/app.1969.070130815.
- [27] N. Thirawong, J. Nunthanid, S. Puttipipatkachorn, P. Sriamornsak, Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An in vitro evaluation using texture analyzer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 (2007) 132–140. doi:10.1016/j.ejpb.2007.01.010.
- [28] R.C. Hosney, J. Smewing, Instrumental Measurement of Stickiness of Doughs and Other Foods, *J. Texture Stud.* 30 (1999) 123–136. doi:10.1111/j.1745-4603.1999.tb00206.x.
- [29] D. Cozzolino, M.B. Esler, R.G. Damberg, W.U. Cynkar, D.R. Boehm, I.L. Francis, M. Gishen, Prediction of Colour and pH in Grapes Using a Diode Array Spectrophotometer (400–1100 nm), *J. Infrared Spectrosc.* 12 (2004) 105–111.
- [30] I.M. François, H. Wins, S. Buysens, C. Godts, E. Van Pee, B. Nicolai, M. De Proft, Predicting sensory attributes of different chicory hybrids using physico-chemical measurements and visible/near infrared spectroscopy, *Postharvest Biol. Technol.* 49 (2008) 366–373. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.02.011.
- [31] M.E. Parente, A. Gámbaro, G. Ares, Sensory Characterization of Emollients, *J. Sens. Stud.* 23 (2008) 149–161. doi:10.1111/j.1745-459X.2007.00136.x.
- [32] H. Liu, X.M. Xu, S.D. Guo, Comparison of full-fat and low-fat cheese analogues with or without pectin gel through microstructure, texture, rheology, thermal and sensory analysis, *Int. J. Food Sci. Technol.* 43 (2008) 1581–1592. doi:10.1111/j.1365-2621.2007.01616.x.
- [33] M. Jamshidian, G. Savary, M. Grisel, C. Picard, Stretching properties of xanthan and hydroxypropyl guar in aqueous solutions and in cosmetic emulsions, *Carbohydr. Polym.* 112 (2014) 334–341. doi:10.1016/j.carbpol.2014.05.094.
- [34] C. Pailler-Mattéi, H. Zahouani, Analysis of adhesive behaviour of human skin in vivo by an indentation test, *Tribol. Int.* 39 (2006) 12–21. doi:10.1016/j.triboint.2004.11.003.
- [35] P. Dubuisson, C. Picard, M. Grisel, G. Savary, How does composition influence the texture of cosmetic emulsions?, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 536 (2018) 38–46. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.08.001.
- [36] S.S. Stevens, On the psychophysical law., *Psychol. Rev.* 64 (1957) 153–181. doi:10.1037/h0046162.
- [37] G. Fechner, *Elements of psychophysics*. Vol. I., New York, Holt, Rinehart and Winston, 1966.

II.3. Lien entre propriétés instrumentales et sensorielles du film résiduel

A l'issue des études présentées précédemment, nous avons pu réaliser une caractérisation du film résiduel de divers produits cosmétiques selon plusieurs propriétés :

- Physico-chimie de surface
- Composition chimique de surface
- Propriété sensorielle tactile du « collant »

Plusieurs surfaces ont été utilisées et comparées pour caractériser ce film résiduel : la peau *in vivo* et des surfaces modèles : notamment la BS et la SFS. Il ressort de l'étude comparative entre les modèles non-biologiques et la peau *in vivo* que selon le type de propriété étudiée, l'une ou l'autre des surfaces est à favoriser. En effet, les mesures de physico-chimie réalisées *in vivo* et sur SFS sont très bien corrélées ($r^2 = 0,92$) tandis que la BS est moins performante ($r^2 = 0,69$). En revanche, la BS permet de mieux étudier la composition chimique du film résiduel car la SFS présente des bandes d'absorption intenses en infrarouge qui masquent l'effet des produits. De plus, la BS est beaucoup plus proche de la peau *in vivo* d'un point de vue sensoriel et est plus adaptée pour étudier les propriétés tactiles du film résiduel.

Il est ainsi possible, en utilisant ces deux surfaces, de modéliser la surface de la peau humaine et d'étudier l'impact des produits cosmétiques sur ses propriétés de surface. L'utilisation de ce type de modèle permet de réaliser des études beaucoup plus simples d'un point de vue logistique, sensiblement moins coûteuses car elles ne nécessitent pas de mettre en place un panel de volontaires. Enfin, cela permet d'obtenir des résultats beaucoup plus répétables et moins dépendants de l'état de la peau *in vivo*.

Ceci ouvre donc des perspectives très intéressantes, notamment pour mieux comprendre l'origine de certaines propriétés sensorielles en utilisant les caractérisations instrumentales du film résiduel formé à la surface de la peau. Pour illustrer ces propos, nous avons étudié les liens pouvant exister entre la perception sensorielle du collant et les propriétés instrumentales mesurées sur modèles non-biologiques.

Nous avons, tout d'abord, cherché à vérifier si la perception sensorielle du collant du film résiduel pouvait être expliquée par sa physico-chimie. La corrélation entre le collant résiduel évalué sur SFS et la mouillabilité du film résiduel est présentée ci-dessous (Figure 53), incluant les 10 produits évalués sensoriellement et la surface nue (dont la note sensorielle a été fixée à 0). Le r^2 et le $r^2_{\text{ajusté}}$ obtenus sont supérieurs à 0,80 ce qui signifie que les données

sont bien corrélées. Ainsi, la perception de collant semblerait plus intense pour des films résiduels plus hydrophiles.

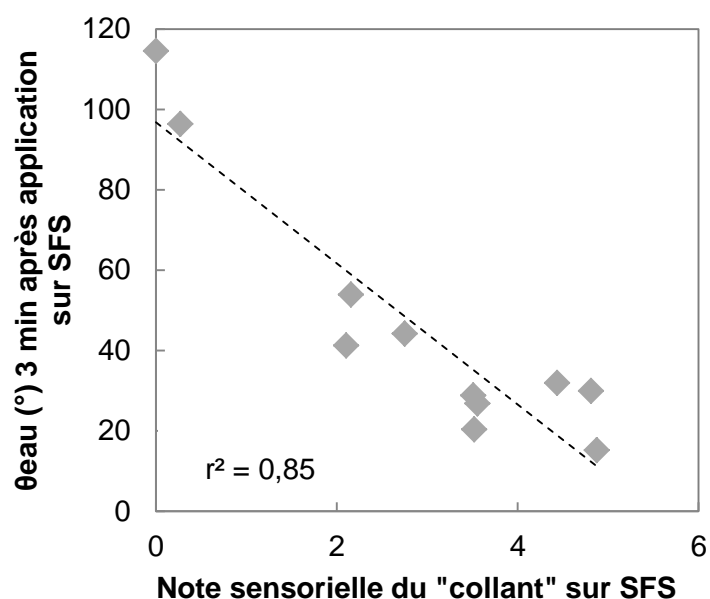


Figure 53. Corrélation entre la perception sensorielle de collant sur SFS et θ_{eau} mesuré après application de produit

Des mesures complémentaires ont été réalisées sur SFS dans le but d'améliorer la corrélation établie précédemment entre la note sensorielle de collant et la mesure de θ_{eau} après application du produit. Les propriétés de friction des films résiduels ont été mesurées, 3 min après application de produit, grâce à un Frictionmètre® (Monaderm, Monaco, France), piloté par le logiciel CK_MultiProbe. Cette sonde rotative permet d'évaluer la friction (en unité arbitraire, notée F) entre une surface et un disque de Teflon® appliqué sur cette surface, tournant à une vitesse constante de 90 rpm (Figure 54). La résistance à la rotation du disque sur la surface est mesurée et permet de déterminer ce paramètre de friction. Une valeur est relevée toutes les secondes pendant 60 secondes, chaque mesure étant répétée trois fois. Le paramètre de friction F obtenu est donc la moyenne des 180 valeurs mesurées.

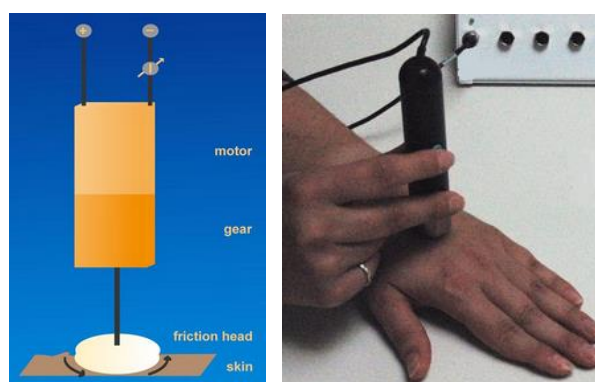


Figure 54. Schéma du Frictionmètre® et exemple de mesure in vivo (extrait de <https://www.courage-khazaka.de>)

La corrélation linéaire multiple obtenue entre le collant sensoriel et ces deux grandeurs instrumentales (θ_{eau} et F) mesurées sur SFS est présentée ci-dessous (Figure 55).

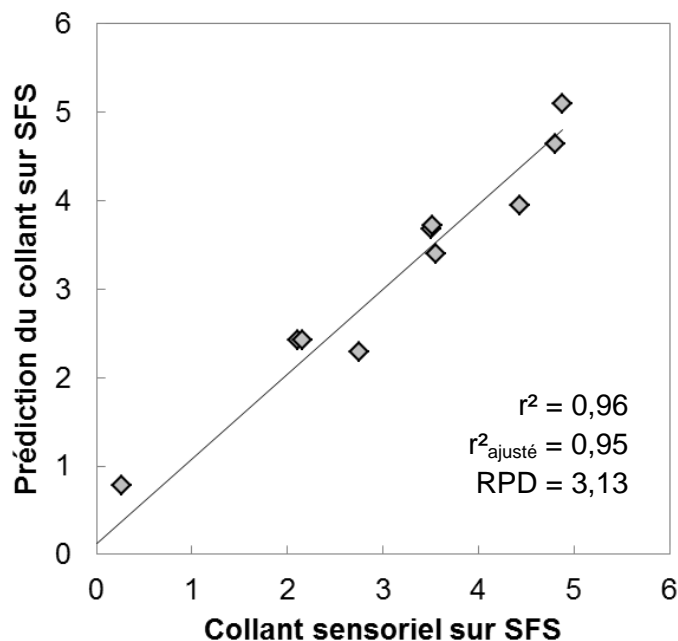


Figure 55. Explication du phénomène de collant sensoriel par les propriétés instrumentales du film résiduel

D'après ces résultats, la prise en compte d'un paramètre de friction des films résiduels apporte une meilleure explication au phénomène de collant sensoriel. Les r^2 et $r^2_{\text{ajusté}}$ obtenus pour cette corrélation multiple sont excellents ($>0,90$) et le RPD est supérieur à 3, ce qui confirme la validité de cette corrélation.

L'équation de la corrélation obtenue est la suivante :

$$\text{Collant sensoriel}_{SFS} = 4,46 - 6,7 \cdot 10^{-2} \times \theta_{\text{eau}_{SFS}} + 6,48 \cdot 10^{-3} \times F_{SFS}$$

Ainsi, plus l'hydrophilie du film résiduel sera grande et plus la friction sera élevée, plus la perception sensorielle de collant sera intense. Cette équation a du sens : plus le film est hydrophile, plus il a tendance à être riche en eau. L'eau présente dans le film résiduel étant susceptible d'induire la formation de force capillaires, elle provoque une sensation de collant au contact de la main du panéliste (Pailler-Mattei et al. 2009). De plus, la friction, et donc le paramètre de friction calculé grâce au Frictionomètre®, augmente fortement avec le caractère adhésif des surfaces, notamment dans le cas de la peau, comme cela a été démontré par Pailler-Mattei et al. (Pailler-Mattei et al. 2009).

La même corrélation multiple utilisant des données obtenues cette fois-ci *in vivo*, en utilisant d'autres produits cosmétiques, présente un très bon coefficient de détermination $r^2 = 0,85$ et $r^2_{\text{ajusté}} = 0,80$ ce qui valide les phénomènes observés sur SFS.

Ces résultats démontrent donc tout l'intérêt d'étudier les propriétés des films résiduels afin de mieux comprendre certains phénomènes comme les perceptions sensorielles des films laissés après application. De nombreuses perspectives sont envisageables : d'autres propriétés sensorielles pourraient être investiguées, comme le gras résiduel ou le brillant, afin d'évaluer quelle(s) propriété(s) instrumentale(s) est (sont) responsable(s) de ces perceptions. De plus, une meilleure compréhension de l'influence de la composition de l'émulsion sur ces propriétés résiduelles permettrait de développer des produits cosmétiques aux propriétés sensorielles et instrumentales contrôlées.

III. Lien entre les propriétés du film résiduel et l'adhésion de particules

L'objectif final de cette étude des propriétés résiduelles des produits cosmétiques était de réussir à définir des pistes de compréhension des phénomènes impliqués dans l'adhésion de particules polluantes, telles que les particules de matières. Ainsi, un protocole d'étude des propriétés anti-adhésion de particules a été mis au point en utilisant les surfaces non-biologiques. Ce protocole, présenté dans la partie 2 de ce manuscrit, utilise deux types de particules modèles différentes : des pigments Unipure Black LC 989 EM, notés 1, et des pigments W9814 Covasil 305, notés 2. Pour rappel, ces particules modèles devaient posséder une granulométrie similaire aux particules de Diesel, principales particules polluantes retrouvées dans l'atmosphère ; elles devaient également posséder une physico-chimie variée et être compatibles avec une application cutanée.

Le diamètre médian des pigments 1 est de 4,7 μm , celui des pigments 2 est de 3,6 μm tandis que celui des particules de Diesel varie entre 22,6 μm (sans passage aux ultrasons), 2,1 μm (après 1h aux ultrasons) et 0,4 μm (après 24h aux ultrasons). Ces deux pigments modèles possèdent donc un diamètre médian du même ordre de grandeur que celui des particules de Diesel désagrégées par 1h de traitement aux ultrasons.

Les deux particules modèles possèdent également une physico-chimie distincte : les pigments 1 sont des particules plutôt hydrophiles ($\theta_{\text{eau}} = 49.8 \pm 5.1^\circ$) tandis que les pigments 2 sont des particules plutôt hydrophobes ($\theta_{\text{eau}} = 109,1 \pm 5.7^\circ$). Leurs paramètres d'énergie libre de surface sont rappelés dans le tableau ci-dessous (Tableau 13).

Tableau 13. Paramètres d'énergie libre des deux particules modèles

Particules	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^{AB} (mJ/m ²)	$\gamma^{\text{AB}} / \gamma^{\text{LW}}$	γ_s (mJ/m ²)
Pigments 1	29,4	32,5	1,3	13,0	44%	42,5
Pigments 2	20,3	8,4	4,9	12,8	63%	33,2

Nous verrons si ces différences de propriétés peuvent influencer leur adhésion sur les surfaces modèles.

Enfin, étant des pigments de grade cosmétique, les deux particules peuvent être utilisées *in vivo* sans risque pour les panélistes.

III.1. Adhésion de particules après application de produits cosmétiques

Influence du type de pigments sur l'adhésion des particules (étude sur SFS)

La SFS a été exposée 3 min après l'application de produits aux deux types de pigments 1 et 2 suivant le protocole décrit dans la partie 2. Le calcul du %AP (pourcentage de particules adhérentes sur la surface) a été réalisé par analyse d'images microscopiques. Un exemple d'images obtenues pour différents produits est présenté ci-dessous (Figure 56). Les résultats complets obtenus sont présentés sur le graphique ci-dessous (Figure 57).

D'après ces deux figures, il apparaît clairement que les films résiduels des produits appliqués adhèrent plus ou moins avec les particules modèles : l'effet produit est significatif pour les deux pigments ($p < 0,0001$). On constate également que tous les produits ont tendance à augmenter l'adhésion des pigments par rapport à la peau nue (notée PN). Cela signifie donc que les modifications des propriétés chimiques et physico-chimiques induites par l'application de produits tendent à augmenter le phénomène d'adhésion 3 min après application. Il reste maintenant à déterminer pour quelle(s) raison(s) les films résiduels retiennent davantage les particules modèles comparés à la peau nue.

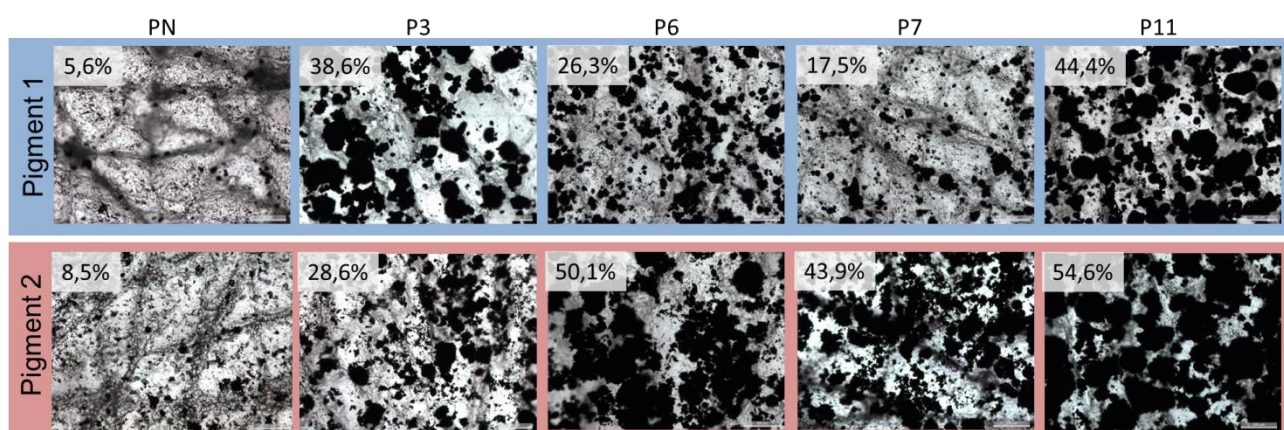


Figure 56. Exemple d'images microscopiques obtenues 3 min après application de différents produits et exposition aux pigments 1 et 2. (PN : Peau Nue)

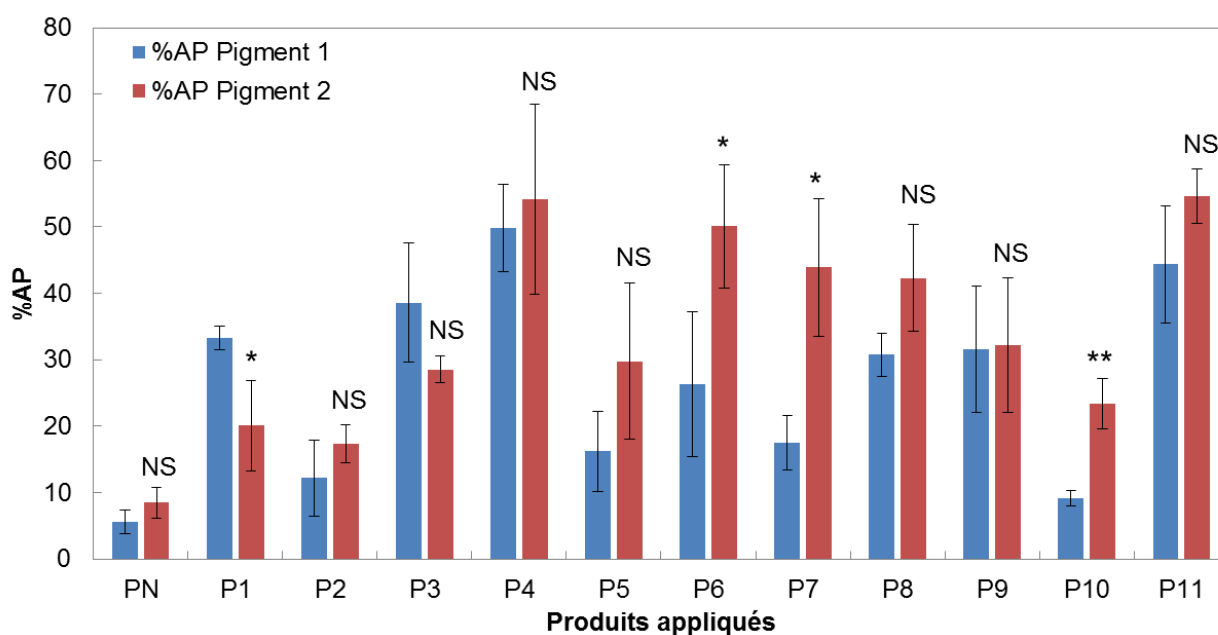


Figure 57. %AP 3 min après application de 11 produits et sur peau nue (PN) pour les deux pigments 1 et 2, calculé sur SFS

D'après ces résultats (Figure 57), on ne retrouve pas les groupes de produits définis précédemment, dont la physico-chimie du film résiduel est similaire (Figure 48). Pour les produits P2, P3 et P5 possédant des composantes γ^+ et γ^{AB} élevées, l'adhésion des pigments 1 est la suivante : $\%AP_{P2} = 12,2 \pm 5,8$; $\%AP_{P3} = 38,6 \pm 9,0$; $\%AP_{P5} = 16,2 \pm 6,0$. Ainsi, le film résiduel laissé par le produit P3 adhère plus les particules 1 que les deux autres films résiduels, malgré des composantes d'énergie libre sensiblement identiques. Les films résiduels des produits P1 et P4 ayant une composante basique très élevée adhèrent beaucoup les pigments 1 ($\%AP_{P1} = 33,3 \pm 1,8$ et $\%AP_{P4} = 49,9 \pm 6,6$), tout comme le produit P11 ($\%AP_{P11} = 44,4 \pm 8,8$) ayant une composante basique faible. Il semblerait donc que l'adhésion des pigments 1 ne soit pas liée aux valeurs de γ^- , γ^+ ou de γ^{AB} . Cette observation est illustrée par l'ACP présentée ci-dessous (Figure 58). Celle-ci présente, comme sur la Figure 48, les 5 variables physico-chimiques (énergie libre de surface et ses composantes, en rouge) représentant les 11 produits étudiés. Sont ajoutés à ces 5 variables les %AP calculés pour les pigments 1 et les pigments 2 (en bleu). On constate sur cette Figure 58 que les deux variables supplémentaires de %AP sont mal représentées dans ce système d'axes F1 et F2, contrairement aux variables physico-chimiques : celles-ci ne sont pas situées sur le cercle de corrélation. De plus, les angles formés avec les variables physico-chimiques n'indiquent pas de corrélation, confirmant l'observation précédente. D'autres pistes d'explication seront donc explorées dans les parties III.2. et III.3.

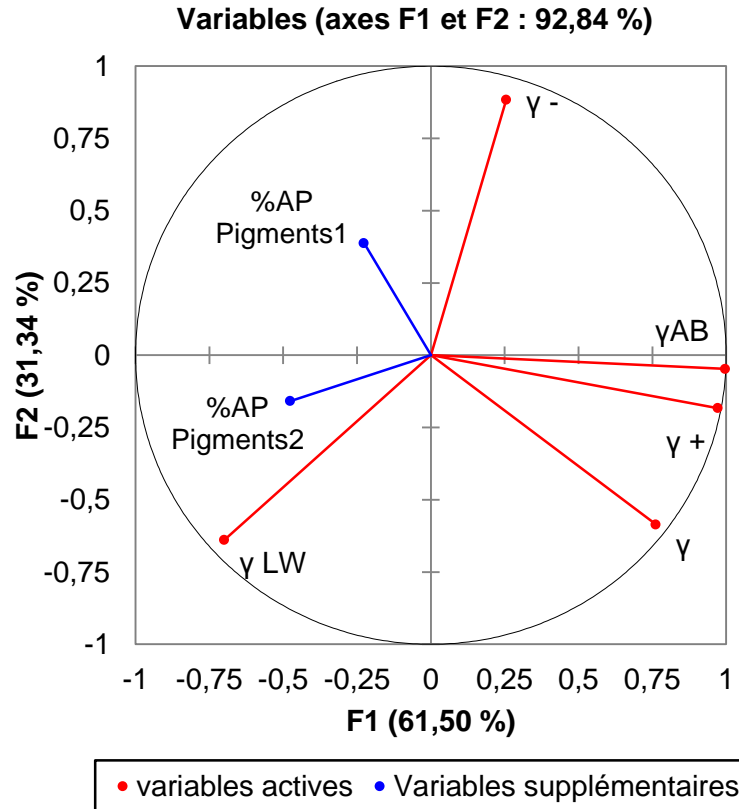


Figure 58. Représentation des %AP pigments 1 et %AP pigments 2 (en bleu) sur l'ACP des 5 variables physico-chimiques caractérisant les films résiduels des 11 produits cosmétiques (en rouge)

Ensuite, on constate que la différence entre les pigments est significative ($p < 0,05$). Ces différences significatives entre les pigments pour chaque produit sont indiquées sur la Figure 57. Les films résiduels adhérant significativement plus les pigments 2 que les pigments 1 sont ceux des produits P6, P7 et P10, tous trois possédant une composante apolaire élevée (Figure 48). Ceux-ci semblent donc avoir plus d'affinités pour les pigments 2 que les pigments 1. On observe la même tendance pour les produits P8 et P11, dont les films résiduels ont également une composante apolaire élevée, bien que l'augmentation de l'adhésion des particules 2 par rapport aux particules 1 ne soit pas significative. Le produit P1, de plus faible composante apolaire, adhère quant à lui significativement moins les pigments 2 que les pigments 1.

Ces différences d'adhésion entre les pigments sont assez surprenantes. En effet, la proportion des interactions apolaires est plus importante pour les pigments 1 que pour les pigments 2 (Tableau 13) : le ratio $\gamma^{AB} / \gamma^{LW}$ est de 0,44 pour les pigments 1 contre 0,63 pour les pigments 2. Nous aurions donc pu supposer que les films résiduels de forte composante apolaire interagissent plus avec les pigments 1. Or le phénomène inverse est observé.

Afin de donner des explications à ces différences d'adhésion, le travail d'adhésion entre les pigments et les surfaces a été calculé selon l'équation suivante :

$$W_{12} = 2\sqrt{\gamma_1^{LW}\gamma_2^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_1^+\gamma_2^-} + 2\sqrt{\gamma_1^-\gamma_2^+} \quad \text{où 1 se réfère à la surface et 2 aux pigments}$$

Les ratios entre les travaux d'adhésion W_{12} pigments 1 / W_{12} pigments 2 sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 59). Un ratio supérieur à 1 indique que le travail d'adhésion des pigments 1 sur une surface donnée est plus élevé que celui des pigments 2 : cette surface devrait donc adhérer plus fortement les pigments 1 que les pigments 2.

Par exemple, le travail d'adhésion des pigments 1 sur le film du produit P1 est plus élevé que le travail d'adhésion des pigments 2 sur le film du produit P1, expliquant une adhésion plus importante des pigments 1. En revanche, pour le produit P6, les travaux d'adhésion sont sensiblement les mêmes, alors que le film résiduel du P6 adhère beaucoup plus les pigments 2 que les pigments 1. Ce calcul du travail d'adhésion n'a donc pas permis de comprendre les différences observées entre les pigments. D'autres phénomènes devraient donc être pris en compte pour expliquer ces différences. Par exemple, la mesure de charges surfaciques pourrait aider à éclaircir ces résultats, ces charges pouvant induire des forces électrostatiques entre les surfaces et les pigments.

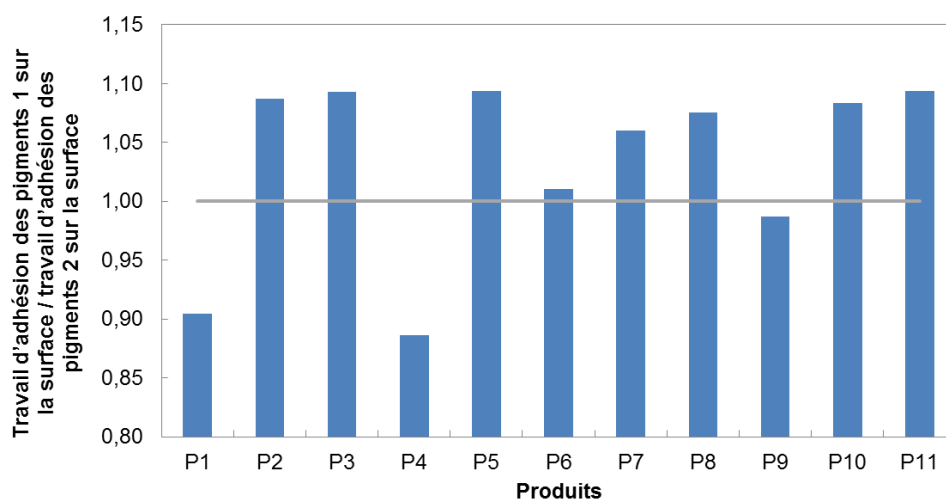


Figure 59. Représentation du ratio travail d'adhésion des pigments 1 sur les films résiduels / travail d'adhésion des pigments 2 sur les films résiduels

Influence du temps sur l'adhésion des particules (étude sur SFS)

L'adhésion des particules sur SFS a été examinée 3 min après application de produit et 1h après application, pour évaluer l'impact du temps sur le phénomène d'adhésion. Les résultats obtenus pour les pigments 1 et 2 sont présentés ci-dessous (Figure 60). L'effet du temps sur le %AP est statistiquement significatif ($p < 0,0001$ pour les pigments 1 et $p = 0,02$ pour les pigments 2). Globalement, l'adhésion des particules reste identique ou diminue dans le temps, avec le séchage des films résiduels. Ceci peut probablement s'expliquer par la diminution des forces capillaires une fois le film résiduel sec (1h après application), par

rapport à un film humide plus épais (3 min après application) (Pailler-Mattei et al. 2009). Une grande partie des produits continue tout de même à adhérer plus fortement les pigments que la peau nue. En effet, 1h après application, seuls quelques produits semblent améliorer la protection de la peau contre l'adhésion de pigments 1 : les produits P1, P4 et P9 (les %AP sont plus faible que ceux de la peau nue). Il est intéressant de noter que les films résiduels de ces trois produits possèdent les composantes basiques les plus élevées parmi les produits étudiés, mesurées 3 min après application. Cette composante pourrait être responsable d'interactions répulsives avec les pigments 1 de forte composante basique. La diminution de l'adhésion des particules 1 pourrait donc être reliée à cette composante, sur film sec, pour lequel les forces capillaires sont négligeables. Néanmoins, il serait nécessaire de réaliser des mesures d'énergie libre 1h après application pour s'assurer que cette composante basique n'évolue pas ou peu dans le temps.

Dans le cas des pigments 2, les films des produits P5 et P6 semblent proches de la peau nue, mais aucun produit ne diminue l'adhésion.

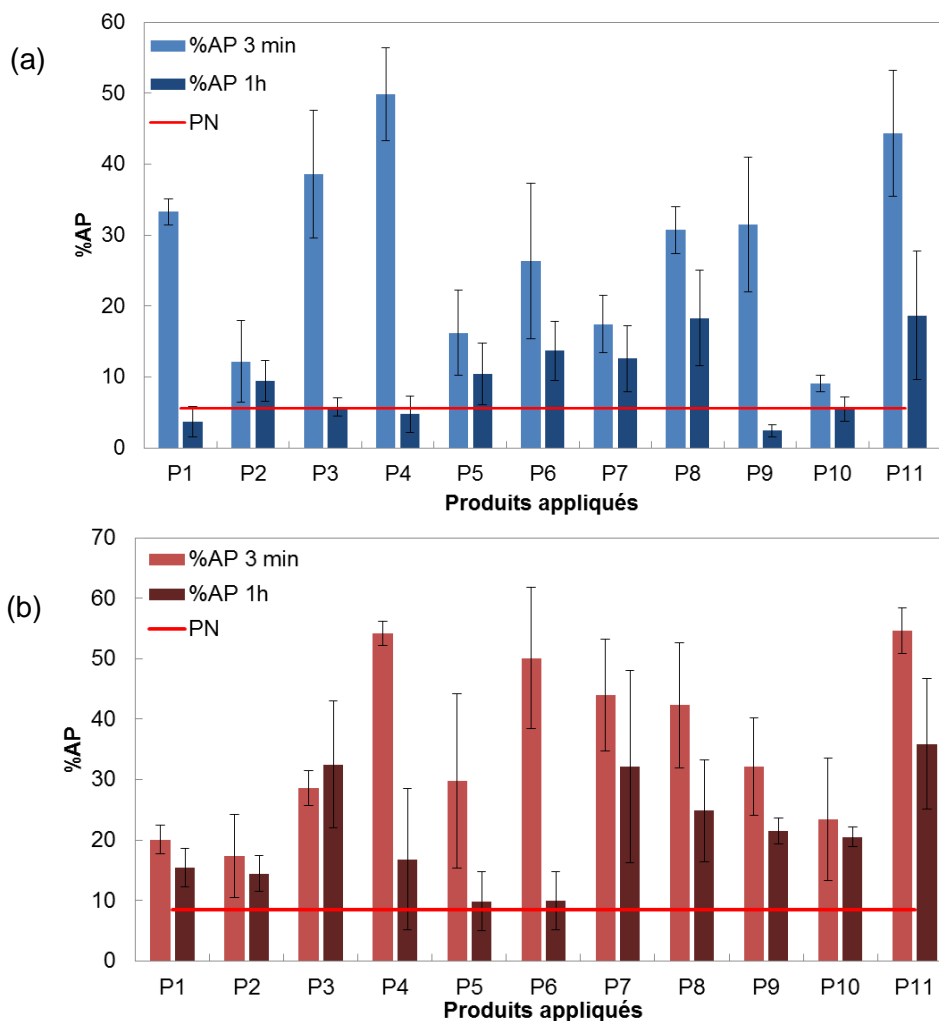


Figure 60. %AP 3 min et 1h après application de 11 produits (a) pour le pigment 1 (b) pour le pigment 2, calculé sur SFS

Influence de la surface sur l'adhésion des particules (comparaison entre SFS, BS et la peau *in vivo*)

Enfin, l'adhésion des pigments 1 a été comparée entre les trois surfaces SFS, BS et la peau *in vivo*, afin d'évaluer les possibles différences. Les images des surfaces exposées aux pigments hydrophiles 3 min après application de produits sont présentées ci-dessous (Figure 61). Une corrélation à proprement parler n'a pas été réalisée car les méthodes d'évaluation de l'adhésion des particules diffèrent selon les surfaces. Néanmoins, visuellement, on constate que la SFS est plus proche de la peau *in vivo* que la BS. Cette dernière a tendance à beaucoup plus adhérer les particules 1 que la peau *in vivo* après application de produits. Les similitudes entre les produits sont beaucoup plus marquées entre la SFS et la peau *in vivo* qu'entre la BS et la peau *in vivo* : le P1, P2, P9 et P10 adhèrent peu les pigments sur SFS et *in vivo*, alors que leur adhésion est plus importante sur la BS.

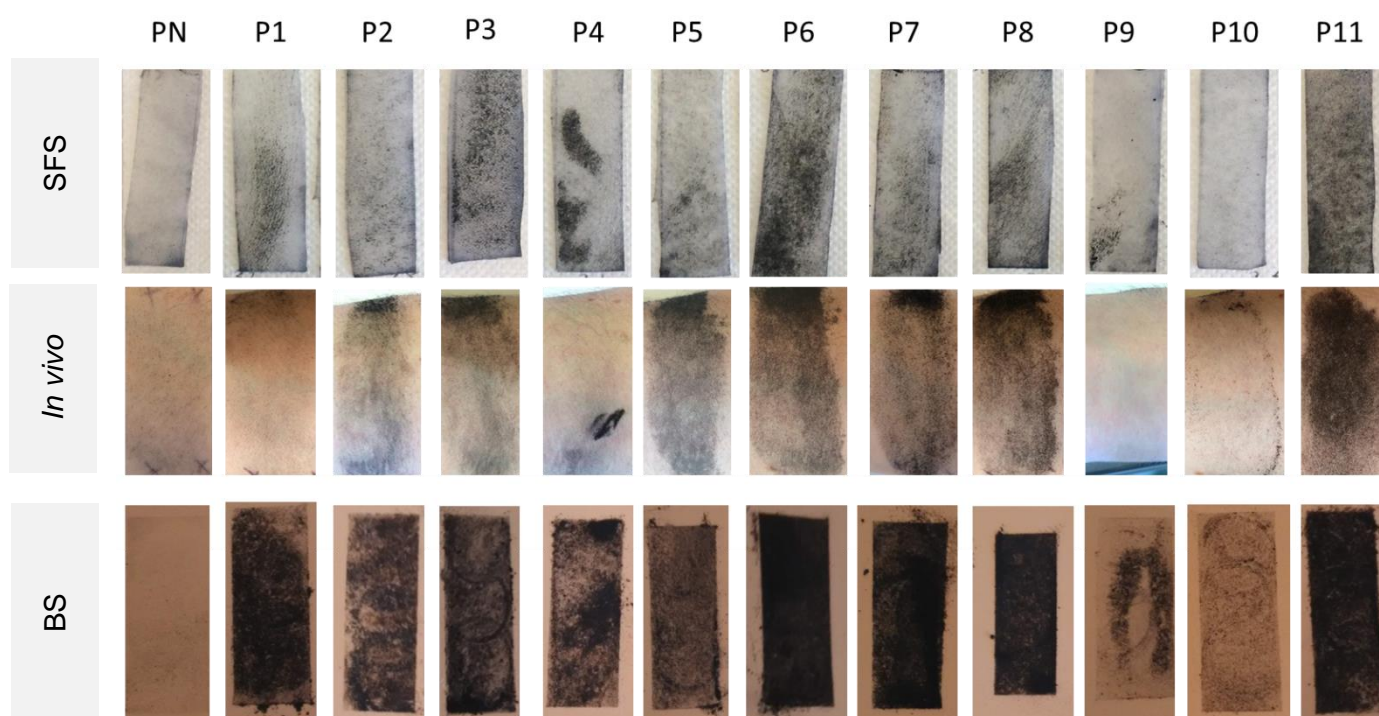


Figure 61. Comparaison des images des surfaces exposées aux pigments 1 par rapport à la peau *in vivo*

Une différence de topographie est susceptible d'expliquer, au moins en partie, cette différence dans l'adhésion des pigments. En effet, la topographie de la SFS et la peau *in vivo* de l'avant-bras est constituée de plateaux et de fin sillons. Celle de la BS est plutôt constituée de plateaux et de vallées, la surface représentée par les vallées étant plus importante que celle représentée par sillons cutanés. Ainsi, les pigments 1 ayant tendance à s'agglomérer dans les zones de bas-relief (sillons et vallées) comme visible sur les images

microscopiques présentées précédemment (Figure 56), la plus grande surface de vallées sur BS induira une plus grande surface d'agglomération pour les pigments, en comparaison aux sillons de la peau et de la SFS, comme illustré sur la figure ci-dessous (Figure 62). Ainsi, selon ce mécanisme, l'adhésion sur BS aura tendance à être plus importante que sur les deux autres surfaces.

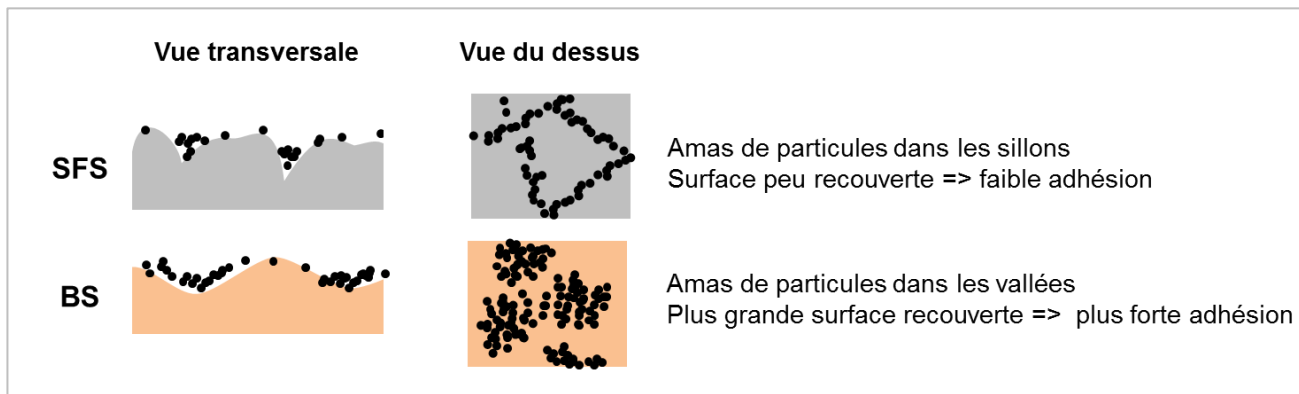


Figure 62. Possible influence du microrelief sur l'adhésion des particules

En conclusion par rapport à cette première approche de l'évaluation de l'adhésion des pigments, il apparaît que les propriétés anti-adhésion des films résiduels diffèrent selon le type de pigments choisi, selon la surface d'étude, et que ces propriétés évoluent dans le temps. De ce fait, un effet « anti-adhésion de particules » est très complexe à évaluer, car cette propriété est très dépendante du protocole d'évaluation, à la fois dans le choix des particules mais aussi dans le choix des surfaces d'étude. En effet, la surface commerciale BS étant loin de mimer l'adhésion des particules modèles sur la peau *in vivo*, la SFS développée dans notre laboratoire semblerait plus adaptée pour cette application.

Maintenant que nous avons réalisé une première analyse de l'adhésion des pigments modèles sur les surfaces, nous allons tenter d'expliquer de façon plus approfondie le phénomène d'adhésion, par rapport aux propriétés du film résiduel des produits. Les résultats présentés dans les paragraphes suivants offrent des pistes d'explication mais ouvrent également de nombreuses perspectives.

III.2. Lien entre adhésion et physico-chimie du film résiduel

D'après les résultats présentés précédemment, il apparaît que des produits appliqués sur la peau ou sur des surfaces modèles modifient leurs propriétés de surfaces, notamment les propriétés chimiques, physico-chimiques et sensorielles. De plus, les films résiduels de ces produits possèdent des propriétés anti-adhésion de particules très diverses. Nous avons donc tenté de répondre à la question « Existe-t-il un lien entre les propriétés résiduelles des produits et leurs propriétés anti-adhésion de particules ? ». Dans cette partie, nous nous

focaliserons sur l'étude menée sur SFS, car il s'agit de la surface modélisant le mieux l'adhésion observée sur la peau *in vivo*.

Dans une première approche, nous avons cherché à évaluer le caractère collant du film résiduel des produits, par une étude sensorielle, mais également par une mesure instrumentale présentée dans la publication « *Prediction of residual film perception of cosmetic products using an instrumental method and non-biological surfaces: the example of stickiness after skin application* », basée sur une mesure de texturométrie. L'objectif était de déterminer si le caractère adhésif tel qu'il peut être perçu par un évaluateur est responsable de l'adhésion des pigments sur la peau. La figure ci-dessous (Figure 63) présente les corrélations simples obtenues entre l'adhésion des pigments 1 mesurée 3 min après application et les mesures sensorielles et instrumentales du collant sur SFS.

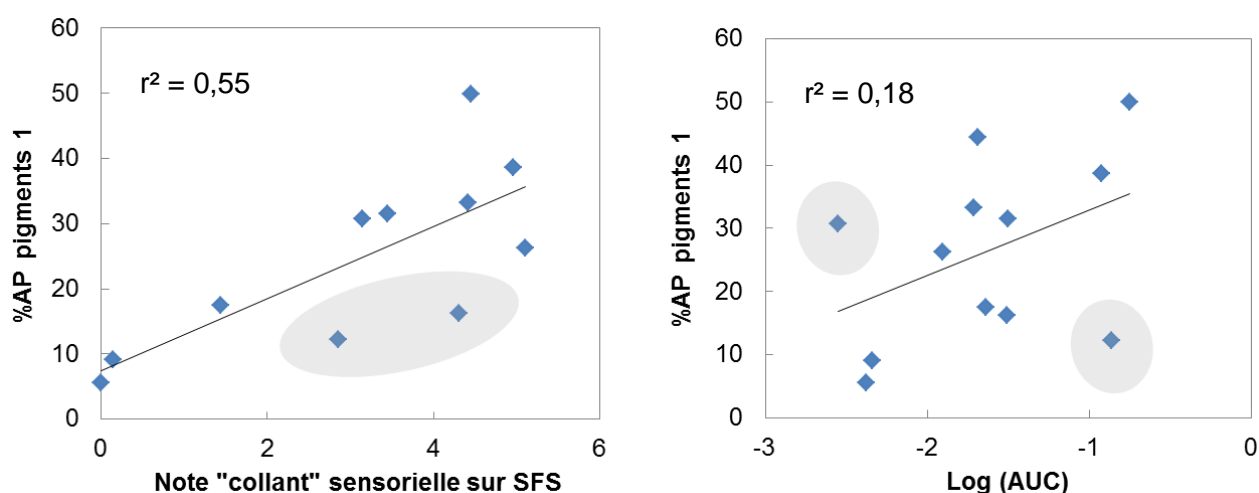


Figure 63. Etude de corrélation entre l'adhésion des pigments 1 sur la SFS et le collant résiduel mesuré (a) sensoriellement et (b) instrumentalement sur SFS

Ces corrélations sont malheureusement trop faibles pour expliquer l'adhésion des pigments 1 ($r^2 = 0,55$ pour la mesure sensorielle et $r^2 = 0,18$ pour la mesure instrumentale). Néanmoins on observe une tendance générale, les produits les plus collants ayant tendance à davantage adhérer les pigments 1. Seuls les produits grisés semblent ne pas suivre cette tendance. D'autres phénomènes doivent donc être impliqués dans l'adhésion des particules. De plus, cette tendance n'est pas du tout vérifiée pour les pigments 2, confirmant bien que d'autres phénomènes interviennent dans l'adhésion.

Des tentatives de corrélations simples entre grandeurs physico-chimiques et adhésion des particules ont été réalisées, mais là encore, aucune de ces corrélations ne nous a permis d'expliquer l'adhésion des pigments. Ceci est surprenant puisque, d'après la théorie de Johnson, Kendall et Roberts (JKR), décrivant l'adhésion d'une sphère sur une surface plane élastique, la force retenant une particule sphérique sur un support plan est

proportionnelle au travail d'adhésion calculé grâce aux composantes de l'énergie libre de surface des deux matériaux en contact (Kendall 1971). A ce stade, sur la base des résultats expérimentaux obtenus, cette théorie ne semble pas être vérifiée dans le cas de l'adhésion des pigments sur les films résiduels des produits cosmétiques.

Des corrélations multiples ont ensuite été réalisées, en utilisant à la fois les propriétés physico-chimiques, chimiques et sensorielles mesurées sur la SFS pour tenter d'expliquer l'adhésion des pigments 1. Parmi les différentes combinaisons possibles des variables disponibles, le modèle le plus satisfaisant établi fait intervenir la perception sensorielle de collant sur SFS et l'énergie libre de surface des films résiduels (Figure 64) (établi sur 10 produits et sur la peau nue, le produit P11 n'ayant pas été évalué sensoriellement sur la SFS).

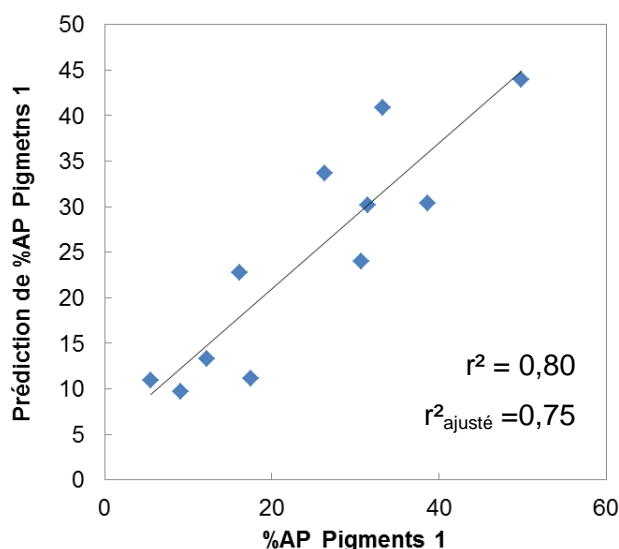


Figure 64. Prédiction du %AP Pigments 1 à partir d'une variable sensorielle et d'une variable physico-chimique

L'équation du modèle est la suivante :

$$\%AP \text{ Pigments } 1 = 29,90 + 7,35 \times \text{Note collant sur SFS} - 0,67 \times \gamma_S$$

Le coefficient de détermination obtenu de 0,80 n'est pas excellent mais suffisant pour définir des pistes de formulation : l'adhésion des pigments 1 sera plus élevée si le film résiduel du produit est collant et si son énergie de surface est faible.

Dans le cas des pigments 2, la variable sensorielle ne permet pas d'expliquer l'adhésion. Les corrélations multiples ont permis de définir un modèle satisfaisant, présenté ci-dessous (Figure 65) (établi sur les 11 produits et la peau nue). L'équation du modèle est la suivante :

$$\%AP \text{ Pigments } 2 = 85,10 - 5,34 \times \gamma^+ - 0,77 \times \theta_{\text{Formamide}}$$

Le coefficient de détermination obtenu est là encore assez faible ($r^2 = 0,77$) mais reste suffisant pour estimer le caractère anti-adhésion de particules du film de résiduel : pour empêcher l'adhésion des pigments 2, celui-ci devrait faiblement interagir avec le formamide, c'est-à-dire présenter une composante acide relativement élevée. Ceci semble pouvoir s'expliquer par les propriétés physico-chimiques des particules. En effet, leur composante acide ($\gamma^+_{P_2} = 4,9$) est relativement élevée par rapport aux autres pigments. Les films résiduels présentant généralement une composante basique élevée pourront interagir avec les pigments 2 par interaction asymétrique. Néanmoins, l'augmentation de la composante acide des films risque d'induire une répulsion entre les paramètres de même signe (positif) et donc diminuer l'interaction film / pigments 2. Comme déjà évoqué précédemment, il pourrait être intéressant de compléter ces études par une analyse de charge surfacique, qui permettrait d'apporter des informations complémentaires.

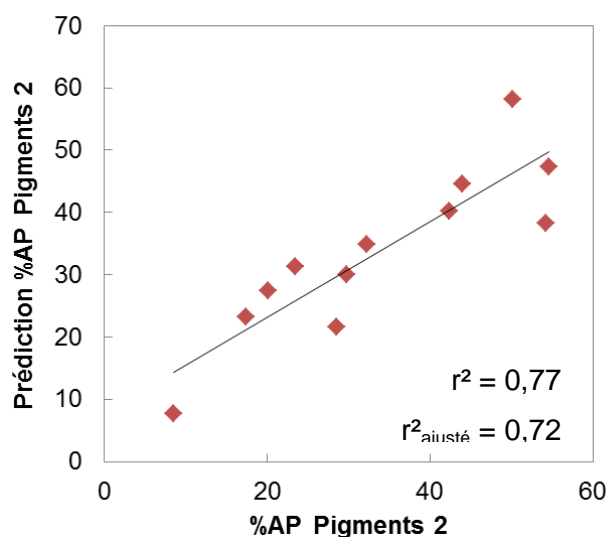


Figure 65. Prédiction du %AP Pigments 2 à partir de deux variables physico-chimiques

De manière générale, cette étude démontre l'intérêt d'étudier les propriétés du film résiduel des produits cosmétiques pour tenter de comprendre leur propriété anti-adhésion de particules. Cependant, malgré l'observation de tendances intéressantes, les résultats obtenus ne semblent pas suffisants pour expliquer l'adhésion des pigments.

En effet, l'adhésion de particules sur une surface est un phénomène complexe, faisant intervenir à la fois les forces de Van der Waals, décrites par la physico-chimie, mais également des forces électrostatiques et des forces capillaires sur film humide (Kendall 1971; Allen Bowing 1988; Salazar-Banda et al. 2007). D'autres forces peuvent aussi entrer en jeu, comme la force hydrodynamique due à la viscosité du film résiduel si son épaisseur est importante (Pailler-Mattei et al. 2009). De ce fait, la présente étude n'est pas suffisamment exhaustive pour pouvoir prédire l'adhésion des particules modèles

sélectionnées sur le film résiduel de produits cosmétiques. Les résultats obtenus démontrent tout de même l'intérêt de l'approche physico-chimique pour mieux comprendre ce phénomène d'adhésion par une approche instrumentale relativement simple à réaliser.

III.3. Apport du modèle BS dans la compréhension de l'adhésion des particules

L'étude de l'adhésion des pigments 1 sur la surface BS, bien que non représentative du phénomène d'adhésion *in vivo*, apporte des informations importantes. Le même processus d'analyse a été suivi : des corrélations simples ont été établies entre le %AP de pigments 1 (calculé par mesure colorimétrique) et les propriétés sensorielles et instrumentales des films résiduels mesurées sur BS. Cette fois-ci, une corrélation simple avec une grandeur instrumentale, mesurée par infrarouge, paraît très intéressante. Cette grandeur caractérise l'aire absorbée entre les longueurs d'onde entre 2995 cm^{-1} et 2800 cm^{-1} (valeurs négatives) (Figure 66), correspondant aux absorptions des chaînes CH_2 des bicouches lipidiques (Mendelsohn, Flach, and Moore 2006). Ainsi, plus l'aire calculée en valeur absolue est élevée, plus l'absorption associée aux chaînes lipidiques est importante.

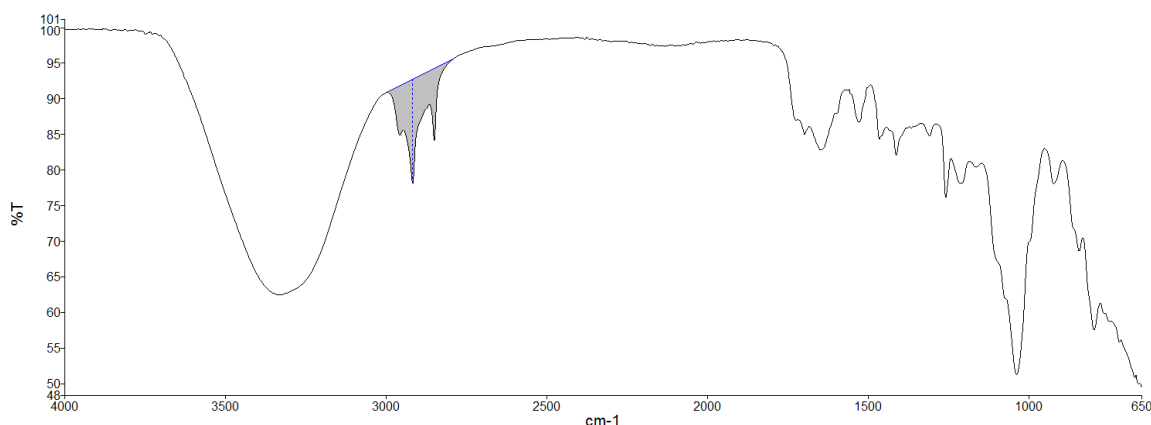


Figure 66. Exemple de calcul d'aire absorbée entre les longueurs d'ondes 2995 cm^{-1} et 2800 cm^{-1}

La corrélation entre le %AP pour les pigments 1 et cette grandeur, noté A_{IR} est présentée ci-dessous (Figure 67). Cette corrélation est obtenue sur 10 produits (le produit 1 possédant une absorption trop importante entre 3600 et 2900 cm^{-1} à cause de la forte quantité d'eau et d'alcool contenue dans le produit, ne permettant pas de calculer l' A_{IR}). Pour cette corrélation simple, le coefficient de détermination de 0,79 est déjà équivalent à ceux obtenus pour les précédentes corrélations multiples obtenues sur SFS.

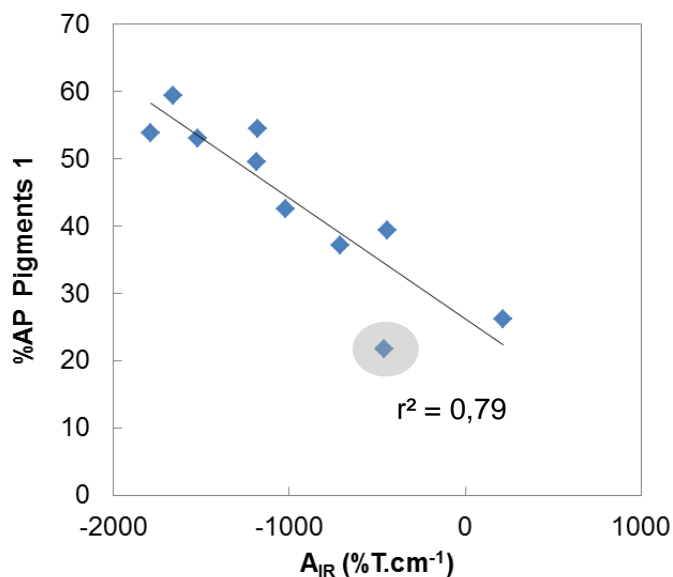


Figure 67. Corrélation entre une grandeur instrumentale de composition chimique et le %AP pigment 1 mesuré sur BS

Le produit P10 (cyclopentasiloxane), grisé sur la Figure 67, de nature très différente des autres produits et n'étant pas constitué de lipides, ne suit pas la même tendance. Sans ce produit, la corrélation s'avère nettement meilleure ($r^2 = 0,88$). Ainsi, l'adhésion des pigments 1 serait fortement liée à la teneur en lipide du film résiduel.

Cette mesure instrumentale n'était pas réalisable sur SFS car, comme discuté dans les précédents paragraphes, les mesures infrarouges réalisées sur ce support après application de produit ne permettaient pas d'étudier de façon pertinente la composition du film résiduel. Cette difficulté est causée par la forte absorption de la Dragonskin 20® autour de 1000 cm^{-1} , masquant l'effet des produits sur la composition chimique de surface.

Pour aller plus loin, une corrélation multiple entre les variables instrumentales et sensorielles a permis d'améliorer le précédent modèle. Cette fois-ci, le %AP des pigments 1 est prédit grâce à la fois à cette mesure infrarouge et à une grandeur physico-chimique : l'hydrophobie du film résiduel $\theta_{\text{eau_BS}}$ (Figure 68). L'équation du modèle obtenu est la suivante :

$$\%AP\text{ Pigments } 1 = 36,62 - 0,01 \times A_{IR} - 0,32 \times \theta_{\text{eau_BS}}$$

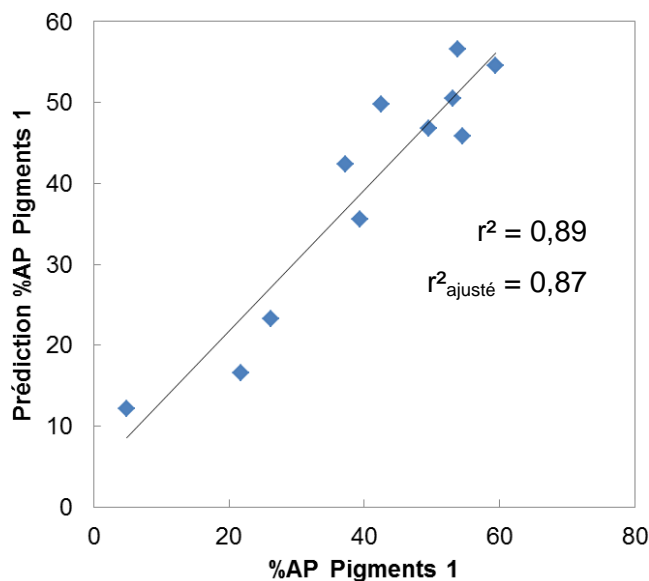


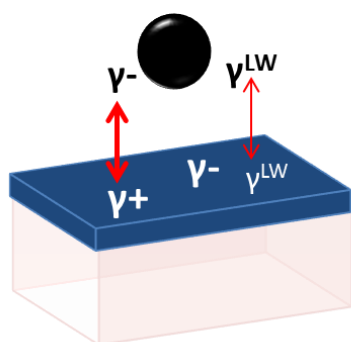
Figure 68. Prédiction du %AP des pigments 1 sur BS grâce à une grandeur physico-chimique et à la teneur en lipides du film résiduel

Cette corrélation est établie à partir des mesures réalisées sur 10 produits et la peau nue. Les r^2 et $r^2_{\text{ajusté}}$ supérieurs à 0,80 sont cette fois-ci très satisfaisants. Ainsi, il semblerait que, sur la BS, l'adhésion des pigments 1 est plus importante sur les films résiduels plus hydrophiles mais riches en lipides. Les pigments 1 hydrophiles présentant une composante basique très élevée ($\gamma_{\text{pigments1}}^- = 32,5 \text{ mJ/m}^2$) auront tendance à plus interagir avec des films résiduels riches en eau présentant une composante γ^{AB} relativement élevée, donc plus hydrophiles. En contrepartie, le ratio $\gamma_{\text{pigment1}}^{\text{AB}}/\gamma_{\text{pigment1}}^{\text{LW}}$ de 0,44 indique la proportion importante d'interactions apolaires dans l'énergie de surface de ces particules. De fait, elles ont tendance à également beaucoup interagir avec les chaînes CH_2 apolaires des bicouches lipidiques, caractérisées par A_{IR} , expliquant la corrélation multiple obtenue. Le schéma bilan ci-dessous (Figure 69) récapitule les interactions impliquées en fonction de la nature du film résiduel (riche en eau ou en lipides).

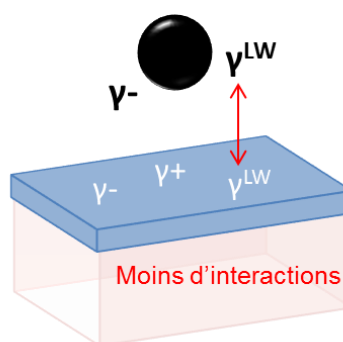
Ce résultat apporte donc des pistes très intéressantes et plus robustes que l'étude sur SFS. Cela démontre à nouveau l'intérêt de la démarche physico-chimique pour expliquer l'adhésion des particules sur une surface modèle.

Film résiduel riche en eau $\rightarrow \gamma^{AB}$ élevé

Film résiduel pauvre en eau $\rightarrow \gamma^+$ ou γ^- faible



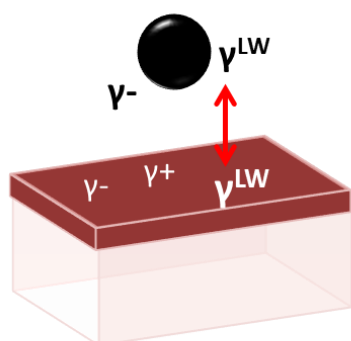
FORTE ADHESION



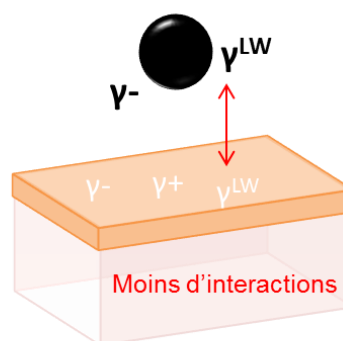
FAIBLE ADHESION

Film résiduel riche en lipides $\rightarrow \gamma^{LW}$ élevé

Film résiduel pauvre en lipides $\rightarrow \gamma^{LW}$ faible



FORTE ADHESION



FAIBLE ADHESION

Figure 69. Compréhension du phénomène d'adhésion des pigments 1 mesurée sur BS par rapport à la chimie et la physico-chimie des films résiduels.

IV. Conclusion du chapitre

En conclusion, ce chapitre présente l'ensemble des études réalisées durant ces trois années de thèse, visant à caractériser l'impact de l'application de produits cosmétiques sur les propriétés de surface de la peau, avec pour objectif de mieux comprendre leurs éventuelles propriétés anti-pollution.

Dans un premier temps, ce film résiduel a été mis en évidence *in vivo*, ce qui jusqu'alors n'avait jamais été réalisé. Il a été montré que l'application de produits cosmétiques pouvait modifier la mouillabilité de la peau et sa composition chimique de surface. Cette étude suggère que les produits peuvent grandement influencer les propriétés de surface, pouvant induire d'autres modifications. Par exemple, en augmentant la mouillabilité de la surface de la peau, la surface de contact entre des actifs présents dans les produits topiques et la peau est plus importante, ce qui peut induire une plus grande pénétration. La compréhension de ces phénomènes peut être d'une grande utilité non seulement en cosmétique mais

également lors du développement de produits pharmaceutiques afin d'en améliorer leur efficacité.

Cependant, cette étude *in vivo* peut être contraignante en termes d'organisation et de coût, et peut présenter de très grandes variabilités inter individus. De ce fait, une nouvelle méthodologie d'étude a été développée, visant à étudier ce film résiduel sur des matériaux non-biologiques, mimant les propriétés de surface de la peau. Différents modèles ont donc été caractérisés et comparés à la peau *in vivo*, afin de sélectionner le plus performant. Il s'avère qu'en fonction de la propriété étudiée, il est plus pertinent d'utiliser l'un ou l'autre des modèles : la SFS mime parfaitement les propriétés physico-chimiques de la peau *in vivo* tandis que la BS reproduit mieux la chimie de surface et la sensorialité de la peau.

Cette nouvelle méthodologie d'étude ouvre de très nombreuses perspectives pour la recherche cosmétique. Notamment, il semble beaucoup plus simple d'étudier, grâce à ces modèles, les liens pouvant exister entre les propriétés résiduelles sensorielles et instrumentales des produits cosmétiques. Comme illustration, nous avons pu démontrer que la sensation de collant après application de produits était très fortement reliée à la fois à la mouillabilité et au coefficient de friction de la peau après application. Ainsi, il s'avère possible d'étudier par exemple l'impact de la composition de l'émulsion sur ces propriétés instrumentales facilement mesurables pour développer des produits aux propriétés sensorielles résiduelles contrôlées.

Enfin, cette méthodologie a été appliquée dans le cadre de l'étude de l'effet anti-pollution de produits cosmétiques, plus particulièrement pour tenter de comprendre comment un produit peut limiter ou non l'adhésion des particules polluantes. Il s'avère que ces propriétés anti-adhésion de particules sont très complexes puisqu'elles dépendent à la fois des propriétés des particules modèles utilisées mais aussi de la surface d'étude. De plus, de très nombreux phénomènes physiques peuvent intervenir : interactions de Van der Waals, forces électrostatiques, forces capillaires et hydrodynamiques ... Ainsi, la compréhension des propriétés anti-adhésions des films résiduels est à approfondir. Néanmoins, à partir des mesures réalisées sur BS, des pistes très intéressantes peuvent être définies. Ainsi, à partir des propriétés à la fois des pigments et des films résiduels, il est possible d'estimer le pouvoir anti-adhésion de particules : plus ces films résiduels seront riches en eau et/ou en lipides, plus ils ont tendance à augmenter l'adhésion des particules 1 étudiées. En perspective, il serait intéressant d'étudier d'autres propriétés surfaciques, telles que les charges électrostatiques de surface, pour améliorer la compréhension de ce phénomène. De plus, d'autres particules modèles pourraient être étudiées afin de confirmer les résultats obtenus avec les pigments les plus hydrophiles.

Conclusion de la thèse et perspectives

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet FUI UrbaSkin, dont les objectifs sont de mettre en évidence les effets des polluants atmosphériques sur la peau humaine et sa fonction barrière afin de développer de nouveaux produits et actifs cosmétiques présentant des propriétés anti-pollution. Cette thèse s'est focalisée plus particulièrement sur les propriétés de l'extrême surface de la peau, représentée par le *stratum corneum* (SC). En effet, le SC est la première couche de la peau en contact avec l'environnement et est donc la première cible des agressions extérieures. De plus, la grande majorité des mécanismes contrôlant la fonction barrière de la peau réside dans ce SC. Ainsi, toute perturbation ou modification de son intégrité aura un impact sur la peau et sur sa perméabilité.

De nombreux chercheurs se sont déjà intéressés à l'impact des polluants atmosphériques sur la peau, à travers des études épidémiologiques, *in vitro* ou sur modèle animal, et ont mis en évidence leurs effets sur l'accélération du vieillissement cutané, sur l'augmentation de la fréquence des désordres cutanés ou encore sur l'altération de paramètres physiologiques.

Néanmoins, les mécanismes d'action sont encore mal compris, et les modèles d'études utilisés sont trop simples et ne prennent pas suffisamment compte de la complexité de la peau humaine. De plus, l'impact des polluants sur les propriétés surfaciques reste très peu investigué, notamment d'un point de vue physico-chimique.

Par conséquent, les objectifs de cette thèse étaient multiples. Il fallait dans une première approche développer et/ou caractériser des modèles d'étude adaptés permettant de mettre en évidence un effet des polluants sur leurs propriétés surfaciques. Pour cela, nous avons utilisé le modèle d'explants de peau humaine, le plus proche de l'état physiologique de la peau *in vivo*. Ce modèle a été caractérisé d'un point de vue chimique, physico-chimique et physiologique grâce aux différentes méthodes présentées (mesure de l'angle de contact, de spectroscopie infrarouge, de pH et de perte insensible en eau). Une grande partie de ces travaux de thèse a donc été consacrée au développement de protocoles adaptés à l'étude *ex vivo*, afin d'une part de comparer les propriétés surfaciques des explants aux propriétés de la peau *in vivo*, et d'autre part de vérifier leur homogénéité sur un même donneur. Ces étapes ont permis ensuite d'étudier l'impact de plusieurs modèles de pollution sur la surface des explants. Parmi les modèles testés, la fumée de cigarette s'est avérée être le polluant le plus impactant en termes de propriétés surfaciques. Les études menées *ex vivo* ont permis de démontrer l'effet de la fumée de cigarette sur la mouillabilité de la peau et sur sa fonction barrière, ce qui n'avait jamais été mis en évidence jusqu'alors. L'oxydation des lipides induite

par la fumée est très probablement responsable de la désorganisation des bicouches lipidiques du SC observée, expliquant ainsi l'augmentation de leur perte insensible en eau.

Les résultats obtenus sur explants de peau ont pu être approfondis et ainsi mieux compris grâce à l'utilisation d'un nouveau modèle de peau, cette fois-ci non biologique. Ce modèle appelé Surfaskin a été développé spécifiquement pour la présente étude et entièrement caractérisé. Cette surface modèle possède de nombreux avantages par rapport aux modèles commerciaux existants. Elle reproduit parfaitement les propriétés topographiques de la peau *in vivo*, un élément souvent négligé dans les modèles commerciaux mais qui joue un rôle important dans les interactions peau / produits topiques et peau / polluants. De plus, elle possède un revêtement lipidique modulable, dont la composition et la concentration peuvent être adaptées en fonction du type de peau à analyser (peau grasse, peau sèche ...). Enfin, elle est simple d'utilisation, rapide à préparer, stable et donc utilisable dans le temps. Sa très bonne reproduction des propriétés chimique et topographique mais aussi physico-chimique de la peau *in vivo* en a fait un outil de choix pour ces travaux de thèse. Ainsi, un protocole d'exposition spécifique à cette surface a été mis au point et a permis de démontrer que certains polluants atmosphériques, notamment les métaux lourds, accélèrent l'oxydation du squalène, un important lipide cutané. Cette oxydation a des conséquences majeures sur la physico-chimie du modèle de peau, similaires aux effets observés après exposition des explants de peau à la fumée de cigarette. Cela nous a donc permis de comprendre et de confirmer le rôle de l'oxydation lipidique dans les altérations d'énergie libre de surface des explants exposés aux polluants, induisant une perturbation de leur fonction barrière cutanée.

Ces deux approches complémentaires sur modèles biologique et non biologique ont donc permis de caractériser l'impact de polluants atmosphériques sur les propriétés de surface de la peau. Ceux-ci sont responsables de la dégradation de la structure du SC, provoquant une plus grande perméabilité de la peau et modifiant son énergie libre de surface. Ces phénomènes peuvent être reliés aux conclusions des études épidémiologiques, démontrant une modification de paramètres physiologiques et une augmentation de la fréquence des désordres cutanés. Ces études nous ont permis de répondre au premier objectif du projet UrbaSkin, à savoir la compréhension de l'impact des polluants atmosphériques sur la peau humaine. Les liens entre les données surfaciques et les données histologiques et génomiques ont également pu être mis en évidence, ce qui représente une innovation dans la recherche cosmétique.

Au vu de ces résultats, il apparaît nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour protéger la peau contre l'effet néfaste de ces polluants, notamment grâce à l'utilisation de

produits cosmétiques. Cet aspect représente un objectif fondamental pour ce projet. Afin de comprendre comment ces produits peuvent protéger la peau de la pollution, il était avant tout essentiel de comprendre comment ils agissent en surface de la peau et comment ils en modifient ses propriétés. Ainsi, il a été nécessaire de mieux caractériser l'impact du produit sur la peau après application, à partir de l'étude de ses propriétés résiduelles. Ceci a permis de comprendre comment un produit peut présenter des propriétés anti-pollution, en particulier des propriétés barrières anti-adhésion de particules.

Ce film résiduel a pu être mis en évidence instrumentalement par des mesures réalisées *in vivo*. Les produits cosmétiques modifient notamment la mouillabilité et la composition chimique de surface de la peau, ce qui a été démontré grâce à des mesures de l'angle de contact et de spectroscopie infrarouge. Selon la nature et la composition du produit appliqué, les propriétés des films résiduels peuvent être très variées. Ces mesures, réalisées *in vivo*, pouvaient néanmoins être difficiles à réaliser d'un point de vue logistique, souffraient généralement de variabilité inter-individus à cause de l'impact très important de l'état initial de la peau (hydratation, prétraitement ...). C'est pourquoi une nouvelle méthodologie d'étude a dû être développée, grâce à l'utilisation de modèles non-biologiques permettant de s'affranchir de l'utilisation d'un panel de volontaires.

Pour cela, nous avons comparé le modèle Surfaskin développé au laboratoire avec d'autres modèles de peaux commerciaux (la Bioskin® et la Vitroskin®) et avec la peau *in vivo* pour sélectionner le modèle reproduisant le mieux les propriétés résiduelles instrumentales des produits cosmétiques. Au vu des résultats obtenus, la Surfaskin et la Bioskin® se sont avérées les plus pertinentes pour l'évaluation des propriétés chimiques et physico-chimiques de la surface de la peau. L'utilisation complémentaire de ces deux surfaces modèles a donc permis de réaliser une caractérisation instrumentale complète du film résiduel de produits cosmétiques. La Vitroskin®, elle, s'est avérée moins performante que les deux autres modèles pour les deux propriétés étudiées.

Nous nous sommes également intéressés aux propriétés sensorielles du film résiduel, à travers le descripteur de « collant après application ». Cette étude avait là encore pour objectif de comparer les modèles non-biologiques pour déterminer lequel reproduisait le mieux la sensorialité de la peau *in vivo* après application de produits cosmétiques. Nous avons démontré que le modèle Bioskin® était le plus pertinent pour étudier le collant résiduel. Cette étude a permis de développer, en parallèle des objectifs initiaux, une méthode 100% instrumentale permettant de prédire le collant résiduel de produits cosmétiques perçu *in vivo* grâce à une mesure de texturométrie réalisée sur Bioskin®. Le collant, critère tactile essentiel d'un produit cosmétique après application, pourra à présent

être mesuré et ce, sans avoir recours à un jury d'évaluateurs. Cette approche ouvre de nombreuses perspectives qui seront détaillées par la suite.

Nous avons donc développé une caractérisation instrumentale et sensorielle complète du film résiduel de produits cosmétiques, réalisée grâce à des mesures sur modèles de peau non-biologiques adaptés. La suite de l'étude consistait à mettre en relation ces propriétés résiduelles avec les propriétés anti-pollution des produits étudiés, notamment leur propriété anti-adhésion de particules. Un protocole d'étude anti-adhésion de particules modèles a donc été mis au point. L'impact du type de particules modèles, du temps et de la surface d'étude ont été soulignés. Si l'étude réalisée sur le modèle Surfaskin démontre certaines tendances expliquant l'adhésion des particules, l'étude sur Bioskin® apporte de réels éléments de compréhension de ce phénomène anti-adhésion. D'après les résultats obtenus, l'adhésion des particules hydrophiles est bien corrélée à deux paramètres instrumentaux : la mouillabilité du film résiduel et sa teneur en chaînes alkyles associées aux composés lipidiques. Ainsi, la corrélation multiple réalisée indique que l'adhésion des particules sera plus importante si le film résiduel est riche en eau et en composés lipidiques. Ces phénomènes s'expliquent par les propriétés physico-chimiques des particules et des films résiduels. Ces éléments apportent donc de nouvelles hypothèses très intéressantes pour la formulation de produits topiques capables de limiter l'adhésion des particules polluantes.

Il serait très intéressant de compléter cette étude des propriétés anti-adhésion en réalisant un plus grand screening de particules modèles, présentant une variété plus large de propriétés physico-chimiques, pour mieux comprendre l'impact de la physico-chimie dans le processus d'adhésion. Il semble ainsi essentiel de tester l'impact des différentes composantes d'énergie de surface des particules : polaire/apolaire, bipolaire, dispersive, ... pour approfondir la compréhension. De plus, d'autres propriétés de surfaces pourraient être évaluées, essentiellement pour étudier l'impact des forces électrostatiques dans ce phénomène d'adhésion. Enfin, l'utilisation de produits topiques de composition plus simples et mieux maîtrisée (utilisation d'émollients ou de solutions aqueuses par exemple) permettrait certainement de simplifier les systèmes d'interactions mis en jeu.

L'ensemble de ces travaux n'aurait pu être réalisé sans l'utilisation des modèles non-biologiques de peau qui ont permis à la fois de comprendre les modifications physico-chimiques induites par les polluants et d'étudier de façon simplifiée, rapide et répétable le film résiduel de produits cosmétiques. Ce développement méthodologique est d'un grand intérêt pour la recherche cosmétique. L'utilisation des modèles non-biologiques devrait permettre d'approfondir les liens entre propriétés instrumentales et sensorielles des produits cosmétiques, et de mieux comprendre les interactions entre les produits topiques et la

surface de la peau. En effet, ces modèles présentent une plus grande facilité d'utilisation par rapport aux modèles biologiques, et un moindre coût. Ils sont de plus utilisables dans le temps et plus standardisés. Des travaux d'amélioration des modèles existants pourraient permettre de se rapprocher encore davantage des propriétés de la peau *in vivo*. Concernant la Surfaskin, un contrôle de ses propriétés mécaniques ou de sa porosité permettrait d'améliorer ses performances, notamment d'un point de vue sensoriel. D'autres applications de cette surface pourraient également être envisagées, comme par exemple l'étude du microbiote cutané. Il serait ainsi intéressant d'évaluer la possibilité de coloniser cette surface par des bactéries cutanées, afin d'étudier ensuite l'impact de l'application de produits cosmétiques ou de l'environnement sur ce développement bactérien.

Enfin, l'approche physico-chimique pour l'étude des propriétés de surface de la peau apporte de nouvelles informations très pertinentes. Elle nous a permis d'évaluer l'effet des polluants sur la peau, mais aussi d'expliquer le caractère collant d'un produit, tel qu'il peut être perçu par un panel. En effet, plus le film résiduel est hydrophile, plus le produit apparaît perçu comme collant après application. Cette illustration ouvre donc de nouvelles perspectives et démontre l'intérêt de la physico-chimie pour étudier la surface de la peau.

Le lien entre les propriétés résiduelles et l'efficacité du produit mériterait également d'être approfondi. Il serait intéressant de démontrer comment la physico-chimie du résidu impacte la perméabilité de la peau. Cela pourrait permettre de développer de nouveaux outils pour formuler des produits plus efficaces. Pour cela, il serait également très pertinent d'étudier l'impact de la composition et de la nature du produit (gel, émulsion H/E, émulsion E/H, taux de phase grasse, nature de la phase grasse ...) sur ses propriétés résiduelles pour adapter, dès l'étape de formulation, la composition du produit par rapport aux propriétés désirées.

L'ensemble de ces perspectives permettra d'optimiser les étapes de formulation de produits topiques afin de leur conférer des propriétés particulières : anti-adhésion de particules, mouillabilité, augmentation de la pénétration d'actif, effet barrière, résidu collant, gras ou brillant ... Ces perspectives constitue un ensemble de challenges scientifiques de premier plan, et les connaissances qui en découleront présenteront de nombreuses retombées pour l'industrie, parmi lesquelles des gains d'efficacité et de temps considérables dans le processus de développement de produits cosmétiques innovants, sûrs et efficaces.

Références bibliographiques

- Afriat, Isabelle, and Bruno Biatry. 2000. Use of cubic gel particles as an anti-pollution agent, in particular in a cosmetic composition. US20020071820A1, issued 2000. <http://www.google.com/patents/US20020071820>.
- Airparif. 2015. "Émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre - Paris - Données 2012." Bilan. Paris: Airparif. http://www.airparif.asso.fr/_pdf/publications/emissions_ges_paris_donnees2012_122015.pdf.
- . 2016. "Airparif - Pollution - Les Différents Polluants et Leur Évolution." 2016. <http://www.airparif.asso.fr/pollution/differents-polluants>.
- Allen Bowing, R. 1988. "A Theoretical Review of Particles Adhesion." In *Particles on Surfaces 1. Detection, Adhesion, and Removal*. Mittal.
- Alonso, Cristina, Clara Barba, Laia Rubio, Sonya Scott, Anna Kilimnik, Luisa Coderch, Jaime Notario, and José Luis Parra. 2009. "An Ex Vivo Methodology to Assess the Lipid Peroxidation in Stratum Corneum." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 97 (2): 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.08.003>.
- ANSM. 2017. "Produits Cosmétiques - ANSM: Agence Nationale de Sécurité Du Médicament et Des Produits de Santé." ANSM. 2017. <https://ansm.sante.fr/Produits-de-sante/Produits-cosmetiques>.
- Baroli, Biancamaria, Maria Grazia Ennas, Felice Loffredo, Michela Isola, Raimondo Pinna, and M. Arturo López-Quintela. 2007. "Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin." *Journal of Investigative Dermatology* 127 (7): 1701–1712.
- Baudouin, C., M. Charveron, R. Tarroux, and Y. Gall. 2002. "Environmental Pollutants and Skin Cancer." *Cell Biology and Toxicology* 18 (5): 341–348.
- Berardesca, E., and H. I. Maibach. 1987. "Bioengineering and the Patch Test." *Contact Dermatitis* 18 (1): 3–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1988.tb05481.x>.
- Bhushan, Bharat, and Wei Tang. 2011. "Surface, Tribological, and Mechanical Characterization of Synthetic Skins for Tribological Applications in Cosmetic Science." *Journal of Applied Polymer Science* 120 (5): 2881–90. <https://doi.org/10.1002/app.33340>.
- Biatry, Bruno. 2000. Use of phytanetriol as an anti-pollution agent, in particular in a cosmetic composition. US20020048593A1, issued 2000. <http://www.google.com/patents/US20020048593>.
- Biniek, Krysta, Kemal Levi, and Reinhold H. Dauskardt. 2012. "Solar UV Radiation Reduces the Barrier Function of Human Skin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (42): 17111–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206851109>.
- Boisnic, S., and M.-C. Branchet. 2005. "Vieillessement cutané environnemental." *EMC - Dermatologie-Cosmétologie* 2 (4): 242–47. <https://doi.org/10.1016/j.emcdc.2005.10.003>.
- Bommaman, D., Russel O. Potts, and Richard H. Guy. 1990. "Examination of Stratum Corneum Barrier Function In Vivo by Infrared Spectroscopy." *The Journal of Investigative Dermatology* 95 (4). http://www.nature.com/jid/journal/v95/n4/pdf/5612838a.pdf?origin=publication_detail.
- Boncheva, M. 2014. "The Physical Chemistry of the Stratum Corneum Lipids." *International Journal of Cosmetic Science* 36 (6): 505–15. <https://doi.org/10.1111/ics.12162>.

- Borgerding, Michael, and Hubert Klus. 2005. "Analysis of Complex Mixtures – Cigarette Smoke." *Experimental and Toxicologic Pathology* 57 (July): 43–73. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.05.010>.
- Bouwstra, Joke A., Gert S. Gooris, Frank E. R. Dubbelaar, and Maja Ponec. 2002. "Phase Behavior of Stratum Corneum Lipid Mixtures Based on Human Ceramides: The Role of Natural and Synthetic Ceramide 1." *Journal of Investigative Dermatology* 118 (4): 606–17. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01706.x>.
- Bouwstra, Joke A., Gert S. Gooris, Joop A. Van der Spek, and Wim Bras. 1991. "Structural Investigations of Human Stratum Corneum by Small-Angle X-Ray Scattering." *The Journal of Investigative Dermatology* 97 (6): 1005–12.
- Brancaleon, Lorenzo, Michael Paul Bamberg, and Nikiforos Kollias. 2000. "Spectral Differences between Stratum Corneum and Sebaceous Molecular Components in the Mid-IR." *Applied Spectroscopy* 54 (8): 1175–82. <https://doi.org/10.1366/0003702001950742>.
- Camera, Emanuela, Matteo Ludovici, Marisa Galante, Jo-Linda Sinagra, and Mauro Picardo. 2010. "Comprehensive Analysis of the Major Lipid Classes in Sebum by Rapid Resolution High-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Mass Spectrometry." *Journal of Lipid Research* 51 (11): 3377–88. <https://doi.org/10.1194/jlr.D008391>.
- Catroux, Philippe, José Cotovio, and Daniel Duche. 2003. Utilisation de l'acide ellagique comme agent cosmétique anti-pollution. EP1282395 A1, filed May 14, 2001, and issued February 12, 2003. <http://www.google.com.au/patents/EP1282395A1>.
- Charrouf, Zoubida, and Dominique Guillaume. 2008. "Argan Oil: Occurrence, Composition and Impact on Human Health." *European Journal of Lipid Science and Technology* 110 (7): 632–36. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700220>.
- Chiba, Katsuyoshi, Kazuhiko Yoshizawa, Ikuyo Makino, Koji Kawakami, and Masaharu Onoue. 2000. "Comedogenicity of Squalene Monohydroperoxide in the Skin After Topical Application." *The Journal of Toxicological Sciences* 25 (2): 77–83. <https://doi.org/10.2131/jts.25.77>.
- Cho, Hong-il, Chong Hyun Won, Sung Eun Chang, Mi Woo Lee, and Gyeong-Hun Park. 2013. "Usefulness and Limitations of Skin Explants to Assess Laser Treatment." *Medical Lasers* 2 (2): 58–63.
- Choi, Hyun, Dong Wook Shin, Wonnyon Kim, Seong-Jae Doh, Soo Hwan Lee, and Minsoo Noh. 2011. "Asian Dust Storm Particles Induce a Broad Toxicological Transcriptional Program in Human Epidermal Keratinocytes." *Toxicology Letters* 200 (1–2): 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.10.019>.
- CIRC. 2011. "Classification Du CIRC Par Localisations Cancéreuses | Cancer et Environnement." 2011. <http://www.cancer-environnement.fr/479-Classification-par-localisations-cancereuses.ce.aspx>.
- Civille, G. V., and C. A. Dus. 1991. "Evaluating Tactile Properties of Skincare Products: A Descriptive Analysis Technique." *Cosmetics and Toiletries* 106 (5).
- Close, J.A. 1994. "Men's Skin Care: A Sensory Perspective." *Cosmetics and Toiletries* 109 (2): 61–65.
- Cozzolino, D., M. B. Esler, R. G. Damberg, W. U. Cynkar, D. R. Boehm, I. L. Francis, and M. Gishen. 2004. "Prediction of Colour and PH in Grapes Using a Diode Array Spectrophotometer (400–1100 Nm)." *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 12 (2): 105–11.

- Dalibart, Michel, and Laurent Servant. 2000. "Spectroscopie dans l'infrarouge." *Techniques de l'ingénieur.*, 29.
- David, Robert, and A. Wilhelm Neumann. 2014. "Contact Angle Patterns on Low-Energy Surfaces." *Advances in Colloid and Interface Science*, Manuel G. Velarde, 206 (April): 46–56. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.03.005>.
- Delalleau, A., G. Josse, J.-M. Lagarde, H. Zahouani, and J.-M. Bergheau. 2008. "A Nonlinear Elastic Behavior to Identify the Mechanical Parameters of Human Skin in Vivo." *Skin Research and Technology* 14 (2): 152–64. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2007.00269.x>.
- Denda, M., J. Koyama, R. Namba, and I. Horii. 1994. "Stratum Corneum Lipid Morphology and Transepidermal Water Loss in Normal Skin and Surfactant-Induced Scaly Skin." *Archives of Dermatological Research* 286 (1): 41–46. <https://doi.org/10.1007/BF00375842>.
- Derler, S., U. Schrade, and L.-C. Gerhardt. 2007. "Tribology of Human Skin and Mechanical Skin Equivalents in Contact with Textiles." *Wear* 263 (7–12): 1112–16. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2006.11.031>.
- Douguet, Marine, Céline Picard, Géraldine Savary, Fabien Merlaud, Nathalie Loubatbouleuc, and Michel Grisel. 2017. "Spreading Properties of Cosmetic Emollients: Use of Synthetic Skin Surface to Elucidate Structural Effect." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 154 (June): 307–14. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.03.028>.
- Draelos, Zoe Diana. 2000. "Therapeutic Moisturizers." *Dermatologic Clinics* 18 (4): 597–607.
- Drakaki, Eleni, Clio Dessinioti, and Christina V. Antoniou. 2014. "Air Pollution and the Skin." *Frontiers in Environmental Science* 2 (May). <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00011>.
- Dreher, F., P. Walde, P. Walther, and E. Wehri. 1997. "Interaction of a Lecithin Microemulsion Gel with Human Stratum Corneum and Its Effect on Transdermal Transport." *Journal of Controlled Release* 45 (2): 131–40. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(96\)01559-3](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(96)01559-3).
- Dubuisson, Pauline, Celine Picard, Michel Grisel, and Geraldine Savary. 2018. "How Does Composition Influence the Texture of Cosmetic Emulsions?" *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Special issue on Formula VIII, 536 (January): 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.08.001>.
- Dzwigalowska, A., A. Sołyga-Żurek, R. M. Dębowska, and I. Eris. 2013. "Preliminary Study in the Evaluation of Anti-Aging Cosmetic Treatment Using Two Complementary Methods for Assessing Skin Surface." *Skin Research and Technology* 19 (2): 155–61. <https://doi.org/10.1111/srt.12027>.
- Egawa, M., Y. Kohno, and Y. Kumano. 1999. "Oxidative Effects of Cigarette Smoke on the Human Skin." *International Journal of Cosmetic Science* 21 (2): 83–98. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2494.1999.181656.x>.
- Ejaz, Sohail, Muhammad Ashraf, Muhammad Nawaz, and Chae Woong Lim. 2009. "Total Particulate Matter and Wound Healing: An in Vivo Study with Histological Insights." *Biomedical and Environmental Sciences* 22: 278–87.
- Elias, Peter M. 2005. "Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View." *Journal of General Internal Medicine* 20 (5): 183–200.
- Elkeeb, Rania, Xiaoying Hui, Heidi Chan, Lilian Tian, and Howard I. Maibach. 2010. "Correlation of Transepidermal Water Loss with Skin Barrier Properties in Vitro: Comparison of Three Evaporimeters." *Skin Research and Technology* 16 (1): 9–15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2009.00406.x>.

- Elkhyat, A., P. Agache, H. Zahouani, and Ph. Humbert. 2001. "A New Method to Measure in Vivo Human Skin Hydrophobia." *International Journal of Cosmetic Science* 23 (6): 347–52. <https://doi.org/10.1046/j.0412-5463.2001.00108.x>.
- Elkhyat, A., A. Mavon, M. Leduc, P. Agache, and P. Humbert. 1996. "Skin Critical Surface Tension." *Skin Research and Technology* 2 (2): 91–96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.1996.tb00066.x>.
- Elkhyat, Ahmed, Ferial Fanian, Ahlam Abdou, Hajar Amarouch, and Philippe Humbert. 2017. "Influence of the Sebum and the Hydrolipidic Layer in Skin Wettability and Friction." In *Agache's Measuring the Skin*, 191–202. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-32383-1_19.
- Eudier, Florine, Géraldine Savary, Michel Grisel, and Céline Picard. n.d. "Skin Surface Physico-Chemistry: Characteristics, Methods of Measurement, Influencing Factors and Future Developments." *Unpublished Data*.
- Fageon, L., D. Moyal, J. Coutet, and D. Candau. 2009. "Importance of Sunscreen Products Spreading Protocol and Substrate Roughness for in Vitro Sun Protection Factor Assessment." *International Journal of Cosmetic Science* 31 (6): 405–18. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00524.x>.
- Farage, Miranda A., and Howard I. Maibach. 2010. "Sensitive Skin: Closing in on a Physiological Cause." *Contact Dermatitis* 62 (3): 137–49. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2009.01697.x>.
- Fluhr, J.w., H. Dickel, O. Kuss, I. Weyher, T.I. Diepgen, and E. Berardesca. 2002. "Impact of Anatomical Location on Barrier Recovery, Surface PH and Stratum Corneum Hydration after Acute Barrier Disruption." *British Journal of Dermatology* 146 (5): 770–76. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2002.04695.x>.
- Forslind, Bo. 1994. "A Domain Mosaic Model of the Skin Barrier." *Acta Dermato Venereologica* 74: 1–6.
- Francès., C., S. Boisnic, D. J. Hartmann, B. Dautzenberg, M. C. Branchet, Y. Le Charpentier, and L. Robert. 1991. "Changes in the Elastic Tissue of the Non-Sun-Exposed Skin of Cigarette Smokers." *British Journal of Dermatology* 125 (1): 43–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1991.tb06037.x>.
- François, Isabelle M., Hanne Wins, Saskia Buysens, Christof Godts, Elke Van Pee, Bart Nicolaï, and Maurice De Proft. 2008. "Predicting Sensory Attributes of Different Chicory Hybrids Using Physico-Chemical Measurements and Visible/near Infrared Spectroscopy." *Postharvest Biology and Technology* 49 (3): 366–73. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.011>.
- Frei, B, T M Forte, B N Ames, and C E Cross. 1991. "Gas Phase Oxidants of Cigarette Smoke Induce Lipid Peroxidation and Changes in Lipoprotein Properties in Human Blood Plasma. Protective Effects of Ascorbic Acid." *Biochemical Journal* 277 (Pt 1): 133–38.
- Freiman, Anatoli, Garrett Bird, Andrei I. Metelitsa, Benjamin Barankin, and Gilles J. Lauzon. 2004. "Cutaneous Effects of Smoking." *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 8 (6): 415–23. <https://doi.org/10.1007/s10227-005-0020-8>.
- Garaud, Jean-Luc, Hortense Baillet, Isabelle Van Reeth, Len Petroff, and Sylvain Massé. 2015. "Silicones as Materials with Potential to Reduce Pollution Particle Adhesion on Skin." In . Zurich. http://tst.pg2.at/abstracts/a0117.html?zoom_highlight=.
- Ge, Shumin, Yuanyuan Lin, Haoyang Lu, Qi Li, Jian He, Bao Chen, Chuanbin Wu, and Yuehong Xu. 2014. "Percutaneous Delivery of Econazole Using Microemulsion as Vehicle: Formulation, Evaluation and Vesicle-Skin Interaction." *International Journal of Pharmaceutics* 465 (1): 120–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.02.012>.

- Geerligs, Marion. 2006. "In vitro mechanical characterization of human skin layers: stratum corneum, epidermis and hypodermis." University of Eindhoven.
- George, Robert, Steve Merten, Tim T Wang, Peter Kennedy, and Peter Maitz. 2014. "In Vivo Analysis of Dermal and Systemic Absorption of Silver Nanoparticles through Healthy Human Skin." *Australasian Journal of Dermatology* 55 (3): 185–90. <https://doi.org/10.1111/ajd.12101>.
- Georgel, A. 2008. "Pénétration transcutanée des substances actives. Application en dermocosmétologie." Nancy: Université Henri Poincaré. http://scd.uhp-nancy.fr/docnum/SCDPHA_T_2009_ROGOWSKI_JULIAN.pdf.
- Gerhardt, L.-C., A. Schiller, B. Müller, N. D. Spencer, and S. Derler. 2009. "Fabrication, Characterisation and Tribological Investigation of Artificial Skin Surface Lipid Films." *Tribology Letters* 34 (2): 81–93. <https://doi.org/10.1007/s11249-009-9411-0>.
- Gilbert, Laura. 2012. "Caractérisation Physico-Chimique et Sensorielle d'ingrédients Cosmétiques: Une Approche Méthodologique." Université du Havre. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00956601/>.
- Gilbert, Laura, Celine Picard, Geraldine Savary, and Michel Grisel. 2012. "Impact of Polymers on Texture Properties of Cosmetic Emulsions: A Methodological Approach." *Journal of Sensory Studies* 27 (5): 392–402. <https://doi.org/10.1111/joss.12001>.
- Gilbert, Laura, Géraldine Savary, Michel Grisel, and Céline Picard. 2013. "Predicting Sensory Texture Properties of Cosmetic Emulsions by Physical Measurements." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 124 (May): 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.03.002>.
- Girman, J. R., M. G. Apte, G. W. Traynor, J. R. Allen, and C. D. Hollowell. 1982. "Pollutant Emission Rates from Indoor Combustion Appliances and Sidestream Cigarette Smoke." *Environment International, Indoor Air Pollution*, 8 (1): 213–21. [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(82\)90030-7](https://doi.org/10.1016/0160-4120(82)90030-7).
- Greene, Richard S., Donald T. Downing, Peter E. Pochi, and John S. Strauss. 1970. "Anatomical Variation in the Amount and Composition of Human Skin Surface Lipid." *Journal of Investigative Dermatology* 54 (3): 240–47. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12280318>.
- Guinot, Benjamin. 2008. "Pollution atmosphérique et développement urbain en Chine : quelles perspectives ?" *Perspectives chinoises* 105 (4): 67–76. <https://doi.org/10.3406/perch.2008.3674>.
- Guo, J.W., T.K. Lin, C.H. Wu, K.C. Wei, C-C.E. Lan, A.C-Y. Peng, J.C. Tsai, and H.M. Sheu. 2015. "Human Sebum Extract Induces Barrier Disruption and Cytokine Expression in Murine Epidermis." *Journal of Dermatological Science* 78: 34–43.
- Hafték, Marek. 2016. "Apport de La Microscopie Électronique à l'étude de La Peau." Communication orale presented at the Séminaire SF2IC, Paris, March 10.
- He, Q. C., A. Tavakkol, K. Wietecha, R. Begum-Gafur, S. A. Ansari, and T. Polefka. 2006. "Effects of Environmentally Realistic Levels of Ozone on Stratum Corneum Function." *International Journal of Cosmetic Science* 28 (5): 349–57. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00347.x>.
- Hüls, Anke, Andrea Vierkötter, Wenshan Gao, Ursula Krämer, Yajun Yang, Anan Ding, Sabine Stolz, et al. 2016. "Traffic Related Air Pollution Contributes to Development of Facial Lentigines: Further Epidemiological Evidence from Caucasians and Asians." *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.12.045>.
- Ichihashi, M., M. Ueda, A. Budiyanto, T. Bito, M. Oka, M. Fukunaga, K. Tsuru, and T. Horikawa. 2003. "UV-Induced Skin Damage." *Toxicology, Environmental and*

- Nutritional Interactions Antioxidant Nutrients and Environmental Health, Part C, 189 (1): 21–39. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00150-1).
- Ikeda, Naoko, Kyoko Miyashita, Rie Hikima, and Shoji Tominaga. 2014. “Reflection Measurement and Visual Evaluation of the Luminosity of Skin Coated with Powder Foundation.” *Color Research & Application* 39 (1): 45–55. <https://doi.org/10.1002/col.21753>.
- Imokawa, Genji., Hiroshi. Kuno, and Michio. Kawai. 1990. “Stratum Corneum Lipids Serve as a Bound-Water Modulator.” *Journal of Investigative Dermatology* 96 (6): 845–51. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12474562>.
- Isik, Birgul, Ali Ceylan, and Recep Isik. 2007. “Oxidative Stress in Smokers and Non-Smokers.” *Inhalation Toxicology* 19 (9): 767–69. <https://doi.org/10.1080/08958370701401418>.
- Isoir, Muriel. 2006. “Evaluation d’un modèle alternatif de peau dans l’étude de l’atteinte épidermique après exposition à différents agents de stress environnementaux: rayonnements ionisants (RI) et ultra-violets (UVB).” Saint-Quentin-en-Yvelines: Université de Versailles. http://www.irsn.fr/FR/Larecherche/Formation_recherche/Theses/Theses-soutenues/DRPH/Documents/2006-these-isoir.pdf.
- Jachowicz, J., R. McMullen, and D. Pretty paul. 2007. “Indentometric Analysis of in Vivo Skin and Comparison with Artificial Skin Models.” *Skin Research and Technology* 13 (3): 299–309. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2007.00229.x>.
- Jacquet, Emmanuelle, Gwendal Josse, Fouad Khatyr, and Camille Garcin. 2008. “A New Experimental Method for Measuring Skin’s Natural Tension.” *Skin Research and Technology* 14 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2007.00259.x>.
- Jermann, R., M. Toumiat, and D. Imfeld. 2002. “Development of an in Vitro Efficacy Test for Self-Tanning Formulations.” *International Journal of Cosmetic Science* 24 (1): 35–42. <https://doi.org/10.1046/j.0412-5463.2001.00123.x>.
- Jiang, Shao Jun, Jie Yu Chen, Zhen Feng Lu, Jie Yao, Dun Fa Che, and Xiao Jun Zhou. 2006. “Biophysical and Morphological Changes in the Stratum Corneum Lipids Induced by UVB Irradiation.” *Journal of Dermatological Science* 44 (1): 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.05.012>.
- Jones, Siân, Emmanuelle Rio, Colette Cazeneuve, Luc Nicolas-Morgantini, Frédéric Restagno, and Gustavo S. Luengo. 2016. “Tribological Influence of a Liquid Meniscus in Human Sebum Cleaning.” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 498 (June): 268–75. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.03.047>.
- Just, M., M. Ribera, E. Monsó, J.c. Lorenzo, and C. Ferrándiz. 2007. “Effect of Smoking on Skin Elastic Fibres: Morphometric and Immunohistochemical Analysis.” *British Journal of Dermatology* 156 (1): 85–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07575.x>.
- Jux, Bettina, Stephanie Kadow, Sandra Luecke, Agneta Rannug, Jean Krutmann, and Charlotte Esser. 2011. “The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation-Induced Skin Tanning.” *Journal of Investigative Dermatology* 131 (1): 203–10. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.269>.
- Kampa, Marilena, and Elias Castanas. 2008. “Human Health Effects of Air Pollution.” *Environmental Pollution* 151 (2): 362–67. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.012>.
- Kanitakis, Jean. 2012. “Anatomy, Histology and Immunohistochemistry of Normal Human Skin.” *European Journal of Dermatology* 12 (4): 390–401.

- Katsouyanni, Klea. 2003. "Ambient Air Pollution and Health." *British Medical Bulletin* 68 (1): 143–56. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg028>.
- Keirsse, Julie. 2003. "Spectroscopie Infrarouge Déportée : Mise au point d'un biocapteur pour l'imagerie métabolique et la sécurité microbiologique." Rennes: Université de Rennes 1.
- Kendall, K. 1971. "The Adhesion and Surface Energy of Elastic Solids." *Journal of Physics D: Applied Physics* 4 (8): 1186. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/4/8/320>.
- Kim, Jihyun, Eun-Hye Kim, Inbo Oh, Kweon Jung, Youngshin Han, Hae-Kwan Cheong, and Kangmo Ahn. 2013. "Symptoms of Atopic Dermatitis Are Influenced by Outdoor Air Pollution." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (2): 495-498.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.019>.
- Kohen, K. 1999. "Skin Antioxidants: Their Role in Aging and in Oxidative Stress - New Approaches for Their Evaluation." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 53: 181–92.
- Koike, Toru, Yoichi Yasuda, Florian Formanek, Yasuko Nagamatsu, Ryuji HARA, Daiju Morita, Veronique Schwartz, and Anne Colonna. 2017. "The Interest of Mesoporous Fillers as Cosmetic Ingredients as Aerial Pollutant Absorbers." In , 7. Seoul.
- Krämer, Ursula, Dorothea Sugiri, Ulrich Ranft, Jean Krutmann, Andrea von Berg, Dietrich Berdel, Heidrun Behrendt, et al. 2009. "Eczema, Respiratory Allergies, and Traffic-Related Air Pollution in Birth Cohorts from Small-Town Areas." *Journal of Dermatological Science* 56 (2): 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.jderm.2009.07.014>.
- Krutmann, Jean, Wei Liu, Li Li, Xiaochuan Pan, Martha Crawford, Gabrielle Sore, and Sophie Seite. 2014. "Pollution and Skin: From Epidemiological and Mechanistic Studies to Clinical Implications." *Journal of Dermatological Science* 76 (3): 163–68. <https://doi.org/10.1016/j.jderm.2014.08.008>.
- Lagarde, J.m., C. Rouvrais, and D. Black. 2005. "Topography and Anisotropy of the Skin Surface with Ageing." *Skin Research and Technology* 11 (2): 110–19. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2005.00096.x>.
- Lai-Cheong, Joey E., and John A. McGrath. 2013. "Structure and Function of Skin, Hair and Nails." *Medicine, Dermatology Part 1 of 2*, 41 (6): 317–20. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2013.04.017>.
- Lampe, M. A., A. L. Burlingame, J. Whitney, M. L. Williams, B. E. Brown, E. Roitman, and P. M. Elias. 1983. "Human Stratum Corneum Lipids: Characterization and Regional Variations." *Journal of Lipid Research* 24 (2): 120–30.
- Langer, K. 1978. "On the Anatomy and Physiology of the Skin. I. The Cleavability of the Cutis." *British Journal of Plastic Surgery* 31: 3–8.
- Larrieu, Sophie, Agnès Lefranc, Gaëlle Gault, Edouard Chatignoux, Franck Couvy, Bernard Jouvès, and Laurent Filleul. 2009. "Are the Short-Term Effects of Air Pollution Restricted to Cardiorespiratory Diseases?" *American Journal of Epidemiology* 169 (10): 1201–8. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp032>.
- Lati, Elian. 2016. "Human living skin explant model as an alternative to animal experimentation for evaluation of cosmetic products, raw materials and finished products, activities and tolerance." presented at the The Asian Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Science, Japon, November 15.
- Launer, Philippe J., and Barry Arkles. 2013. *Infrared analysis of organosilicon compounds: spectra-structure correlations*. Gelest, Inc, Morrisville, PA. Silicon Compounds: Silanes & Silicones. Gelest. https://www.gelest.com/wp-content/uploads/5000A_Section1_InfraredAnalysis.pdf.

- Lefebvre, M.-A., D.-M. Pham, B. Boussouira, D. Bernard, C. Camus, and Q.-L. Nguyen. 2015. "Evaluation of the Impact of Urban Pollution on the Quality of Skin: A Multicentre Study in Mexico." *International Journal of Cosmetic Science* 37 (3): 329–38. <https://doi.org/10.1111/ics.12203>.
- Lefebvre, M.-A., D.-M. Pham, B. Boussouira, H. Qiu, C. Ye, X. Long, R. Chen, W. Gu, A. Laurent, and Q.-L. Nguyen. 2015. "Consequences of Urban Pollution upon Skin Status. A Controlled Study in Shanghai Area." *International Journal of Cosmetic Science*, September, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/ics.12270>.
- Ma, Qiang. 2013. "Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53: 401–26. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>.
- Manschot, J. F. M., P.F.F. Wijn, and A. J. M. Brakkee. 1982. "The Angular Distribution Function of the Elastic Fibres in the Skin as Estimated from in Vivo Measurements." In *Biomechanics: Principles and Applications*, Nijhoff-Publisher M, 411–18. http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=537343.
- Martini, Marie-Claude. 2011. *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie (3e ed.)*. Lavoisier.
- Mathes, Stephanie H., Heinz Ruffner, and Ursula Graf-Hausner. 2014. "The Use of Skin Models in Drug Development." *Advanced Drug Delivery Reviews* 69–70 (April): 81–102. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.006>.
- Mavon, A., D. Redoules, P. Agache, Y. Gall, and Ph Humbert. 1997. "Does Sebum Make Droplets before Spreading on the Skin Surface? - A Calculation of It Spreading Coefficient from Sebum/Skin Interfacial Free Energy." *Journal of Investigative Dermatology* 3 (108): 374.
- Mavon, A., D. Redoules, P. Humbert, P. Agache, and Y. Gall. 1998. "Changes in Sebum Levels and Skin Surface Free Energy Components Following Skin Surface Washing." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 10 (5): 243–50. [https://doi.org/doi:10.1016/S0927-7765\(98\)00007-1](https://doi.org/doi:10.1016/S0927-7765(98)00007-1).
- Mavon, A., H. Zahouani, D. Redoules, P. Agache, Y. Gall, and P. Humbert. 1997. "Sebum and Stratum Corneum Lipids Increase Human Skin Surface Free Energy as Determined from Contact Angle Measurements: A Study on Two Anatomical Sites." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 8: 147–55.
- Mehlman, Myron A., and Carmia Borek. 1987. "Toxicity and Biochemical Mechanisms of Ozone." *Environmental Research* 42: 36–53.
- Mendelsohn, Richard, Carol R. Flach, and David J. Moore. 2006. "Determination of Molecular Conformation and Permeation in Skin via IR Spectroscopy, Microscopy, and Imaging." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1758 (7): 923–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.04.009>.
- Merle, Chloé, Cécile Laugel, and Arlette Baillet-Guffroy. 2010. "Effect of UVA or UVB Irradiation on Cutaneous Lipids in Films or in Solution." *Photochemistry and Photobiology* 86 (3): 553–62. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00690.x>.
- Millerioux, J., C. Cruz, A. Bazire, V. Polly, G. Lallement, L. Lefeuvre, and D. Josse. 2009. "Evaluation of in Vitro Tests to Assess the Efficacy of Formulations as Topical Skin Protectants against Organophosphorus Compounds." *Toxicology in Vitro* 23 (1): 127–33. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.09.014>.
- Montenegro, Lucia, Lucia Rapisarda, Carmen Ministeri, and Giovanni Puglisi. 2015. "Effects of Lipids and Emulsifiers on the Physicochemical and Sensory Properties of Cosmetic Emulsions Containing Vitamin E." *Cosmetics* 2 (1): 35–47. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2010035>.

- Morgenstern, Verena, Anne Zutavern, Josef Cyrus, Inken Brockow, Sibylle Koletzko, Ursula Krämer, Heidrun Behrendt, et al. 2008. "Atopic Diseases, Allergic Sensitization, and Exposure to Traffic-Related Air Pollution in Children." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177 (12): 1331–37. <https://doi.org/10.1164/rccm.200701-036OC>.
- Mountfort, Katrina A., Hugo Bronstein, Nia Archer, and Sue M. Jickells. 2007. "Identification of Oxidation Products of Squalene in Solution and in Latent Fingerprints by ESI-MS and LC/APCI-MS." *Analytical Chemistry* 79 (7): 2650–57. <https://doi.org/10.1021/ac0623944>.
- Muñoz, A. M., and G. V. Civile. 1992. "The Spectrum Descriptive Analysis Method." *Manual on Descriptive Analysis Testing for Sensory Evaluation*, May. <https://doi.org/10.1520/MNL10524M>.
- Nakagawa, Kiyotaka, Daigo Ibusuki, Yoshihiro Suzuki, Shinji Yamashita, Ohki Higuchi, Shinichi Oikawa, and Teruo Miyazawa. 2007. "Ion-Trap Tandem Mass Spectrometric Analysis of Squalene Monohydroperoxide Isomers in Sunlight-Exposed Human Skin." *Journal of Lipid Research* 48 (12): 2779–87. <https://doi.org/10.1194/jlr.D700016-JLR200>.
- Nangia, Avinash, Sunita Patil, Bret Berner, Anders Boman, and Howard Maibach. 1998. "In Vitro Measurement of Transepidermal Water Loss: A Rapid Alternative to Tritiated Water Permeation for Assessing Skin Barrier Functions." *International Journal of Pharmaceutics* 170 (1): 33–40. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00137-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00137-9).
- Nazaroff, William W., and Brett C. Singer. 2004. "Inhalation of Hazardous Air Pollutants from Environmental Tobacco Smoke in US Residences." *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 14 (S1): S71–77. <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500361>.
- Nemmar, Abderrahim, Jø Holme, Rn A, Irma Rosas, Per E. Schwarze, Ernesto Alfaro-Moreno, Abderrahim Nemmar, et al. 2013. "Recent Advances in Particulate Matter and Nanoparticle Toxicology: A Review of the In Vivo and In Vitro Studies." *BioMed Research International*, *BioMed Research International* 2013, 2013 (June): e279371. <https://doi.org/10.1155/2013/279371>, [10.1155/2013/279371](https://doi.org/10.1155/2013/279371).
- Netzlaff, Frank, C. -M. Lehr, P. W. Wertz, and U. F. Schaefer. 2005. "The Human Epidermis Models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An Evaluation of Morphology and Their Suitability for Testing Phototoxicity, Irritancy, Corrosivity, and Substance Transport." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Selected papers of the 5th International Conference and Workshop on Cell Culture5th International Conference and Workshop on Cell Culture, 60 (2): 167–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>.
- OMS. 2016. "OMS | Pollution de l'air." WHO. 2016. http://www.who.int/topics/air_pollution/fr/.
- Pailler-Mattei, C., S. Nicoli, F. Pirot, R. Vargiolu, and H. Zahouani. 2009. "A New Approach to Describe the Skin Surface Physical Properties in Vivo." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68 (2): 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.10.005>.
- Pailler-Mattei, C., S. Pavan, R. Vargiolu, F. Pirot, F. Falson, and H. Zahouani. 2007. "Contribution of Stratum Corneum in Determining Bio-Tribological Properties of the Human Skin." *Wear* 263 (7–12): 1038–43. <https://doi.org/10.1016/j.wear.2007.01.128>.
- Pan, Tai-Long, Pei-Wen Wang, Ibrahim A. Aljuffali, Chi-Ting Huang, Chiang-Wen Lee, and Jia-You Fang. 2015. "The Impact of Urban Particulate Pollution on Skin Barrier Function and the Subsequent Drug Absorption." *Journal of Dermatological Science* 78 (1): 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.01.011>.

- Parente, María Emma, Adriana Gámbaro, and Gastón Ares. 2008. "Sensory Characterization of Emollients." *Journal of Sensory Studies* 23 (2): 149–61. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.2007.00136.x>.
- Parente, Maria Emma, Adriana Gambaro, and Gerardo Solana. 2005. "Study of Sensory Properties of Emollients Used in Cosmetics and Their Correlation with Physicochemical Properties." *Journal of Cosmetic Science* 56 (June): 175–82.
- Park, Eun-Mi, Young-Mee Park, and Young-Seob Gwak. 1998. "Oxidative Damage in Tissues of Rats Exposed to Cigarette Smoke." *Free Radical Biology and Medicine* 25 (1): 79–86. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00041-0).
- Pauly, Gilles. 1999. Utilisation d'au moins un extrait proteique de graines de plantes du genre moringa et composition cosmetique et/ou pharmaceutique correspondante. WO1999048512 A1, filed February 19, 1999, and issued September 30, 1999. <http://www.google.fr/patents/WO1999048512A1>.
- Pensé-Lhéritier, A.-M. 2016. "Évaluation sensorielle et produits cosmétiques." *Techniques de l'ingénieur.*, February. /base-documentaire/procedes-chimie-bio-agroth2/cosmetiques-ingredients-et-produits-42664210/evaluation-sensorielle-et-produits-cosmetiques-j2244/.
- Percoco, Giuseppe, and Florine Eudier. 2018. "Innover en cosmétique en toute sécurité - Effet de la pollution sur les propriétés de surfaces de la peau." presented at the Les Ateliers Scientifiques de la Cosmetic Valley, Le Havre, March 22.
- Peter, M., and M.D. Elias. 1983. "Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation." *Elias* 80 (6 supplement). http://www.nature.com/jid/journal/v80/n1s/pdf/jid198312a.pdf?origin=publication_detail.
- Pham, D.-M., B. Boussouira, D. Moyal, and Q.L. Nguyen. 2015. "Oxidization of Squalene, a Human Skin Lipid: A New and Reliable Marker of Environmental Pollution Studies." *International Journal of Cosmetic Science* 37 (4): 357–65. <https://doi.org/10.1111/ics.12208>.
- Pilgram, G. S. K., J. Van Der Meulen, G. S. Gooris, H. K. Koerten, and J. A. Bouwstra. 2001. "The Influence of Two Azones and Sebaceous Lipids on the Lateral Organization of Lipids Isolated from Human Stratum Corneum." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1511 (2): 244–254.
- Proksch, Ehrhardt, Johanna M. Brandner, and Jens-Michael Jensen. 2008. "The Skin: An Indispensable Barrier." *Experimental Dermatology* 17 (12): 1063–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.
- Pryor, William A., Giuseppe L. Squadrito, and Mitchell Friedman. 1995a. "A New Mechanism for the Toxicity of Ozone." *Toxicology Letters* 82/83: 287–93.
- . 1995b. "The Cascade Mechanism to Explain Ozone Toxicity: The Role of Lipid Ozonation Products." *Free Radical Biology and Medicine* 19 (6): 935–41.
- Rawlings, A. V. 2006. "Ethnic Skin Types: Are There Differences in Skin Structure and Function?1." *International Journal of Cosmetic Science* 28 (2): 79–93. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.2006.00302.x>.
- Rawlings, Anthony V., and Paul J. Matts. 2005. "Stratum Corneum Moisturization at the Molecular Level: An Update in Relation to the Dry Skin Cycle." *Journal of Investigative Dermatology* 124 (6): 1099–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1747.2005.23726.x>.
- Remache, Djamel. 2013. "Contribution à l'étude expérimentale et numérique du comportement hyperélastique et anisotrope de la peau humaine." Université de

- Franche-Comté. <http://indexation.univ-fcomte.fr/nuxeo/site/esupversions/fc632528-ec22-4bf2-bf19-2da554f8cf87>.
- Rittié, Laure, and Gary J Fisher. 2002. "UV-Light-Induced Signal Cascades and Skin Aging." *Ageing Research Reviews* 1 (4): 705–20. [https://doi.org/10.1016/S1568-1637\(02\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S1568-1637(02)00024-7).
- Robert, Pierre. 1985. *Dermopharmacologie clinique*. 1 vols. Paris: Maloine.
- Salazar-Banda, G. R., M. A. Felicetti, J. A. S. Gonçalves, J. R. Coury, and M. L. Aguiar. 2007. "Determination of the Adhesion Force between Particles and a Flat Surface, Using the Centrifuge Technique." *Powder Technology* 173 (2): 107–17. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2006.12.011>.
- Sato, Nobutaka, Atsushi Murata, Toshinori Fujie, and Shinji Takeoka. 2016. "Stretchable, Adhesive and Ultra-Conformable Elastomer Thin Films." *Soft Matter* 12 (45): 9202–9. <https://doi.org/10.1039/C6SM01242F>.
- Savary, Géraldine, Michel Grisel, and Céline Picard. 2013. "Impact of Emollients on the Spreading Properties of Cosmetic Products: A Combined Sensory and Instrumental Characterization." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 102 (February): 371–78. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.028>.
- Schäfer, T., D. Vieluf, H. Behrendt, U. Kramer, and J. Ring. 1996. "Atopic Eczema and Other Manifestations of Atopy: Results of a Study in East and West Germany." *Allergy* 51 (8): 532–39. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.1996.tb04665.x>.
- Schneider, Marc, Frank Stracke, Steffi Hansen, and Ulrich F Schaefer. 2009. "Nanoparticles and Their Interactions with the Dermal Barrier." *Dermato-Endocrinology* 1 (4): 197–206.
- Schreiner, Volker, Stephan Pfeiffer, Ghita Lanzendörfer, Horst Wenck, Walter Diembeck, Gert S. Gooris, Ehrhardt Proksch, and Joke Bouwstra. 2000. "Barrier Characteristics of Different Human Skin Types Investigated with X-Ray Diffraction, Lipid Analysis, and Electron Microscopy Imaging." *Journal of Investigative Dermatology* 114 (4): 654–660.
- Schwartz, Naomi Oshinsky. 1975. "Adaptation of the Sensory Texture Profile Method to Skin Care Products." *Journal of Texture Studies* 6 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1975.tb01116.x>.
- Semple, S., C. Garden, M. Coggins, K. S. Galea, P. Whelan, H. Cowie, A. Sánchez-Jiménez, P. S. Thorne, J. F. Hurley, and J. G. Ayres. 2011. "Contribution of Solid Fuel, Gas Combustion, or Tobacco Smoke to Indoor Air Pollutant Concentrations in Irish and Scottish Homes." *Indoor Air* 22 (3): 212–23. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0668.2011.00755.x>.
- Shen, Di, Rongjing Xu, Xinrong Lin, Jian Qiao, Ping Gong, Amélie Krief, and Florian Formanek. 2017. "Cosmetic Formulation Mimicking Lotus Leaf Surface To Protect Skin Against Solid Pollutants." In , 11. Seoul.
- Sheu, Hamm-Ming, Sheau-Chiou Chao, Tak-Wah Wong, Yu-Yun Lee, and Jui-Chen Tsai. 1999. "Human Skin Surface Lipid Film: An Ultrastructural Study and Interaction with Corneocytes and Intercellular Lipid Lamellae of the Stratum Corneum." *British Journal of Dermatology* 140 (3): 385–91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.02697.x>.
- Smeden, J. van, M. Janssens, G.S. Gooris, and J.A. Bouwstra. 2014. "The Important Role of Stratum Corneum Lipids for the Cutaneous Barrier Function." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841 (3): 295–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>.

- Sohn, Myriam, Theodor Buehler, and Georgios Imanidis. 2016. "Repartition of Oil Miscible and Water Soluble UV Filters in an Applied Sunscreen Film Determined by Confocal Raman Microspectroscopy." *Photochemical & Photobiological Sciences* 15 (7): 861–71. <https://doi.org/10.1039/C6PP00024J>.
- "Solid Surface Energy Data (SFE) for Common Polymers." 2018. Surface Tension. 2018. <http://www.surface-tension.de/solid-surface-energy.htm>.
- Song, Sanghwan, Kiyong Lee, Young-Mi Lee, Jung-Hyun Lee, Sang Il Lee, Seung-Do Yu, and Domyung Paek. 2011. "Acute Health Effects of Urban Fine and Ultrafine Particles on Children with Atopic Dermatitis." *Environmental Research* 111 (3): 394–99. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.10.010>.
- Stefaniak, Aleksandr B., Christopher J. Harvey, and Philip W. Wertz. 2010. "Formulation and Stability of a Novel Artificial Sebum under Conditions of Storage and Use." *International Journal of Cosmetic Science* 32 (5): 347–55. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00561.x>.
- Stuart, Barbara. 2005. "Infrared Spectroscopy." In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0914061810151405.a01.pub2>.
- "Tewameter® TM 300 - Courage - Khazaka Electronic, Köln." 2018. 2018. <https://www.courage-khazaka.de/index.php/en/products/scientific/139-tewameter>.
- Thiele, Jens J., Sherry N. Hsieh, Karlis Briviba, and Helmut Sies. 1999. "Protein Oxidation in Human Stratum Corneum: Susceptibility of Keratins to Oxidation In Vitro and Presence of a Keratin Oxidation Gradient In Vivo." *Journal of Investigative Dermatology* 113 (3): 335–39. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00693.x>.
- Thiele, Jens J., Maurizio Podda, and Lester Packer. 1997. "Tropospheric Ozone: An Emerging Environmental Stress to Skin." *Biological Chemistry* 378 (November): 1299–1305.
- Thiele, Jens J, Maret G Traber, Maurizio Podda, Kenneth Tsang, Carroll E Cross, and Lester Packer. 1997. "Ozone Depletes Tocopherols and Tocotrienols Topically Applied to Murine Skin." *FEBS Letters* 401 (2–3): 167–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01463-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01463-9).
- Thiele, Jens J., Maret G Traber, T. Polefka, Carroll E Cross, and Lester Packer. 1997. "Ozone-Exposure Depletes Vitamin E and Induces Lipid Peroxidation in Murine Stratum Corneum." *Journal of Investigative Dermatology* 108: 753–57.
- Thiele, Jens J, Maret G Traber, Roberta Re, Nathalie Espuno, Liang-Jun Yan, Carroll E Cross, and Lester Packer. 1998. "Macromolecular Carbonyls in Human Stratum Corneum: A Biomarker for Environmental Oxidant Exposure?" *FEBS Letters* 422 (3): 403–6. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00049-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00049-0).
- Thiele, Jens J., Maret G. Traber, Kenneth Tsang, Carroll E. Cross, and Lester Packer. 1997. "In Vivo Exposure to Ozone Depletes Vitamins C and E and Induces Lipid Peroxidation in Epidermal Layers of Murine Skin." *Free Radical Biology and Medicine* 23 (3): 385–91. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00617-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00617-X).
- Tokgoz, N.S., G. Marginean-Lazar, A. Ponte, and A.E. Fructus. 1998. "Use of Synthetic Skin for in Vitro Evaluation of Photoprotective Efficacy of Sunscreens: Application to Different Type of Emulsions." In *Proceedings of the 20th IFSCC Congress*. France.
- Ushio, Hiroko, Keiko Nohara, and Hidekazu Fujimaki. 1999. "Effect of Environmental Pollutants on the Production of Pro-Inflammatory Cytokines by Normal Human Dermal Keratinocytes." *Toxicology Letters* 105 (1): 17–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00379-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00379-8).

- Valacchi, Giuseppe, Elisa Pagnin, Tatsuya Okamoto, Ana M. Corbacho, Estibaliz Olano, Paul A. Davis, Albert van der Vliet, Lester Packer, and Carroll E. Cross. 2003. "Induction of Stress Proteins and MMP-9 by 0.8ppm of Ozone in Murine Skin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 305 (3): 741–46. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00812-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00812-X).
- Valacchi, Giuseppe, Claudia Sticozzi, Alessandra Pecorelli, Franco Cervellati, Carlo Cervellati, and Emanuela Maioli. 2012. "Cutaneous Responses to Environmental Stressors." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1271 (1): 75–81. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06724.x>.
- Valacchi, Giuseppe, Stefan U Weber, Chate Luu, Carroll E Cross, and Lester Packer. 2000. "Ozone Potentiates Vitamine E Depletion by Ultraviolet Radiation in the Murine Stratum Corneum." *FEBS Letters* 466: 165–68.
- Van Oss, C. J., M. K. Chaudhury, and R. J. Good. 1987. "Monopolar Surfaces." *Advances in Colloid and Interface Science* 28 (January): 35–64. [https://doi.org/10.1016/0001-8686\(87\)80008-8](https://doi.org/10.1016/0001-8686(87)80008-8).
- Van Oss, C. J., R. J. Good, and M. K. Chaudhury. 1988. "Additive and Nonadditive Surface Tension Components and the Interpretation of Contact Angles." *Langmuir* 4 (4): 884–91. <https://doi.org/10.1021/la00082a018>.
- Van Oss, Carel J., Manoj K. Chaudhury, and Robert J. Good. 1988. "Interfacial Lifshitz-van Der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems." *Chemical Reviews* 88 (6): 927–41. <https://doi.org/10.1021/cr00088a006>.
- Venkatraman, Subbu, and Robert Gale. 1998. "Skin Adhesives and Skin Adhesion: 1. Transdermal Drug Delivery Systems." *Biomaterials* 19 (13): 1119–36. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00020-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00020-9).
- Verdier-Sévrain, Sylvie, and Frédéric Bonté. 2007. "Skin Hydration: A Review on Its Molecular Mechanisms." *Journal of Cosmetic Dermatology* 6 (2): 75–82. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2007.00300.x>.
- Vergou, T., A. Patzelt, S. Schanzer, M.C. Meinke, H.-J. Weigmann, G. Thiede, W. Sterry, J. Lademann, and M.E. Darvin. 2013. "Methods for the Evaluation of the Protective Efficacy of Sunscreen Products." *Skin Pharmacology and Physiology* 26 (1): 30–35. <https://doi.org/10.1159/000343576>.
- Vierkötter, Andrea, and Jean Krutmann. 2012. "Environmental Influences on Skin Aging and Ethnic-Specific Manifestations." *Dermato-Endocrinology* 4 (3): 227–31. <https://doi.org/10.4161/derm.19858>.
- Vierkötter, Andrea, Jean Krutmann, and Tamara Schikowski. 2018. "Ambient Particulate Matter and Skin." In *Environment and Skin*, 105–11. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43102-4_9.
- Vierkötter, Andrea, Tamara Schikowski, Ulrich Ranft, Dorothea Sugiri, Mary Matsui, Ursula Krämer, and Jean Krutmann. 2010. "Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging." *Journal of Investigative Dermatology* 130 (12): 2719–26. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.204>.
- Wagner, Heike, Karl-Heinz Kostka, Claus-Michael Lehr, and Ulrich F. Schaefer. 2003. "PH Profiles in Human Skin: Influence of Two in Vitro Test Systems for Drug Delivery Testing." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55 (1): 57–65. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00125-X](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00125-X).
- Weber, Stefan U, Jens J. Thiele, Carroll E. Cross, and Lester Packer. 1999. "Vitamin C, Uric Acid, and Glutathione Gradients in Murine Stratum Corneum and Their Susceptibility to Ozone Exposure." *Journal of Investigative Dermatology* 113 (6). <http://ac.els-cdn.com/S0022202X15407092/1-s2.0-S0022202X15407092->

main.pdf?_tid=7e05cbd8-c4d6-11e5-8b92-00000aab0f02&acdnat=1453886302_75a8bf2a2a9e02abbe6877ddb41c039d.

- Wilhelm, Klaus-Peter, Peter Elsner, Enzo Berardesca, and Howard I. Maibach. 1996. *Bioengineering of the Skin: Skin Imaging and Analysis, Second Edition*. CRC Press.
- Wilkes, G. L., I. A. Brown, and R. H. Wildnauer. 1973. "The Biomechanical Properties of Skin." *CRC Critical Reviews in Bioengineering* 1 (4): 453–95.
- Wortel, Vincent A. L., and Johann W. Wiechers. 2000. "Skin Sensory Performance of Individual Personal Care Ingredients and Marketed Personal Care Products." *Food Quality and Preference* 11 (1): 121–27. [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(99\)00057-9](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(99)00057-9).
- Xu, F., T. J. Lu, and K. A. Seffen. 2008. "Biothermomechanical Behavior of Skin Tissue." *Acta Mechanica Sinica* 24 (1): 1–23. <https://doi.org/10.1007/s10409-007-0128-8>.
- Yin, Lei, Akimichi Morita, and Takuo Tsuji. 2000. "Alterations of Extracellular Matrix Induced by Tobacco Smoke Extract." *Archives of Dermatological Research* 292 (4): 188–194.
- . 2001. "Skin Premature Aging Induced by Tobacco Smoking: The Objective Evidence of Skin Replica Analysis." *Journal of Dermatological Science* 27 suppl 1: S26–31.

Annexes

Annexe 1. Récapitulatif des différentes études menées concernant l'effet de divers polluants sur la peau

Type d'étude	Polluant	Mécanisme	Résultats	Auteurs	Date	Journal
Etude rétrospective : 576 femmes	Cigarette		- les fumeurs présentent une diminution significative de l'hydratation de leur peau	<i>Wolf et al.</i>	1992	<i>International Journal of Cosmetic Science</i>
Etude clinique en Allemagne sur 1273 enfants âgés de 5 à 7 ans	Pollution urbaine (SO ₂ ; NO _x , poussières et PM)		- la fréquence des eczémas atopiques semble liée à la distance d'habitat par rapport à une route très fréquentée	<i>Shafer et al.</i>	1996	<i>Allergy</i>
In vivo : modèle murin	Ozone	Stress oxydatif	- diminution de la quantité de vitamine E et C dans le SC murin après exposition à l'ozone - augmentation de la peroxydation des lipides dans le SC	<i>Thiele et al.</i>	1997	<i>Free Radical Biology and Medicine</i>
In vivo : tape stripping sur modèle murin	Ozone	Stress oxydatif	- diminution de la quantité de vitamine E - augmentation de la peroxydation des lipides dans le SC	<i>Thiele et al.</i>	1997	<i>Journal of Investigative Dermatology</i>
In vitro : - tape stripping de SC humain (10 pers) In vivo : - tape stripping de SC sur modèle murin	UV	Stress oxydatif	- diminution de la quantité de vitamine E dans le SC humain et murin après exposition aux UV	<i>Thiele et al.</i>	1998	<i>The Journal of investigative dermatology</i>
In vitro : tape stripping de SC humain	Ozone et UV	Stress oxydatif	- les composés carbonylés peuvent servir de marqueurs in vivo et in vitro du stress oxydatif	<i>Thiele et al.</i>	1998	<i>FEBS Letters</i>

In vivo : 7 sujets présentant de l'eczéma atopique et 7 sujets contrôles	NO2, formaldéhyde		<ul style="list-style-type: none"> - les sujets contrôles et les patients présentent une augmentation de la PIE après exposition au NO2. - les patients avec de l'eczéma atopique ont présenté une augmentation significative de la PIE après exposition au formaldéhyde. - l'exposition des patients à l'air ambiant a diminué la PIE - les sujets contrôles ont une plus faible PIE que les sujets atteints d'eczéma atopique - la rugosité de la peau des sujets contrôles a augmenté de façon significative après exposition au NO2 (mais pas celle des patients) et n'a pas évolué après exposition au formaldéhyde 	<i>Eberleing et al.</i>	1998	<i>Journal of allergy and clinical immunology</i>
In vivo : modèle murin, tape stripping du SC	Ozone	Stress oxydatif	<ul style="list-style-type: none"> - diminution de la quantité d'antioxydants (acide urique, vitamine C, GSH). 	<i>Weber et al.</i>	1999	<i>Journal of Investigative Dermatology</i>
In vitro : fibroblastes humains de non-fumeurs, application topique	Fumée de cigarette		<ul style="list-style-type: none"> - la fumée de cigarette induit l'expression des MMP-1 et MMP-3 mais celle de TIMP-1 et TIMP-3 reste inchangée - la fumée de cigarette inhibe la formation de procollagènes I et III, et de collagène I et III à forte concentration, ce qui mène à des conditions plus favorables à la formation de rides - la surproduction de MMP risque d'endommager la matrice extra-cellulaire - après incubation avec les particules de diesel et le formaldéhyde, on observe une augmentation de la production d'IL-1β et d'IL-8. Ceci peut être lié à l'apparition d'allergique ou non-allergique eczéma 	<i>Yin et al.</i>	1999	<i>Archives of dermatological research</i>
In vitro : kératinocytes dermiques humains	Particules de diesel et formaldéhyde		<ul style="list-style-type: none"> - après incubation avec les particules de diesel et le formaldéhyde, on observe une augmentation de la production d'IL-1β et d'IL-8. Ceci peut être lié à l'apparition d'allergique ou non-allergique eczéma 	<i>Ushio et al.</i>	1999	<i>Toxicology Letters</i>
In vivo : tape stripping sur modèle murin	Ozone et UV	Stress oxydatif	<ul style="list-style-type: none"> - effet additif de l'ozone et des UV - l'effet des UV est plus important / nocif 	<i>Valacchi et al.</i>	2000	<i>FEBS Letters</i>
In vitro sur modèle Episkin®	Ozone	Stress oxydatif	<ul style="list-style-type: none"> - augmentation de la quantité de protéines carbonylées / protéines oxydées - diminution de la protection par le NAC (N- 	<i>Cotovio et al.</i>	2001	<i>Toxicology in vitro</i>

acétyl Cystéine)

Etude clinique : 63 sujets	Cigarette		<ul style="list-style-type: none">- les effets de la cigarette sur le relief cutané ont été étudié. Les sillons sont plus profonds chez les grands fumeurs, la densité de sillons est plus faible chez les grands fumeurs => signes de vieillissement accéléré	<i>Yin et al.</i>	2001	<i>Journal of Dermatological Science</i>
In vivo : modèle murin	Ozone		<ul style="list-style-type: none">- confirmation de la peroxydation des lipides par augmentation de la présence de 4HNE-protéine,- l'ozone provoque des réactions biologiques en chaîne dans les autres couches de la peau des souris murines	<i>Valacchi et al.</i>	2003	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>
Review	Cigarette		<ul style="list-style-type: none">- Diminution de la circulation cutanée => cicatrisation plus lente- vieillissement prématuré, formation de rides, définition d'une "smoker's face". Fibres d'élastine similaires à celles que l'on trouve dans l'élastose solaire- diminution de l'hydratation du SC chez les fumeurs<ul style="list-style-type: none">- source de radicaux libres- augmentation du risque d'apparition de cancers de la peau (carcinome épidermoïde cutané)- fumer augmente le risque d'apparition de psoriasis, la perte de cheveux	<i>Freiman et al.</i>	2004	<i>Journal of Cutaneous Medicine and Surgery</i>
Etude clinique (2 x 20 personnes) Exposition à l'ozone des avant-bras dans une chambre d'exposition	Ozone	Stress oxydatif	<ul style="list-style-type: none">- diminution de la quantité de vitamine E- augmentation de la peroxydation des lipides dans le SC- réduction du nombre de bactéries après exposition- pas de changement observé dans les enzymes clefs du SC, ni d'erythème ou de sécheresse	<i>He et al.</i>	2006	<i>International Journal of Cosmetic Science</i>

<p>In vitro : peau humaine complète provenant de donneur femme, application topique</p>	<p>Nanoparticules métalliques</p>	<p>pénétration</p>	<p>- les nanoparticules rigides plus petites que 10 nm, dont les dispersions aqueuses sont formées par les particules individuelles et des clusters réversibles, sont capables de pénétrer la peau à travers la matrice lipidique du SC et à travers les orifices folliculaires. Elles atteignent ainsi les couches les plus profondes du SC et le SG. Elles peuvent dans de rares cas pénétrer jusqu'à l'épiderme viable.</p>	<p><i>Baroli et al.</i></p>	<p>2007</p>	<p><i>Journal of Investigative Dermatology</i></p>
<p>Etude clinique : 5900 filles de 3 ou 6 ans</p>	<p>Pollution urbaine</p>		<p>- la quantité de NO₂ est positivement corrélée avec les symptômes d'eczéma et de dermatite atopique</p>	<p><i>Morgenstern et al.</i></p>	<p>2008</p>	<p><i>American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine</i></p>
<p>In vivo : modèle murin, application topique</p>	<p>PM provenant de cigarette</p>		<p>- la cicatrisation prend plus de temps après application particules - on observe un retard dans la ré-épithélialisation après application de particules probablement dû à la présence de substances chimiques toxiques. - les toxines présentes dans les particules inhibent la communication cellulaire, provoque une digression des collagènes de type I et III impliqués dans le phénomène de cicatrisation, retardent l'angiogénèse</p>	<p><i>Ejaz et al.</i></p>	<p>2009</p>	<p><i>Biomedical and Environmental Science</i></p>
<p>Etude clinique</p>	<p>Pollution urbaine</p>		<p>- il existe une corrélation entre le nombre de visites médicales pour des démangeaisons (et des irritations de l'œil) et la concentration en polluants (étude réalisée à Bordeaux)</p>	<p><i>Larrieu et al.</i></p>	<p>2009</p>	<p><i>American Journal of Epidemiology</i></p>

Etude clinique : plus de 1000 nouveaux nés --> 6ans	pollution de l'air liée au trafic		<ul style="list-style-type: none"> - l'exposition à la pollution liée au trafic est corrélée avec l'eczéma, même dans les zones assez peu polluées. La pollution va influencer la durée des crises d'eczéma mais pas la fréquence d'apparition 	<i>Krämer et al.</i>	2009	<i>Journal of Dermatological Science</i>
Etude in vitro sur kératinocytes humains	Ozone		<ul style="list-style-type: none"> - l'exposition à l'ozone augmente l'expression des mARN et des protéines isoformes au CYP1 - le AhR joue un rôle crucial dans l'activation des CYP1 (enzymes détoxifiantes) - l'ozone induit la phosphorylation des EGFR, pouvant induire des cancers 	<i>Afaq et al.</i>	2009	<i>Journal of Investigative Dermatology</i>
Etude clinique : 400 femmes	PM		<ul style="list-style-type: none"> - Corrélation positive entre le nombre de tâches pigmentaires / lentigines, le nombre de rides et l'exposition aux PM. 	<i>Vierkötter et al.</i>	2010	<i>Journal of Investigative Dermatology</i>
Etude clinique : 44 enfants souffrants de dermatite atopique et vivant à proximité de la pollution urbaine	PM10, PM2.5, PM1, NO2, SO2, O3		<ul style="list-style-type: none"> - corrélation positive entre la quantité d'UFP (Ultra Fine Particules) et la présence d'eczéma - corrélation entre les démangeaisons et la quantité d'UFP, probablement dues à leur pénétration au sein de la barrière cutanée. 	<i>Song et al.</i>	2011	<i>Environmental Research</i>
Review	UV Ozone Fumée de cigarette Autres polluants	Stress oxydatif	<ul style="list-style-type: none"> - UV : photo-vieillessement, cancer, détérioration de la structure et fonction des cellules, détérioration de l'ADN, mutation de gènes, suppression des fonctions immunitaires, inflammation, apoptose des kératinocytes - Fumée de cigarette : vieillissement de la peau, coloration jaunâtre de la peau, élastose, dégradation des fibres de collagène et d'élastine par augmentation des MMP (Matrix MetalloProteinase), psoriasis - O3 : diminution de la quantité de vitamines E et C, peroxydation des lipides, effets synergiques avec les UV - Les réponses au stress oxydatif sont différentes selon l'âge. 	<i>Valacchi et al.</i>	2012	<i>Annals of the New York Academy of Sciences</i>

In vivo : modèle murin	Ozone		<ul style="list-style-type: none"> - l'effet de l'ozone et de la fumée de cigarette sur l'expression des 4HNE-protéines et sur l'augmentation des composés carbonylés est accentué chez les souris âgées 	<i>Sticozzi et al.</i>	2012	<i>Journal of Dermatological Science</i>
Etude clinique : 22 patients pendant 18 mois	Pollution urbaine		<ul style="list-style-type: none"> - les symptômes de dermatite atopique sont associés à l'augmentation de la quantité de PM, de toluène et de composés volatils - un effet retard est observé après exposition <ul style="list-style-type: none"> - l'application de 1649b (Urban Dust) perturbe le SC et les TJ (Tigh Junctions) - certaines protéines reliées à la fonction barrière voient leur quantité diminuer (cytokératine, filaggrine, E-cadhérine) après application de 1649b. - peu d'influence observée après application de 1648a (Urban particules) => les PAH (Poly Aromatic Hydrocarbon), PCB (Poly Chlorinated Biphenyl) et pesticides contenu dans les PMs ont plus d'impact sur la fonction barrière de la peau que les métaux lourds. 	<i>Kim et al.</i>	2013	<i>Journal of Allergy and Clinical Immunology</i>
In vivo : application topique du polluant sur des porcs	PM (1648a et 1649b)	stress oxydatif et inflammation	<ul style="list-style-type: none"> - l'application de 1649b formulés dans du PBS augmente la PIE, diminue la viabilité cellulaire des kératinocytes et des fibroblastes, provoque l'apparition de sillons - cette étude montre que c'est plutôt la composition chimique et non pas la taille des particules qui va influencer la toxicité des PM (notamment les PAH) - augmentation de la concentration en MDH (enzyme retrouvée en quantité élevée dans la peau lors de contact avec du Ni provoquant une inflammation et une irritation cutanée) - 1649b augmente la perméation de la peau à l'acide ascorbique et à la trétinoïde. 	<i>Pan et al.</i>	2015	<i>Journal of Dermatological Science</i>

Etude clinique : 500 enfants	Phtalates		- l'exposition à certains types de phtalates est associée à la présence de dermatite atopique	<i>Beko et al.</i>	2015	<i>Environmental Research</i>
Etude clinique : 180 sujets	Pollution urbaine		- la peau des sujets vivants en zone non polluée est plus hydratée. L'érythème sur les joues est significativement différent, la quantité de vitamine E et de squalène est plus importante, la quantité d'acide lactique est plus faible. La quantité de cholestérol est équivalente. L'activité de la chymotrypsine est plus élevée, il y a moins de protéines oxydées, les valeurs d'IL-1a et d'ATP sont plus élevées. Le taux d'excrétion de sébum est plus faible, mais la quantité de sébum n'est pas significativement différente. L'évaluation clinique a montré une plus grande présence de pellicules chez les sujets vivant dans les zones non polluées - la quantité d'IL-1a trouvée plus élevée en zone non polluée est plutôt contradictoire avec d'autres études réalisées in vitro.	<i>Lefebvre et al.</i>	2015	<i>International Journal of Cosmetic Science</i>
Etude clinique : 159 sujets	Pollution urbaine		- l'utilisation de D-squams pour quantifier la sécheresse de la peau a montrée des résultats significativement différents : la desquamation est plus importante dans les zones polluées. - les autres résultats sont identiques aux précédents	<i>Lefebvre et al.</i>	2015	<i>International Journal of Cosmetic Science</i>
Etude in vitro sur RHE sur lesquels on applique une solution saline contenant les CAP	Concentrated Ambient Particles		- les PM provoquent des détériorations de la peau de façon directe (pénétration des PM parfois jusqu'au derme) mais aussi de façon indirecte via un stress oxydatif et une inflammation (NF-kB, COX ...)	<i>Magnani et al.</i>	2016	<i>Toxicological Sciences</i>
Etude sur fibroblastes primaires humains	PM10	Autophagie	- Modification de l'expression des mARN, modification de l'expression génique - Génération de plusieurs mécanismes en réponse aux	<i>Park et al.</i>	2018	<i>International Journal of Molecular Science</i>

PM10 : stress oxydatif, activation
de l'AhR et inflammation
- Autophagie

**Etude *ex vivo* (explant de
peau humaine) et *in vivo***

- L'exposition répétitive à des
particules de diesel augmente la
pigmentation de la peau et
augmente la production de
mélanine

*Grether-Beck et
al.*

2018

*Journal of
Investigative
Dermatology*

Annexe 2. Propriétés physico-chimiques et %AP des films résiduels des 11 produits étudiés

Emulsion	γ LW	γ -	γ +	γ	γ AB	%AP Pigments 2 SFS	%AP Pigments 1 SFS	%AP Pigments 1 BS
P1	21,2	87,3	0,3	32,2	11,0	20,1	33,3	54,4
P2	17,0	51,9	7,4	56,1	39,2	17,3	12,2	42,5
P3	16,6	48,1	7,2	53,9	37,3	28,6	38,6	39,4
P4	19,4	89,2	0,2	28,0	8,6	54,2	49,9	49,5
P5	19,8	50,2	7,3	58,1	38,4	29,8	16,2	37,2
P6	36,8	52,4	0,9	50,5	13,7	50,1	26,3	53,1
P7	30,2	31,5	1,5	43,8	13,6	43,9	17,5	53,8
P8	26,8	30,9	2,3	43,5	16,8	42,3	30,7	59,4
P9	18,6	56,0	1,6	37,5	18,9	32,2	31,5	26,2
P10	31,4	6,4	0,0	31,7	0,3	23,4	9,1	21,8
P11	41,1	12,7	0,3	45,0	4,0	54,6	44,4	54,5

Apport de la physico-chimie de surface dans la compréhension des interactions entre la peau et son environnement et entre la peau et les produits cosmétiques

La pollution atmosphérique ne cesse d'augmenter et ses effets sur la peau humaine, notre principale barrière face aux agressions extérieures, sont de plus en plus préoccupants. Si les études cliniques sont nombreuses et mettent en évidence un fort impact des polluants sur le vieillissement environnemental et sur l'aggravation des désordres cutanés, les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairement compris.

L'objectif de ce projet de thèse est donc d'évaluer l'impact des polluants atmosphériques sur la peau, et plus spécifiquement sur ses propriétés de surface, grâce à des approches analytiques chimiques et physico-chimiques. Différents modèles de peau ont été utilisés afin de comprendre les phénomènes mis en jeu. Un modèle de peau non-biologique a été développé, caractérisé, validé et utilisé pour mettre en évidence l'impact de polluants atmosphériques sur la physico-chimie de surface de la peau. Les résultats obtenus sur ce modèle pu être validés grâce à des analyses comparatives réalisées sur explants de peau humaine. Ces études ont permis de démontrer l'effet de polluants sur l'oxydation de surface de la peau, induisant une modification de son énergie libre de surface et une forte augmentation de son caractère basique, mais également une détérioration de sa fonction barrière.

A partir de ce constat et afin de développer des produits efficaces pour protéger la surface de la peau, des méthodes de caractérisation du film résiduel de produits cosmétiques ont été développées dans le but de comprendre comment ces produits interagissent avec la peau. Les travaux menés ont notamment permis d'établir le lien entre les propriétés physico-chimiques du film résiduel d'émulsions cosmétiques et leurs propriétés « anti-adhésion » de particules.

Mots clés : *peau – pollution – modèles de peau – physico-chimie – anti-adhésion – cosmétique*

Contribution of surface physico-chemistry to understand the interactions between the skin and its environment and between the skin and cosmetic products

Air pollution still increases and its effects on human skin, our main barrier against external aggression, are of growing concern. If clinical studies are numerous and highlight a strong impact of pollutants on environmental aging and on the aggravation of skin disorders, the mechanisms involved are not clearly identified.

The objective of this thesis is to evaluate the impact of air pollutants on the skin, more specifically on its surface properties, through chemical and physico-chemical analysis. Different skin models have been used to understand the phenomena involved. A non-biological skin model has been developed, characterized, validated and used to highlight and understand the impact of pollutants on skin surface physico-chemistry. The results obtained on this model were confirmed using human living skin explants. These studies have demonstrated the effect of pollutants on the oxidation of skin surface, inducing modifications in its free surface energy and a sharp increase of its basic character, together with an alteration of its barrier function.

From this conclusion and in order to develop efficient products to protect the skin surface, residual film of cosmetics was characterized to help understanding how these products interact with the skin. The work carried out made it possible to establish a link between the physicochemical properties of the residual film of cosmetic emulsions and their "anti-adhesion" particles properties.

Key words: *skin - pollution - skin models - physico-chemistry - anti-adhesion - cosmetics*