

*Université de Franche-Comté  
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Besançon  
Année 2007- N°25-07-05*

---

# *La sécurité et l'efficacité des produits Dermo-Cosmétiques*

*La réalité et la législation Internationale*

---

## *Thèse*

*Pour obtenir le grade de*

*Docteur de l'Université de Franche-Comté  
en Sciences de la vie et de la santé*

*Présentée et soutenue publiquement  
le 24 Octobre 2007*

*Par*

*Sawsan EL HUSSEIN*

*Née le 05 juillet 1980 (TRIPOLI- LIBAN)*

*Devant le jury*

S. MAKKI	Maître de conférences	Directeur de thèse
P. MURET	Docteur en Médecine	Co-directeur
P. HUMBERT	Professeur	Président du Jury
J.P. BELON	Professeur	Rapporteur
J.P. MARTY	Professeur	Rapporteur
O. CHAMBIN	Professeur	
M. BEURET	Médecin	
P.TREFFEL	Pharmacien	

A NOTRE JUGE ET DIRECTEUR DU LABORATOIRE

Monsieur Philippe HUMBERT

Professeur, Chef du département de Dermatologie

Directeur du Laboratoire d'Ingénierie et de Biologie Cutanées

CHU Saint Jacques,

BESANCON

Vous nous avez accueillis dans votre équipe.

Nous vous remercions pour la confiance que vous nous avez accordée.

Vous nous faites l'honneur de juger cette thèse.

Soyez assuré de notre profonde gratitude et de notre respect.

A NOTRE DIRECTEUR DE THESE

Monsieur Safwat MAKKI

Pharmacien, PhD, Dr. En Sciences, Dr. En Chimie Physique

Maître de conférences

Laboratoire de Pharmacie Galénique

Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de Franche Comté,

BESANCON

Vous nous avez fait découvrir le domaine de la recherche et la biologie,  
par votre expérience dans le domaine de l'absorption et du relief cutané.

Vous avez su nous montrer que la bonne recherche est basée  
sur une bibliographie approfondie et solide.

Je vous remercie pour le temps et la patience  
que vous m'avez accordé tout au long de ces années.



A NOTRE JUGE ET CO-DIRECTEUR

Monsieur le Docteur Patrice MURET

Médecin, Praticien Hospitalier (PH)

Maître de Conférences en Pharmacologie Clinique et Fondamentale

Service de Pharmacologie, CHU Jean Manjoz,

BESANCON

Nous vous remercions pour votre disponibilité,

votre écoute et vos qualités humaines.

Votre gentillesse et votre compétence sont un exemple.

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A NOTRE JUGE ET RAPPORTEUR

Monsieur Jean-Paul BELON

Professeur de Pharmacologie

U.F.R Pharmacie, Université de Bourgogne,

DIJON

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère  
reconnaissance.

A NOTRE JUGE ET RAPPORTEUR

Madame Christine LAFFORGUE p/o J.P. MARTY

Maître de conférences,

Université Paris-Sud 11

Faculté de Pharmacie de Chatney Malabry

Vous nous faites l'honneur d'être notre juge.

Veillez trouver ici toute notre estime et notre respectueuse considération.

A NOTRE JUGE

Madame Odile CHAMBIN

Professeur, Laboratoire de Pharmacie Galénique

Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne,

DIJON

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.

Qu'il nous soit permis de vous exprimer toute notre gratitude et notre  
considération.

A NOTRE JUGE

Madame le Docteur Monique BEURET

Médecin, Etablissement Français de Sang,

BESANCON

Vous nous faites l'immense honneur de juger ce travail.

Votre gentillesse et votre sympathie sont un exemple.

Soyez assuré de notre profond respect.

A NOTRE JUGE

Monsieur Pierre TREFFEL

Pharmacien, Docteur en Pharmacie, Docteur en Sciences

Président et Directeur Générale (PDG) des Laboratoires Spirig

NANCY

Vous nous faites l'honneur de juger ce travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre gratitude et nos remerciements.

Je tiens à remercier vivement :

Monsieur le Professeur KANTELIP, Monsieur Michel BERARD et tout le personnel du service de Pharmacologie Clinique, qui m'ont permis de travailler en collaboration avec ce service.

Le personnel et les doctorants de LIBC à Saint Jacques et à Ambroise Paré.

Le personnel du laboratoire de Pharmacie Galénique Yann, Brice et Anothai pour les moments inoubliables que nous avons passé ensemble

Youssef LBOUTOUN, nos longues discussions, m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Latifa LEBDIRA, pour ta bonne humeur et ta sympathie

Hassan LBOUTOUN et Ahmad ELKHAYAT, qui ont su me soutenir durant toutes ces années

Mme Isabel BUREY, pour ces corrections et ses conseils précieux pour la présentation de ce travail

Dr Ashraf ALJOUNAIDI, avec qui j'ai passé mes meilleurs moments à Besançon

A tous les étudiants Libanais à Besançon

Je dédie mon travail à

A mes PARENTS,

Pour leur affection, leur aide et leur soutien tout au long de mes études.

Qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond amour,

Et l'aboutissement de leurs sacrifices et de leurs espoirs.

A mes frères, MOSTAPHA et MAHMOUD,

A mes sœurs ABIR et SIBA,

Ce n'était pas facile pour moi de vivre loin d'eux

A mon pays bien aimé le LIBAN,

Malgré tout les problèmes politiques,

Il sera toujours, à mes yeux, le plus beau pays au monde

---

# SOMMAIRE

---

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	<b>3</b>
<b>PREFACE ET OBJECTIF DE LA THESE</b>	<b>4</b>
<b>PARTIE 1 : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>9</b>
1.1. Historique et législation des produits cosmétiques	10
1.2. La peau humaine	19
1.3. Techniques de quantification du microrelief cutané	31
1.3. L’Absorption cutanée et les méthodes de détermination du passage cutané de molécules utilisées dans les produits dermo- cosmétiques (PDC)	51
1.4. Les parabènes	68
<b>PARTIE 2 : TRAVAUX PERSONNELS</b>	<b>83</b>
Introduction	84
2.1. Comparaison des techniques de quantification du relief cutané	86
2.2. Contrôle du passage cutané des parabènes utilisés dans les PDC	100
2.2.1. Détermination de la polarité des parabènes	102
2.2.2. Evaluation du passage cutané des principaux parabènes utilisés dans les PDC (Etude <i>ex vivo</i> )	106
2.2.3. Conditions optimales pour une meilleure évaluation du passage cutané des molécules cosmétiques	116
2.3. Discussion générale : la réalité de l’utilisation des PDC et la législation internationale	123
2.3.1. Une efficacité à confirmer pour les PDC	125
2.3.2. La sécurité est indispensable pour les PDC	128
2.3.3. Conclusion générale	138
<b>ANNEXES</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>188</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>230</b>

---

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
BP	Butyl parabène
BSA	Bovine serum albumine
CCD	Charge Couple Device
CLSM	Confocal light scanning microscopy
COLIPA	The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association
CP	Coefficient de partage
CT&P market	Cosmetic and Toiletry and Perfumery market
D	Directive (Une Directive est un texte qui lie tout état membre au résultat à atteindre mais qui laisse aux autorités nationales le choix quant à la forme et au moyen pour y parvenir, d'où la nécessité d'une transposition nationale du texte.)
EEC	European Economic Community
FDA	Food and Drug administration
FD&CAct	Food, Drug and Cosmetic act
EP	Ethyl parabène
G1	Premier groupe d'expérimentations
G2	Deuxième groupe d'expérimentations
HPLC	High performance liquid chromatography
JDE	Jonction dermo-épidermique
Kp	Coefficient de perméabilité
Log <sub>10</sub> CP	Polarité
MEB	Microscope électrique à balayage
MO	Microscope optique
MP	Méthyle parabène
NMF	Natural Moisturizing Factor
OTC	Over The Counter
PDC	Produits dermo-cosmétiques
PHBA	p-hydroxybenzoïc acid
PP	Propyl parabène
SC	Stratum Corneum
TP	Temps de Prélèvement

*Préface et  
Objectif de la thèse*

---

# PREFACE

---

Etre belle ou beau, rester jeune, font partie de façon importante de nos préoccupations quotidiennes. Chez les femmes, l'art de se peindre le visage et le corps a été pratiqué, sans doute, depuis des siècles. Dans notre civilisation, l'usage de produits dermo-cosmétiques (PDC) est un besoin quotidien indispensable. La plupart des personnes, surtout les femmes, sont des consommateurs actifs des PDC en raison du culte de l'apparence physique et de la civilisation du " LOOK ".

Durant une journée, l'homme et la femme " modernes " appliquent différentes formes de PDC. En utilisant les dentifrices, les shampoings, les antiperspirants, les crèmes hydratantes...etc., une personne met en contact avec sa peau un grand nombre de composés chimiques.

## **Une psychologie de l'apparence**

Les cosmétiques ne donnent pas uniquement une harmonie à notre visage et à notre corps : ils nous offrent aussi une plus grande confiance en soi. On peut plus difficilement être bien dans sa peau lorsqu'on est pâle et mal coiffé. Une bonne apparence a des conséquences bénéfiques sur une personne. En pathologie, les peaux âgées, les cicatrices, entraînent une perte de l'estime de soi et une perception négative de sa propre personnalité. Des études ont montré qu'une femme moyennement attirante sera perçue de façon plus positive, à la fois par les hommes et par les femmes, lorsqu'elle bénéficie de soins de coiffure et de maquillage par des professionnels (GRAHAM et JOUHAR, 1983 [94]). Un nouveau domaine scientifique est apparu : « La psychologie des cosmétiques. Plusieurs études ont démontré les avantages psychologiques du traitement par cosmétiques sur différents groupes de personnes ayant des problèmes psychiques et même physiques (GRAHAM et KLIGMAN, 1984 [95]).

## **La limite de sécurité et d'efficacité de cosmétiques**

Utilisés par toute la population, hommes, femmes et même enfants, les PDC ne doivent normalement pas poser de problèmes pour la santé humaine. L'union européenne a réglementé la production et la diffusion (mise sur le marché) des médicaments et des produits cosmétiques. La législation des médicaments (étant plus rigoureuse que celle des produits cosmétiques) exige plusieurs sortes d'études de doses, de quantités utilisées, de toxicité, de cancérogenèse et d'allergies...etc. à court et à long terme. D'autre part, les informations de

sécurité d'une substance cosmétique, qu'elle soit nouvelle ou ancienne, relèvent de la responsabilité des fabricants eux-mêmes (BERGFELD et coll., 2005 [19]). Bergfeld et coll. ont réalisé en 2005 une étude sur la distribution des substances utilisées dans les formulations cosmétiques, avec une revue générale sur l'évaluation de leur sécurité sur l'être humain. (Tableau 1)

Caractéristiques des substances	Quantité de substances	Distribution
Substances sûres sans danger	683	57.2%
Substances utilisées avec restrictions	388	32.5%
Substances dangereuses	114	9.5%
Substances avec des informations insuffisantes	9	0.8%

**Tableau 1** : Résultats d'une étude sur le pourcentage de la sécurité des substances utilisées en cosmétologie (BERGFELD et coll., 2005 [19]).

La liste des effets indésirables provoqués par les produits cosmétiques ne cessent d'augmenter. Sont évoqués des risques d'allergie, de phototoxicité, de toxicité et même de cancers déclenchés par l'utilisation de telle ou telle substance. Le Tableau 2 nous donne un aperçu de quelques études qui ont montré le risque de certaines substances souvent utilisées en cosmétologie.

Substances	Action	Etudes
Sodium Lauryl Sulfate	Irritation de la peau	PATIL et coll., 1995 [195]
Aluminium	Risque de maladie d'Alzheimer	EXLEY, 1998 [80]
Diéthanolamine	Irritation de la peau	MARTY et coll., 1999 [164]
Parabènes	Spermatotoxicité	OISHI, 2001 [189]
Diéthanolamine	Effet cancérogène	NEWBERNE, 2002 [183]
Parabènes	Cancer du sein	DARBRE, 2004 [57]
Colorant de cheveux	Hématolymphopoiétique maligne	MILIGI et coll., 2005 [173]
Méthyle parabène	Kératinotoxicité	HANDA et coll., 2006 [100]
Colorants capillaires	Lymphomes, cancers	DE SANJOSE et coll., 2007 [63]

**Tableau 2** : Les effets indésirables de certaines molécules utilisées dans les produits cosmétiques

---

## OBJECTIF DE LA THESE

---

Les produits cosmétiques sont des préparations galéniques composées de plusieurs substances chimiques, appliquées souvent et pour de longues périodes sur la peau sans provoquer de nuisances. Le marché international englobe un très grand nombre de PDC, dont nous ne sommes pas même sûrs de l'efficacité. D'autre part, plusieurs études accusent certaines molécules cosmétiques d'effets indésirables, ce qui perturbe de plus en plus les consommateurs.

Le but de notre travail de thèse est de contribuer au contrôle de l'efficacité des PDC, et d'assurer la protection des consommateurs contre les risques de toxicité chronique.

Ce travail est divisé en trois parties :

**Partie [1]** : Une étude de comparaison entre différents procédés de quantification du microrelief cutané (*in vitro* et *in vivo*) :

A l'heure actuelle, plusieurs méthodes de quantification du relief cutané sont utilisées. Qu'elles soient mécaniques ou optiques, *in vitro* ou bien *in vivo*, ces techniques sont utilisées pour tester l'efficacité des produits topiques. Mais les résultats de ces méthodes sont-ils comparables ? Aurons-nous les mêmes résultats si nous quantifions une même surface cutanée par différents types de techniques ?

Le but de cette étude est de comparer les résultats de ces méthodes lors de l'évaluation de l'efficacité des PDC afin de choisir la technique la plus fiable.

**Partie [2]** : Des études pour évaluer le passage cutané d'une molécule suspecte utilisée en cosmétique, et présentée dans une formulation galénique commercialisée. Nous avons choisie une famille de molécules (les PARABENES) qui, depuis 2002, fait polémique entre les chercheurs et l'industrie cosmétique:

**[2.1]** - Dans un premier temps, nous avons déterminé la solubilité et la polarité de chaque parabène utilisé durant nos expériences.

**[2.2]** - Puis, nous avons quantifié le passage de ces molécules à travers les couches épiderme-derme.

Cette étude est divisée en deux groupes d'expérimentations :

- a. Groupe 1 : nous avons réalisé une seule application de PDC sur la peau, pour étudier l'influence de la polarité de ces molécules sur le passage cutané.
- b. Groupe 2 : trois dépôts du même PDC à différentes périodes sont appliqués, pour étudier l'influence de plusieurs applications du PDC sur le passage cutané des parabènes. Cette étude donnera une meilleure détermination de la quantité de parabènes qui peuvent traverser la peau lors d'une application fréquente d'un produit contenant ces molécules.

**[2.3]** - Enfin, nous avons réalisé une étude du passage cutané des parabènes en tenant compte des conditions optimales pour avoir des résultats proches des études *in vivo*.

**Partie [3]** : Nous voulons établir une comparaison entre les législations européennes internationales des PDC et l'état réel de leurs utilisations en ce qui concerne la sécurité et l'efficacité. Malgré que la législation des cosmétiques soit stricte sur la sécurité, plusieurs recherches publiées au niveau international dénoncent la toxicité de certaines molécules utilisées en cosmétiques.

Dans notre travail, la partie microrelief et contrôle d'efficacité est toujours présentée avant la partie absorption car le consommateur apprécie et choisit ses produits en fonction de l'amélioration de la surface de sa peau, facilement détectable à l'œil nu. C'est un effet rapide qui apparaît en quelques jours, voire quelques semaines ; en revanche, le passage des molécules susceptibles de traverser la peau et leur accumulation se font sur une période très longue, souvent des années.

*Partie 1*  
*Rappel bibliographique*

## *1.1. Historique et législations européenne et internationale des produits cosmétiques*

---

# 1.1. HISTORIQUE ET LEGISLATION DES PRODUITS COSMETIQUES

---

## **Sommaire**

1.1.1. Historique des produits cosmétiques.....	23
1.1.2. La Législation des Produits cosmétiques .....	24
1.1.2.1. Définition d'un produit cosmétique .....	24
1.1.2.2. Innocuité des cosmétiques.....	24
1.1.2.3. Liste des produits considérés comme produits cosmétiques.....	25
1.1.2.4. Réglementations des médicaments et des produits frontières.....	26
1.1.2.4.1. Les médicaments .....	26
1.1.2.4.2. Les produits frontières.....	27
1.1.2.5. Efficacité et législation.....	29

### **1.1.1. Historique des produits cosmétiques**

(READER'S DIGEST, 1982 [206] ; BEN YTSHAK, 2000 [18]; STIENS, 2001 [246])

L'étymologie du mot « cosmétique » est dérivée d'un ancien mot grecque « Commotique » qui signifie « Ce qui est de l'ordre du COSMOS, de l'univers cosmétique ». Il contient le mot « cosmos », car il s'agit d'un ordre, d'une harmonie, d'une mesure de l'univers. Ainsi la cosmétique qui donne son harmonie au visage serait l'image de l'harmonie du cosmos.

Les cosmétiques sont presque aussi anciens que l'homme. Les hommes préhistoriques pratiquaient probablement la peinture corporelle. Trois mille ans avant Jésus Christ, les égyptiens connaissaient déjà les pommades et les huiles parfumées, le maquillage et le dentifrice. Les caravanes qui acheminaient les épices et la soie en Europe, introduisaient les cosmétiques en Grèce et dans l'Empire Romain.

Au Ier siècle, Néron et Poppée éclaircissaient leur peau avec de la céruse (carbonate de plomb) et de la craie, soulignaient leurs yeux au Khôl et rehaussaient leur teint et leur lèvres avec du rouge.

C'est au retour des croisés que le maquillage s'est répandu en Europe du Nord. A partir du XIIIe siècle, les nobles appliquaient de la crème, du fond de teint, des teintures à cheveux et des parfums et dès le XVIIe siècle, les cosmétiques sont utilisés dans toutes les classes sociales.

Tout au long de l'histoire, les cosmétiques employés dépendaient de périodes, de modes et de matières premières disponibles. D'autres formulations comme le « cold cream » de Galilée sont encore utilisées aujourd'hui. Certains produits pouvaient même être dangereux pour la santé (jusqu'au début du XIXe siècle, les cosmétiques contenaient du plomb).

A partir du XIXe siècle, les découvertes et l'industrialisation ont changé le visage de la cosmétologie : parfums de synthèse, dérivés pétroliers, tensioactifs synthétiques et stabilisateurs d'émulsion. Ces nouveaux ingrédients ainsi que des formulations complexes réalisées par des chercheurs caractérisent la cosmétique moderne.

## 1.1.2. La Législation des produits cosmétiques

Dès les années 1970, la cosmétique a connu son premier texte réglementaire européen, axé sur le modèle français. Sous l'impulsion de la Commission européenne de Bruxelles, cette réglementation cosmétique européenne n'a cessé d'évoluer, de se préciser et de se complexifier d'année en année.

### 1.1.2.1. Définition d'un produit cosmétique

(France : Art. L.5131-1 du code de la santé publique) (Europe : D76/768 /CCE [2])

On entend par produit cosmétique toute substance (ou préparation) destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain, notamment l'épiderme, les systèmes pileux et capillaire, les ongles, les lèvres et les organes génitaux externes, ou avec les dents et les muqueuses buccales, en vue, exclusivement ou principalement, de les parfumer, d'en modifier l'aspect, de les protéger, de les maintenir en bon état ou de corriger les odeurs corporelles.

### 1.1.2.2. Innocuité des cosmétiques

(Art. L.5131-4 du code de la santé publique, DAHINGER-BROOMER, 1996 [52] ; COSMETLEX, 1999 [49])

Le produit cosmétique mis sur le marché ne doit pas nuire à la santé humaine lorsqu'il est appliqué dans les conditions normales ou raisonnablement prévisibles d'utilisation, compte tenu notamment de la présentation du produit, des mentions portées sur l'étiquetage ainsi que de toutes autres informations destinées aux consommateurs.

*Selon la Directive Européenne l'usage dans un produit cosmétique, ou d'un ingrédient, est permis dans la mesure où :* (DAHINGER-BROOMER, 1996 [52])

- *La substance n'est pas inscrite à l'annexe II de la Directive cosmétique.*
- *La substance ne relève pas d'une inscription sur une liste positive.*
- *Le produit fini n'est pas susceptible de nuire à la santé.*
- *Le produit n'est pas destiné à prévenir une maladie.*

C'est donc d'abord par rapport à une absence de danger dans le produit cosmétique (utilisé dans les conditions normales ou prévisibles d'emploi) que l'ingrédient est introduit dans la composition du produit.

### **1.1.2.3. Liste des catégories de produits cosmétiques**

L'arrêté R.5263 du 30 juin 2000 du *code de la santé publique* a fixé la liste des catégories des produits cosmétiques. C'est la même liste décrite par *l'annexe I de la Directive Européenne* des produits cosmétiques. Cette loi est destinée à servir d'orientation pour le classement d'un produit dans la catégorie des cosmétiques et contribue à délimiter ainsi le champ d'application cosmétique. Est considéré comme produit cosmétique, tout produit répondant aux objectifs de beauté et bien-être tels que :

- Crèmes, émulsions, lotions, gels et huiles pour la peau (mains, visage et pieds notamment).
- Masques de beauté, à l'exclusion des produits d'abrasion superficielle de la peau par voie chimique.
- Fonds de teint (liquides, pâtes, poudres).
- Poudres pour maquillage, poudres à appliquer après le bain, poudres pour hygiène corporelle et autres poudres.
- Savons de toilette, savons déodorants, et autres savons.
- Parfums, eau de toilette, eau de Cologne.
- Préparations pour le bain et la douche (sels, mousses, huiles, gel et autres préparations).
- Crèmes dépilatoires.
- Déodorants et antisudoraux.
- Produits de soins capillaires.
- Teintures capillaires et décolorants.
- Produits pour l'ondulation, le défrisage, et la fixation.
- Produits de mise en plis.
- Produits de nettoyage (lotions, poudres, shampooings).
- Produits d'entretien pour la chevelure (lotions, crèmes, huiles).
- Produits de coiffage (lotions, laques, brillantines).
- Produits pour le rasage (savons, mousses, lotions, et autres produits).
- Produits de maquillage et de démaquillage du visage et des yeux.
- Produits destinés à être appliqués sur les lèvres.

- Produits pour soins dentaires et buccaux.
- Produits pour les soins et le maquillage des ongles.
- Produits pour les soins intimes externes.
- Produits solaires.
- Produits de bronzage sans soleil.
- Produits permettant de blanchir la peau.
- Produits anti-rides.

#### **1.1.2.4. Réglementations des médicaments et des produits frontières**

La réglementation européenne a défini le cadre du cosmétique en fixant d'abord la définition du médicament puis celle du cosmétique (VIGAN; 2004 [260]).

##### **1.1.2.4.1. Les médicaments**

(France : Art. L.5111-1 du code de la santé publique 2007)

*« On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique ; Sont notamment considérés comme des médicaments les produits diététiques qui renferment dans leur composition des substances chimiques ou biologiques ne constituant pas elles-mêmes des aliments, mais dont la présence confère à ces produits, soit des propriétés spéciales recherchées en thérapeutique diététique, soit des propriétés de repas d'épreuve. Les produits utilisés pour la désinfection des locaux et pour la prothèse dentaire ne sont pas considérés comme des médicaments. Lorsque, eu égard à l'ensemble de ses caractéristiques, un produit est susceptible de répondre à la fois à la définition du médicament prévue au premier alinéa et à celle d'autres catégories de produits régies par le droit communautaire ou national, il est, en cas de doute, considéré comme un médicament. »*

#### **1.1.2.4.2. Les produits de frontière.**

(ROQUILLY, 1991 [210]; DOC-BIOCIDES, 2003 [67] ; CONSEIL DE L'EUROPE, 2004 [44])

La définition du « médicament » donné par le « code de la santé publique » génère une difficulté à différencier clairement « Produit Cosmétique » et « Médicament ».

La loi N°71-1111 du 31 Décembre 1971 avait modifié par la suite l'article L.511 du Code de la Santé Publique afin de rendre plus libéral le statut des produits cosmétiques ayant une action médicamenteuse. Ceux-ci pouvaient être rassemblés en 2 catégories :

- Les produits présentés comme possédant des propriétés curatives ou préventives d'une maladie (les produits contenant une substance ayant une action thérapeutique).
- Les produits renfermant une ou plusieurs substances vénéneuses au-delà d'une dose déterminée par arrêté.

La directive D 76/768/C.E.E. du 27 Juillet 1976 relative aux produits cosmétiques définit en son article 1er le produit cosmétique. L'alinéa second de l'article 1er de la directive du conseil précise que «sont considérés comme produits cosmétiques notamment, les produits figurant à l'annexe I ».

Il est clair que la liste donnée par l'annexe I (par catégorie de produit cosmétique) est indicative. Dans l'article 1er, alinéa 3, sont exclus du champ d'application de la directive les cosmétiques contenant certaines substances (annexe V de la directive) ainsi que ceux contenant certains colorants et qui ne sont pas destinés à entrer en contact avec les muqueuses (les colorants concernés sont ceux qui ne sont pas mentionnés aux annexes III et IV de la directive).

Ces définitions étant présentées, il convient maintenant de s'interroger sur la frontière parfois délicate à fixer entre médicaments et cosmétiques. Pour déterminer quels sont les produits pouvant être définis comme des médicaments, il s'agit de se référer à l'article L.511 du Code de la Santé Publique (ROQUILLIY, 1991 [210]). Les produits cosmétiques rentrant dans l'une de ces deux catégories (médicaments ou cosmétiques) peuvent être considérés comme des médicaments par composition.

Une interprétation extensive de la notion de « maladie humaine » conduit à conférer à de nombreux cosmétiques la qualité de médicaments dans la mesure où ils ont une action thérapeutique. La qualification de médicament par composition peut être également déduite de l'usage médical fait de ces cosmétiques (ROQUILLIY, 1991 [210]):

- *L'existence de produits similaires ayant bénéficié d'une autorisation de mise sur le marché.*
- *La prescription médicale de ces produits.*
- *Leur inscription à la pharmacopée.*

L'alinéa 2 de l'article L.511 du Code de la Santé Publique vise également les cosmétiques contenant des substances vénéneuses à des doses et concentrations supérieures à celles fixées par la liste prévue à l'article L.658-5 du Code de la Santé Publique. Sont également concernés les cosmétiques contenant des substances vénéneuses ne figurant pas sur cette même liste. Ces cosmétiques observés doivent être considérés comme des médicaments et par là même, tombent dans le monopole de distribution dont bénéficie le pharmacien d'officine.

Pour déterminer les autres cosmétiques susceptibles d'être considérés comme des médicaments, il convient alors de se référer à l'alinéa 1er de l'article L.511 du Code de la Santé Publique. Par la forme de sa « présentation », les cosmétiques ayant des propriétés thérapeutiques prennent un caractère pharmaceutique, quel que soit leur usage. Peu importe que la qualité de ce médicament soit expressément indiquée ou non, la jurisprudence affirme la qualification de médicament pour un cosmétique, lorsque celui-ci est présenté de façon explicite (soit sur l'emballage, soit sur une notice, soit sur le produit lui-même). Elle a également parfois donné la qualité de médicament à des produits n'étant pas présentés explicitement comme ayant une action thérapeutique. Il en est ainsi lorsqu'est mentionné un dosage ou une posologie pouvant donner au produit l'aspect d'un médicament, ou quand il est indiqué que le produit a été fabriqué en laboratoire sous contrôle d'un pharmacien et qu'il est fait état de termes exclusivement médicaux. La qualification de médicament par présentation pour un cosmétique a également été déduite de la marque lorsqu'elle contient le radical « pharma ». Enfin, il faut signaler que les juridictions françaises ont parfois estimé que la simple présentation du produit sous forme de gélules ou de comprimés suffisait à lui conférer la qualité de médicament. La jurisprudence avait donc tendance à appliquer la notion de médicament par présentation de façon extensive.

D'une façon générale, la qualification législative d'un produit est basée sur trois critères :

- par présentation : capsules, gélules, sirops...etc.

- par composition : contenant des substances vénéneuses à des doses et concentrations supérieures à celles fixées par l'article L.658-5 du C.S.P.
- par action : ayant une action thérapeutique, de restauration, de correction, de modification des fonctions organiques du corps humain.

En février 2007, la législation a mis fin aux « produits frontières ». L'article L. 5111-1 du Code de la santé publique a actualisé la définition le médicament et il a pris en compte les nouvelles thérapies, comme les thérapies géniques ou cellulaires qui ne sont pas administrées. Dans le même temps, l'ambiguïté de certains produits, baptisés « produits frontières », est écartée. En cas de doute, ces produits seront considérés comme des médicaments. « L'objectif était double : renforcer la sécurité juridique du dispositif actuel, mais surtout garantir un niveau élevé de protection des consommateurs, en faisant prévaloir la réglementation pharmaceutique, naturellement plus contraignante que celle applicable à d'autres catégories de produits » soulignait la députée Cécile Gallez dans son rapport devant l'Assemblée nationale (LNP, 2007[III]).

### **1.1.2.5. Efficacité et législation**

Le fabricant est lui seul responsable de l'efficacité de son produit. Aucune loi n'exige une preuve d'efficacité d'un PDC, sauf si cette preuve est revendiquée (à l'exception des filtres solaires qui doivent être conformes à la réglementation en vigueur - Art 1 of D 76/768/EEC- Version Août 2006 – Annexe VII).

## *1. 2. La Peau Humaine*

---

## 1.2. LA PEAU HUMAINE

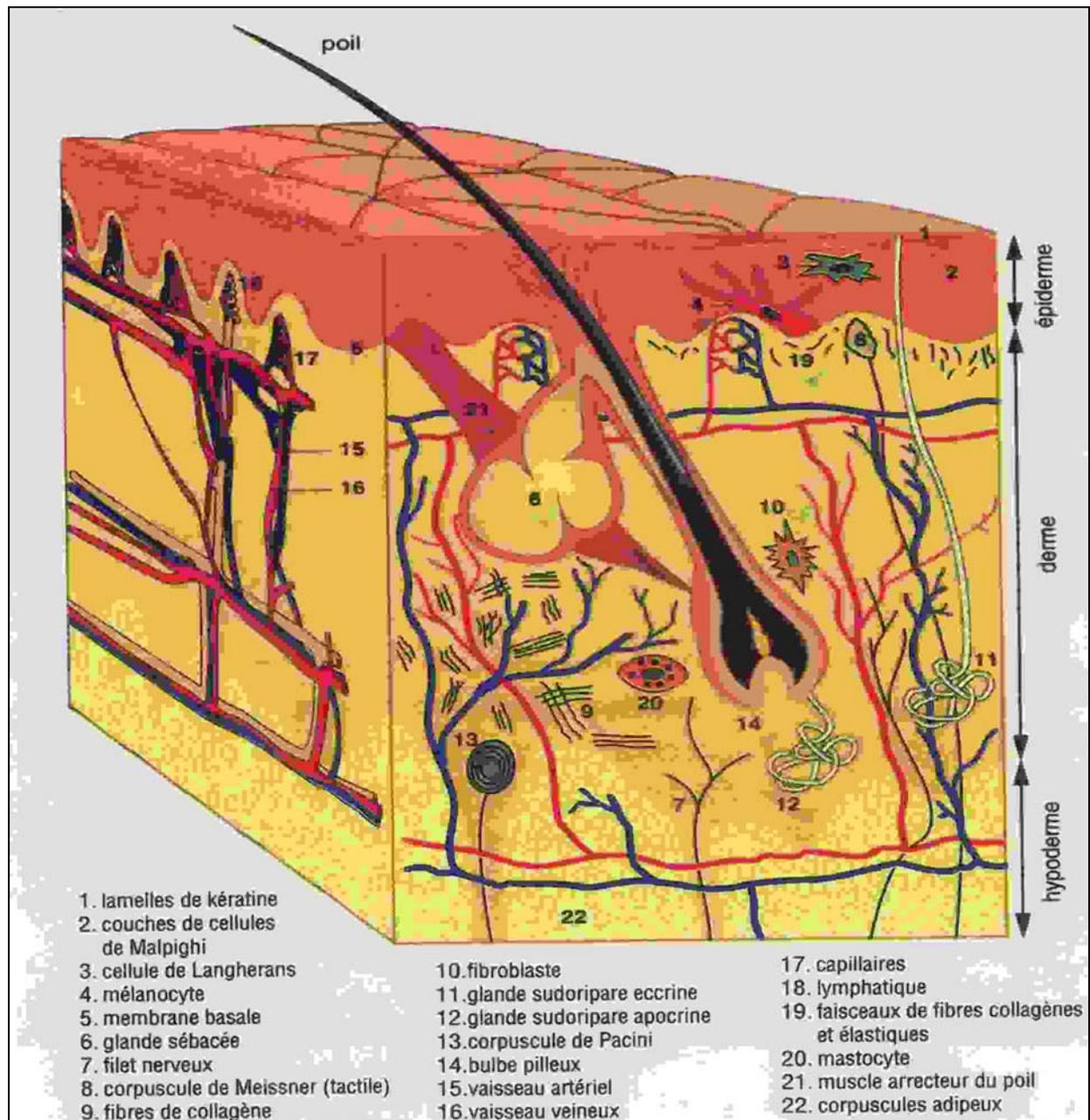
---

### **Sommaire**

1.2.1. Structure de la peau humaine .....	32
1.2.1.1. L'épiderme .....	33
1.2.1.1. Microrelief cutané .....	35
1.2.1.3. La Jonction Dermo-Epidermique .....	36
1.2.1.4. Le derme.....	36
1.2.1.5. Hypoderme ou tissu sous-cutané.....	37
1.2.1.6. Les annexes de la peau humaine .....	37
1.2.1.6.1. Système pilo-sébacé .....	37
1.2.1.6.2. Glandes sudorales.....	39
1.2.2. Quelques fonctions essentielles de la peau humaine.....	40

### 1.2.1. Structure de la peau humaine

Les cosmétiques sont destinés à être mis en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain [2], notamment la peau et ses annexes. La peau humaine est un organe constitué de trois couches essentielles superposées et distinctes ayant chacune des caractères bien définis et de ce fait, des fonctions particulières. Ces trois couches sont : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).



**Figure 1 :** Schéma de la peau présentant ses constituants essentiels (CESARINI ,1990 [36]).

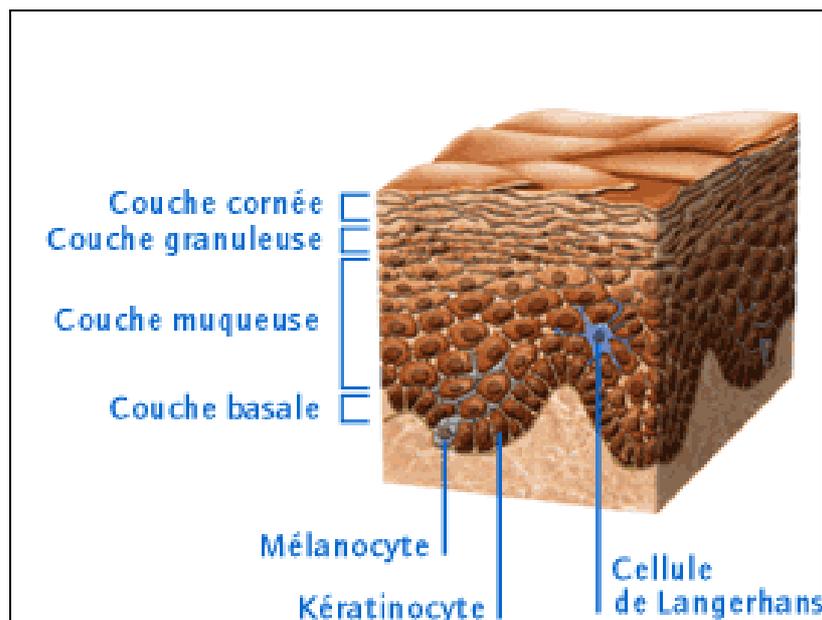
### 1.2.1.1. L'épiderme

(BEURY et Coll., 1980 [22] ; AGACHE et Coll., 1981 [5]; BARRY, 1983 [] ; ODLAND, 1984 [188] ; CESARINI, 1990 [36]; SARRET et Coll., 1994 [223] ; HELLER et PROST, 1994 [107]; MELSKI, 1996 [170] ; AGACHE et Coll., 2000 [6] ; NOLY et SCHMITT, 2004 [187])

L'épiderme est un épithélium stratifié, de 0,4 à 1 mm d'épaisseur environ, selon la localisation, reposant sur un tissu fibrillaire qui constitue le derme. Il est composé de plusieurs assises de cellules, qui vivent en un constant équilibre dynamique.

L'épiderme est constitué de quatre, parfois cinq couches cellulaires (Figure 2) représentant le caractère stratifié de l'épiderme. On distingue de la surface à la jonction dermo-épidermique :

- La couche cornée ou Stratum Corneum (SC)
- La couche claire (elle n'existe qu'au niveau de la peau épaisse comme les paumes des mains et les plantes des pieds)
- La couche granuleuse
- La couche du corps muqueux de Malpighi
- La couche basale ou couche germinative



**Figure 2** : Structure de l'épiderme (d'après CESARINI, 1990 [36])

L'épiderme est composé de cellules appelées kératinocytes, qui fabriquent une protéine, la « kératine », constituant essentiel des squames, des poils et des cheveux. Ces kératinocytes deviennent en permanence des cellules mortes, les cornéocytes, qui constituent la couche la plus externe de l'épiderme. Au sein de l'épiderme existe un petit nombre de cellules spécialisées dans la défense immunitaire : les cellules de Langerhans, ou dans la défense contre les agressions de la lumière solaire : les mélanocytes. Le quatrième type de cellules est représenté par les cellules de Merkel qui sont d'origine nerveuse et jouent un rôle de récepteur sensoriel du toucher.

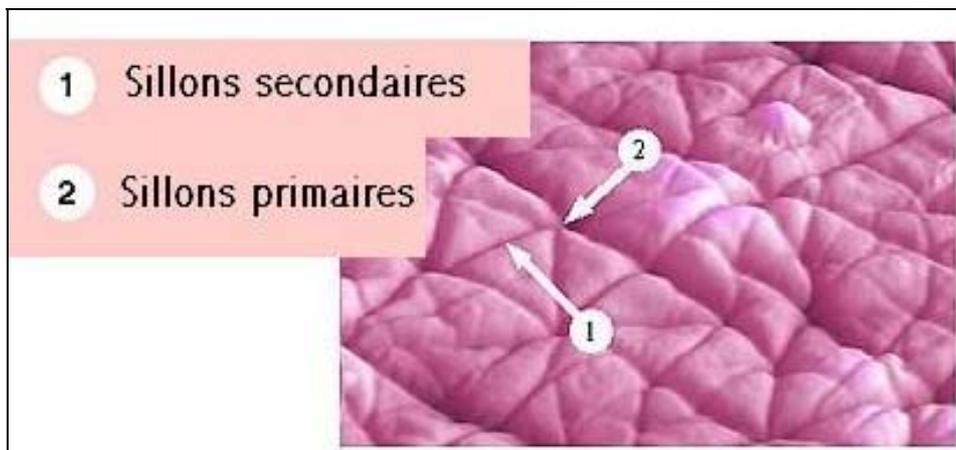
L'architecture entière de l'épiderme constitue un système dynamique dans lequel les cellules se différencient continuellement lors de leur migration de la couche basale jusqu'à la surface où elles desquament. L'épiderme par sa couche superficielle assure une fonction de protection vis-à-vis des agressions extérieures, une régulation thermique par la transpiration, ainsi qu'un rôle d'imperméabilisation de la surface corporelle. De plus, il a une fonction essentielle qui consiste à limiter la perte insensible en eau et le dessèchement. Il aide à assurer une protection physiologique contre les agressions physiques comme celle du soleil (les mélanocytes). Le tableau 3 présente l'épaisseur de la couche cornée en  $\mu\text{m}$  selon le site anatomique chez l'homme.

Site anatomique	Epaisseur ( $\mu\text{m}$ )
Avant – bras	16
Dos	10
Scrotum	5
Dos des mains	49
Paume des mains	400
Plante des pieds	600

**Tableau 3** : Epaisseur du *stratum corneum* (SC) (la couche cornée) en fonction du site anatomique d'après (BARRY, 1983 [15])

### 1.2.1.1. Microrelief cutané

La surface de la peau humaine n'est pas lisse. Elle présente un relief particulier qui n'est pas dû au hasard, mais à une signification physiologique. L'origine du microrelief est génétique. Les propriétés biomécaniques de l'épiderme et du derme donnent la forme définitive du microrelief. Le relief de la peau est constitué de plateaux délimités par des sillons ou lignes. Ces sillons peuvent être regroupés en quatre catégories : les sillons primaires et les sillons secondaires (Figure 3), les sillons tertiaires et sillons quaternaires (WOLF, 1939 [272]; HASHIMOTO, 1974 [105]).



**Figure 3** : Photographie montrant les sillons primaires et secondaires de la peau (AGACHE, 2000 [6]).

#### **Les sillons primaires** :

Ils délimitent des formes géométriques que nous pouvons voir à la surface de la peau. Ils sont continus et profonds. Ils sont clairement délimités et sont compris entre 20 et 100  $\mu\text{m}$  de profondeur. Avec l'âge, certaines de ces lignes s'accroissent et se transforment en rides.

#### **Les sillons secondaires** :

Ils sont plus discrets et correspondent à une profondeur comprise entre 5 et 40  $\mu\text{m}$ . Ils forment des diagonales entre les lignes primaires. L'observation de la peau au microscope met en évidence la présence d'un microrelief. Aux sillons primaires et secondaires viennent s'ajouter les lignes tertiaires et quaternaires qui ne peuvent pas être vues à l'œil nu.

#### **Les lignes tertiaires** :

Elles correspondent aux bords des cornéocytes (environ 0,5  $\mu\text{m}$ ).

**Les lignes quaternaires :**

Elles se trouvent dans chaque relief des cornéocytes (environ 0,05  $\mu\text{m}$ ) au niveau de la surface de la peau et représentent les fibres de kératine dans les cellules du SC.

**1.2.1.3. La Jonction Dermo-Epidermique**

(SARET et Coll., 1994 [223]; BERNARD et BEDANE, 1997 [21]; MELISSOPOULOS et LEVACHER, 1998 [169])

La jonction dermo-épidermique se situe à l'interface entre l'épiderme et le derme. Elle se distingue par la présence de points d'ancrage caractéristiques, que ce soit pour les hémidesmosomes de l'épiderme ou les fibres d'ancrage du derme composées de collagène. D'un point de vue morphologique, elle comprend le pôle basal des kératinocytes basaux, la membrane basale épidermique et la zone sous-basale du derme superficiel. Elle joue un rôle mécanique de soutien pour les cellules et les tissus, ainsi qu'un rôle biologique de filtration des différentes molécules et des différents sels. Elle contrôle également le comportement cellulaire au cours du développement.

**1.2.1.4. Le derme**

(ELIAS, 1981 [75]; AGACHE et Coll., 2000 [6])

Son épaisseur est de 1mm à 4mm, selon les régions du corps. Le derme est une forme différenciée du tissu conjonctif, composée de deux parties :

- Une couche papillaire ou derme superficiel ; elle comporte de nombreuses papilles dermiques qui s'articulent avec l'épiderme. C'est une couche de structure lâche, formée par l'enchevêtrement de trois réseaux : fibres élastiques, collagène, fibres réticuliniques.
- Une couche réticulaire, formant un entrecroisement de fibres de collagène et d'élastine, dans toutes les directions et parallèles à la surface cutanée. Ces faisceaux deviennent de plus en plus épais vers la profondeur du derme.

Le derme possède également :

- Des fibroblastes, éléments cellulaires principaux qui sécrètent les macromolécules protéiques comme l'élastine et le collagène ;
- Des macrophages ;

- Des mastocytes, sécréteurs d'histamine, d'acide hyaluronique, d'héparine qui contribuent aux réactions locales ou générales ;
- Des éléments nerveux et vasculaires.

Le derme est un tissu compressible, extensible et élastique. Il assure la nutrition de l'épiderme, qui n'est pas irrigué par des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Les éléments nutritifs proviennent par transsudation des vaisseaux capillaires du derme papillaire pour nourrir l'épiderme. Le derme assure la tonicité et l'élasticité de la peau et il concourt à son rôle de protection par la sécrétion du sébum et de la sueur, en formant un film essentiellement hydrolipidique sur la surface de la peau.

### **1.2.1.5. Hypoderme ou tissu sous – cutané**

(HEWITH, 1969 [109]; LARREGUE et Coll., 1980 [137]; ODLAND, 1984 [188]; MORAND et Coll., 1996 [175])

C'est un tissu conjonctif vascularisé, contenant de nombreuses cellules adipeuses. Il assure une isolation thermique et une protection mécanique. Il se situe sous le derme et se moule sur le plan musculo-squelettique assurant ainsi un rôle d'amortisseur contre les forces de pression. Cette couche hypodermique est formée de tissu conjonctif lâche et différencié, sauf dans certaines régions (ex : paupières, oreilles) où elle est constituée d'un tissu graisseux appelé pannicule adipeux. A la jonction derme-hypoderme se logent les glandes sudoripares : éccrines et apocrines, associées aux follicules pileux. L'hypoderme joue plusieurs rôles : c'est une réserve d'énergie et de nutriment, il assure une certaine protection mécanique et joue un rôle essentiel dans le processus de thermorégulation (protège contre le froid à l'aide de sa réserve lipidique et excrète de la sueur en cas de température trop élevée).

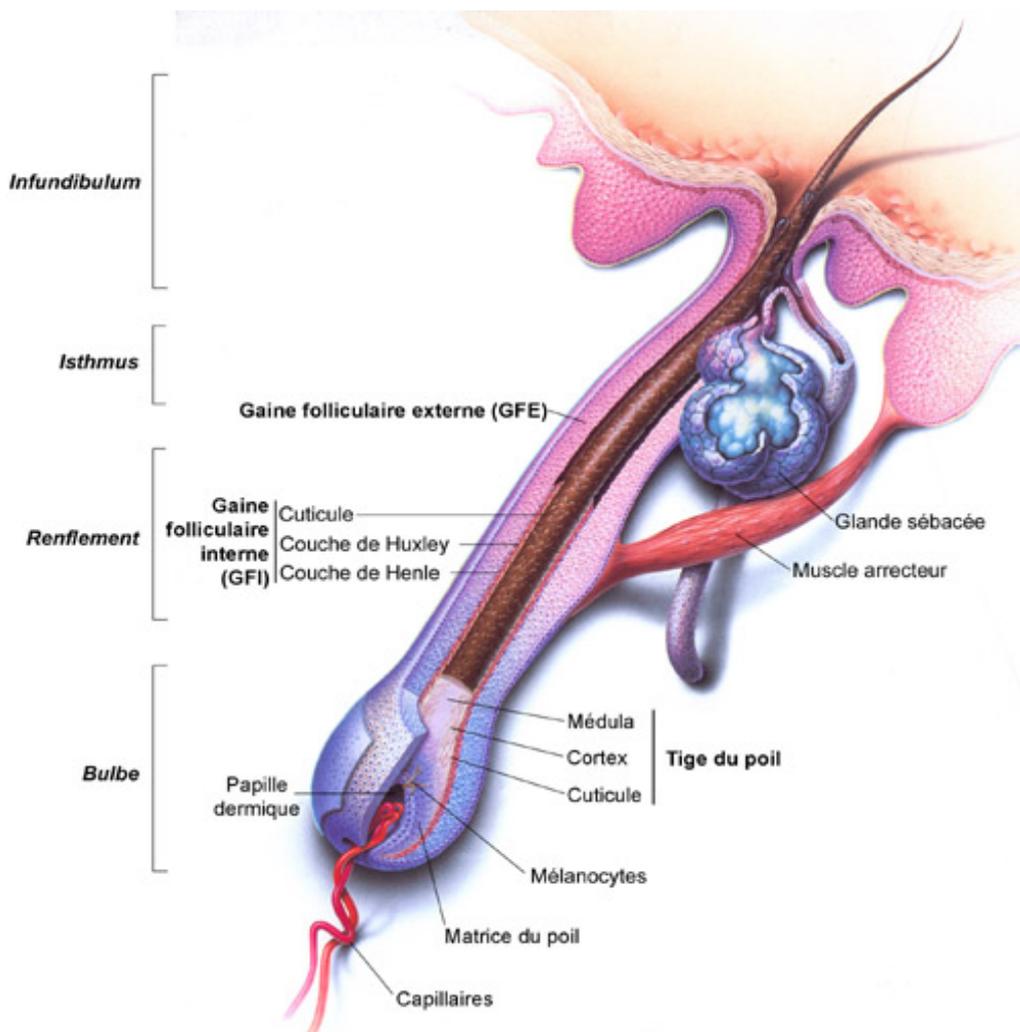
### **1.2.1.6. Les annexes de la peau humaine**

#### **1.2.1.6.1. Système pilo-sébacé**

(LORETTE et LARREGUE, 1989 [148]).

Les follicules pileux (Figure 4) commencent à se développer à la fin du deuxième mois, d'abord sur les sourcils, la lèvre supérieure, le menton, puis le front et le crâne. Ils n'apparaissent sur le tronc et les membres que vers le quatrième et le cinquième mois. Deux bourgeons cellulaires se développent à partir de la paroi du canal folliculaire : l'inférieur constitue l'ébauche de la fixation du muscle érecteur et le supérieur correspond à la glande

apocrine. Les glandes sébacées se développent dès la treizième semaine, d'abord aux endroits où les premiers follicules pileux apparaissent (sourcils, lèvre supérieure, menton, qui resteront toute la vie les régions de la séborrhée). Les cellules sébacées se chargent de lipides, dès la dix-septième semaine et seront très actives durant le reste de la vie fœtale. Leur sécrétion forme la majeure partie du « vernix caseosa » (une substance grasse, blanchâtre qui couvre la peau du nouveau-né et qui s'élimine à la première toilette). Les glandes sébacées, de grande taille chez le fœtus et le nouveau-né, régressent ensuite, et se développent à nouveau à la puberté.



**Figure 4** : Le follicule pileux et la glande sébacée forme l'appareil pilo-sébacé (GERAS, 1990 [91]).

### 1.2.1.6.2. Glandes sudorales

(AGACHE et Coll., 1981 [5])

La sueur est produite par les glandes sudorales éccrines et apocrines ; elles interviennent surtout dans la régulation thermique, la production de sueur permettant de diminuer la température cutanée ; le stimulus principal est l'augmentation de la température centrale. Le contrôle nerveux de la sécrétion sudorale ne semble pas être parfaitement fonctionnel avant l'âge de deux ou trois ans. Il y a deux types de glandes sudorales :

#### a) Glandes Sudorales Eccrines :

Les glandes sudorales éccrines se développent indépendamment des follicules pileux, d'abord sur les paumes des mains et plantes des pieds chez le bébé dès le quatrième mois, puis sur le reste du corps. A partir de la couche basale (*stratum germinativum*), des bourgeons cellulaires s'enfoncent dans le derme, constituant deux cylindres cellulaires concentriques ; la partie profonde de ce cordon se pelotonne pour former le glomérule sécrétoire. Bien que morphologiquement achevées à la naissance, les glandes éccrines ne deviennent pleinement actives qu'au cours des premiers mois de la vie.

#### b) Glandes Sudorales Apocrines :

Les glandes apocrines se développent à partir d'un bourgeon du follicule pileux, au-dessus des glandes sébacées, après la formation de celles-ci, et des glandes éccrines. Après la naissance, seules persistent les glandes situées sur les régions génitales, les aisselles, les aréoles mammaires, le conduit auditif externe, les paupières. Les glandes apocrines ne sont pas fonctionnelles dans la petite enfance. Leur développement atteint sa maturité à la puberté. A la différence de la sueur éccrine (claire et aqueuse), le produit de sécrétion apocrine est visqueux et d'apparence laiteuse.

## 1.2.2. Quelques fonctions essentielles de la peau humaine

Les fonctions de la peau sont multiples :

- La peau humaine représente l'interface entre le milieu intérieur (du corps) et l'environnement. Elle constitue la première barrière de défense engagée dans la protection du corps humain et assure une protection de l'organisme contre les agressions de l'environnement extérieur telles que les agents thermiques (froid ou chaud) ou bien les radiations.
- La peau possède également une fonction d'échanges thermiques (pour régler la température du corps) et une fonction sensorielle : les terminaisons nerveuses ressentent le froid, la chaleur et la douleur.
- Son rôle protecteur contre les radiations UV tient essentiellement à la mélanine que le SC contient.
- Elle possède un rôle protecteur contre l'entrée d'agents infectieux. Le système immunitaire de la peau est constitué principalement par les cellules de Langerhans (dans l'épiderme) et les mastocytes (cellules dendritiques du derme).
- La kératine, base du SC, est l'une des substances les plus résistantes aux agents chimiques. Les kératinocytes participent à la défense immunitaire en déclenchant une réponse inflammatoire.
- Le film hydrolipidique protéique existant à la surface du SC (une émulsion d'acide, sueur, lipides épidermiques abandonnés par les cellules au cours de desquamations, du sébum) joue un rôle de barrière surtout contre les infections à cause de son pH acide.
- La peau a une fonction métabolique non négligeable puisqu'elle synthétise la vitamine D dans la partie profonde de l'épiderme, sous l'influence de rayons UVB (CATALA, 1999 [37]).

- La peau laisse passer des substances de l'intérieur de l'organisme vers l'extérieur (ex : sudation, excrétion sébacée, renouvellement du SC).
- La peau est une membrane semi-perméable. Un certain nombre de substances peuvent la pénétrer. Les études sur l'absorption cutanée ont pour objectif d'évaluer l'activité ou l'innocuité de médicaments, cosmétiques et autres agents industriels ou de l'environnement, susceptibles d'entrer en contact avec l'épiderme et le derme (BISAILLON, 1985 [23] ; GUY et HADGRAFT, 1989 [98]).
- La peau possède une fonction « réservoir ». C'est la capacité de l'épiderme à retenir certaines substances pour les lâcher graduellement. En 1963, il a été démontré que les corticostéroïdes topiques, appliqués sous occlusion, produisent un dépôt cutané ; c'est la couche cornée qui constitue le site de ce réservoir épidermique. En cosmétologie, la propriété de persistance prend le nom de « substantivité » et trouve son intérêt dans l'application des filtres solaires, des produits hydratants. Le SC n'est pas toujours seul en cause dans les phénomènes de rétention cutanée. Le derme peut, dans certains cas, jouer le rôle de réservoir (VICKERS, 1963 [259] ; MARTY, 1976 [163] ; BISAILLON, 1985 [23]).

### *1.3. Techniques de Quantification du microrelief cutané*

---

## 1.3. TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DU MICRORELIEF CUTANE

---

### Sommaire

1.3.1. Le Microrelief Cutané de la peau humaine .....	44
1.3.2. Méthodes qualitatives.....	46
1.3.2.1. L'observation .....	46
1.3.2.2. Le microscope optique (MO) .....	47
1.3.2.3. Microscope électronique à balayage (MEB).....	47
1.3.3. Méthodes quantitatives.....	48
1.3.3.1. Technique des empreintes cutanées .....	48
1.3.3.1.1. L'empreinte négative.....	49
1.3.3.1.2. L'empreinte positive .....	49
1.3.3.2. Méthodes mécaniques .....	50
1.3.3.2.1. Profilométrie.....	50
1.3.3.2.2. Surfométrie.....	51
1.3.3.2.3. SkinChip® .....	51
1.3.3.3. Les Méthodes optiques.....	52
1.3.3.3.1. La Microscopie Triangulaire.....	52
1.3.3.3.2. La Microscopie à Défocalisation.....	53
1.3.3.3.3. La Microscopie Laser à Refocalisation.....	54
1.3.3.3.4. La Microscopie Confocale en Lumière Blanche et à Balayage Laser .....	55
1.3.3.3.5. La Microscopie Confocale à Aberration Chromatique .....	57
1.3.3.3.6. La Méthode d'Ombrage (Shadow Casting) .....	59
1.3.3.3.7. Profilométrie de Transmission .....	60
1.3.3.3.8. La Méthode par Projection de Franges .....	60

### **1.3.1. Le Microrelief Cutané de la peau humaine**

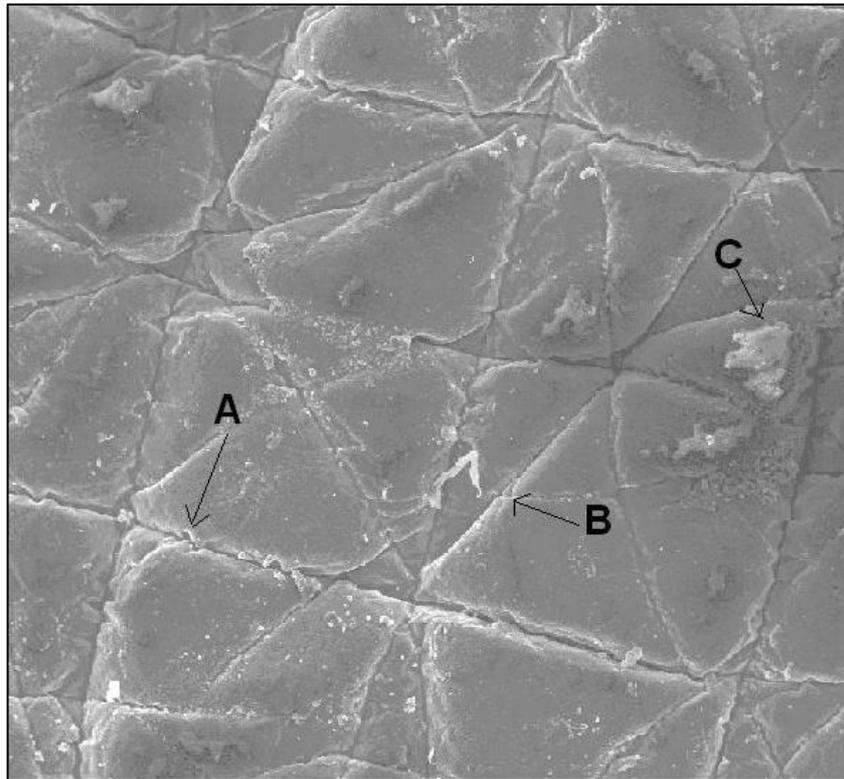
(MAKKI et Coll., 1979 [155]; MAKKI, 1980 [153]; FERGUSON et BARBENEL, 1981 [86]; CORCUFF et Coll., 1984 [48]; TECHNOFF, 1985; MAKKI, 1987 [154]; VIATOUR et Coll., 1995 [258], LAGARDE et Coll., 2004 [135]).

La surface de la peau humaine n'est pas lisse, elle présente des irrégularités qui ne sont pas dues au hasard, mais à une signification physiologique et pathologique. Elle est caractérisée par un relief dont la structure exprime l'état physique du tégument, ses propriétés mécaniques et son altération possible par des facteurs physiologiques (âge) ou pathologiques (maladie), externes (le soleil, pollution...etc.) ou internes (perte excessive d'eau).

La morphologie du relief cutané est variable selon les régions corporelles. Il est formé par l'entrecroisement de sillons (lignes) (Figure 5), d'orifices folliculaires ou de pores sudoripares.

D'après Corcuff et Coll. en 1982 [46], les dépressions les plus visibles constituent les rides, dont la profondeur se situe entre 100µm et plusieurs mm selon l'âge de l'individu. Elles sont localisées sur des lieux privilégiés : rides d'expression du visage et plis au niveau des articulations. Elles sont visibles à l'œil nu. L'entrecroisement des sillons forme des surfaces de différentes dimensions appelées plateaux.

La surface cutanée est caractérisée par un réseau constitué de 4 types de sillons (lignes) formant un système ordonné : lignes primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires. Ces lignes sont présentes à la naissance et leur profondeur augmente avec l'âge jusqu'à la puberté. Chez les femmes elles sont moins profondes que chez les hommes (MAKKI, 1987 [154]). Les lignes primaires et les rides représentent l'organisation particulière des faisceaux de collagène dans le derme superficiel (FERGUSON et BARBENEL, 1981 [86]).



**Figure 5** : La structure du microrelief cutané  
(A : ligne primaire, B : ligne secondaire, C: desquamation)

Le relief a une origine mixte (TECHNOFF, 1985) :

- Congénitale : apparaît à partir de la 13<sup>ème</sup> semaine de la vie intra-utérine et se forme définitivement durant le 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> mois de la vie fœtale.
- Mécanique acquise : à partir des tensions et du stress mécanique subit par la peau.

Les sillons primaires et secondaires constituent des canaux de distribution de la sueur et du sébum. Ils permettent aussi de collecter les substances appliquées sur la peau. Le sébum sécrété par la glande sébacée est véhiculé par le canal pilo-sébacé, puis distribué sur toute la surface du tégument par l'intermédiaire des sillons primaires et secondaires, assurant un film hydrolipidique en se mélangeant avec la sueur (HASHIMOTO, 1974 [105]). Cette couche fine, retenue en partie au niveau des sillons, permet de maintenir une bonne hydratation du SC. D'autre part, les sillons ont un rôle de canaux de collections, et par suite, favorisent l'absorption percutanée des substances appliquées sur la peau.

Une fois un produit cosmétique appliqué sur la peau, les principes actifs de ce produit vont agir sur le relief de notre peau. Pour étudier l'effet d'un produit cosmétique et s'assurer de son efficacité (hydratant, anti-rides...), les chercheurs ont toujours élaboré des méthodes pour évaluer le microrelief de la peau avant et après l'application d'un produit topique. Au début, ils se contentaient de l'observation visuelle pour une étude qualitative de la microtopographie, puis ils ont utilisé le microscope optique. La quantification du relief cutané a commencé avec la technique des répliques en 1979 (MAKKI et Coll., 1979 [155]). Depuis cette date, les méthodes de quantification n'ont pas cessé d'évoluer : méthodes mécaniques avec contact et méthodes optiques sans contact (*in-vitro* et *in-vivo*). Dans ce chapitre, nous allons présenter les techniques les plus utilisées pour l'observation qualitative et pour la quantification du relief cutané.

### 1.3.2. Méthodes qualitatives

#### 1.3.2.1. L'observation

(PINKUS, 1927 [198]; ENGEL, 1956 [78]; WAGNER et GLOTZ, 1979 [261]; TUPKER et Coll., 1989 [251])

La méthode d'observation est l'une des techniques les plus anciennes, employée pour caractériser la topographie de la surface de la peau humaine. Dans le passé, les dermatologues regardaient la morphologie de la surface de la peau à l'œil nu ou bien à l'aide d'une loupe.

Blashko en 1887 [24] et Philippon en 1889 [197] ont examiné par microscope optique l'épiderme après l'avoir isolé à l'aide d'un acide, par macération ou en photographiant l'épiderme *in-vivo*. A l'aide de cette méthode, les chercheurs appréciaient la couleur, la consistance et les caractéristiques de la surface de la peau dans le but d'établir un diagnostic et une classification des maladies cutanées. Par cette technique, on peut déterminer les modifications de la peau au cours du temps, surtout pour évaluer l'efficacité d'un produit dermo-cosmétique ou d'un médicament sur la surface cutanée. Or cette méthode a plusieurs inconvénients : pour les prélèvements épidermiques (par stripping), l'arrachage de l'épiderme de son environnement naturel supprime ses conditions physiologiques réelles, et par suite, l'étude sera incomplète. C'est une méthode subjective car l'évaluation de la peau est jugée uniquement par l'être humain.

Pour que cette méthode soit valable et conduise à des résultats interprétables, elle doit se faire à certaines conditions. Les différentes observations devront être effectuées tout au long de l'étude par la même personne et dans des conditions identiques.

### **1.3.2.2. Le microscope optique (MO)**

(WOLF, 1940 [272]; THOMSON et SUTARMAN, 1953 [249]; COLLINS et Coll., 1959 [43]; SAMPSON, 1961 [218]; SARKANY, 1962 [221])

La première utilisation du MO pour analyser la topographie cutanée est celle de Wolf en 1940. Puis Collins et Coll. effectuèrent la première réplique cutanée pour l'observer au MO. Cette empreinte de la surface de la peau était faite au moyen d'un mélange de polyvinylformol, butylphthalate et dichlorure d'éthylène. Sarkany, en 1962, a été inspiré par la méthode de Sampson en 1961 pour réaliser des empreintes du relief cutané à l'aide du « Silflo® » (un caoutchouc monomère siliconé). Sarkany effectuait la première contre-réplique qui donna une empreinte positive du relief cutané. Cette technique permet d'avoir un aspect général de toute la surface : des plateaux délimités par les sillons, ainsi que la distribution et l'orientation des lignes à la surface du SC. Ces données peuvent définir et caractériser une surface pour chaque partie spécifique du corps. Mais il est difficile de détecter la structure tertiaire (contours des cellules cornées) à l'aide de cette méthode.

### **1.3.2.3. Microscope électronique à balayage (MEB)**

(SARKANY et CARON, 1965 [222]; HASHIMOTO, 1974 [105]; HASHIMOTO et KANAZAKI, 1975 [106]).

Le MEB a été utilisé pour permettre une analyse qualitative de la microstructure de la peau. Cette technique a permis d'observer facilement les poils, les orifices des glandes sudoripares et écrines, les sillons délimitant les plateaux, ainsi que les rides. En 1965, Sarkany et Carnon ont développé une nouvelle technique de répliques, inspirée de celle de Sarkany en 1962. Les empreintes de la peau ont été réalisées avec « le Silflo® » et les moulages de ces dernières, appelés contre-répliques, sont réalisés au moyen de nitrocellulose. Puis ces contre-répliques ont été recouvertes d'une couche très mince de métal et examinées au MEB. La contre-réplique est balayée ligne par ligne par des électrons incidents, qui vont heurter la surface de l'échantillon en produisant des électrons secondaires. Ce sont ces électrons secondaires, émis lors du bombardement par le faisceau d'électrons incidents, qui vont être détectés et transformés en un signal électrique. Ce signal sera par la suite amplifié et visualisé sur un écran de télévision. L'image formée pourra être stockée et prise en photographie. Une amélioration de l'observation de la topographie cutanée fut le fait de plusieurs auteurs tels que Fujita et Coll. en 1969 [89], Johnson et Coll. en 1970 [119], et Hashimoto et Kanazaki en 1975 [106].

Les études qualitatives du relief cutané sont limitées, étant donné qu'elles décrivent tout simplement des faibles modifications du relief. Donc, il était nécessaire de se référer à des méthodes plus fiables, qui pouvaient nous fournir des notions non seulement qualitatives mais surtout quantitatives.

### **1.3.3. Méthodes quantitatives**

#### **1.3.3.1. Technique des empreintes cutanées**

(MAKKI et Coll., 1979 [155]; MAKKI, 1980 [153])

De nombreux chercheurs ont utilisé le microscope optique, puis le microscope électronique à balayage pour la description du microrelief cutané. Mais, même si l'observation était plus précise, l'inconvénient majeur était l'absence de quantification de ce microrelief qui pouvait nous donner une meilleure caractérisation d'une surface.

En 1979, une technique simple et pratique a donc été mise au point dans le Laboratoire de Biologie Cutanée de Besançon en association avec le Département de « Bio-engineering » (Université de Strathclyde, Ecosse) à Glasgow pour pouvoir quantifier le microrelief cutané : un appareil (le rugosimètre) a été proposé. Or cette technique ne permettait pas de faire une analyse *in-vivo* de la surface de la peau, il était donc nécessaire de faire un moulage ou réplique de la surface cutanée.

Le moulage consiste à réaliser une première empreinte du relief cutané, appelée réplique négative. Puis, à partir de cette réplique négative, un second moulage est effectué pour obtenir une réplique positive ou contre-réplique. Cette dernière est ainsi la copie conforme de la surface de la peau.

### 1.3.3.1.1. L’empreinte négative

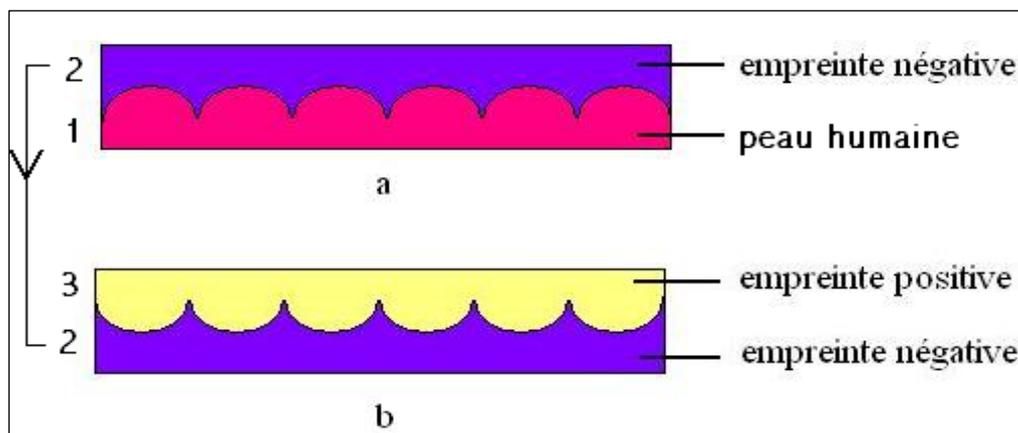
L’empreinte négative est réalisée à l’aide d’un élastomère caoutchouc siliconé : (Silflo®). En ajoutant un catalyseur spécifique, le Silflo® se solidifie en quelques minutes par une réaction de polymérisation.

Pour réaliser une empreinte négative (Figure 6), un cadre plat est posé sur la surface de la peau à répliquer. Dans ce cadre est indiquée l’orientation de l’axe principal du corps. Le Silflo® mélangé au catalyseur est déposé à l’intérieur de ce cadre. Une lamelle de verre est alors placée au-dessus afin d’obtenir un négatif à base plate et d’avoir une épaisseur relativement égale. Ceci permet de minimiser la déformation due à la courbure de la surface extérieure de la réplique négative. Cette réplique est détachée après deux ou trois minutes. Le Silflo® a été choisi pour les propriétés suivantes :

- ne pas être toxique pour la peau car il est utilisé par le dentiste pour réaliser des empreintes dentaires.
- être suffisamment liquide pour s’adapter à tous les sillons de la peau
- durcir rapidement à la température de la peau
- ne pas introduire d’artefacts tels que des bulles d’air
- être relativement élastique (semi-solide) pour éviter toute déformation lors de son détachement.

### 1.3.3.1.2. L’empreinte positive

L’empreinte (ou réplique) positive est réalisée à l’aide d’une résine époxy, un Araldite® (MAKKI et Coll., 1979 [155]). La Figure 6 représente la réalisation d’une empreinte négative à partir d’une surface cutanée et la réalisation d’une empreinte positive à partir d’une empreinte négative.



**Figure 6** : Réalisation d’une empreinte négative (a) puis d’une empreinte positive (b)

L'Araldite<sup>®</sup> doit avoir les propriétés suivantes :

- viscosité faible pour pouvoir reproduire au mieux les détails les plus fins du négatif.
- introduire le moins d'artefacts ou bulles d'air.
- être stable au cours du temps.

En ajoutant un catalyseur spécifique, l'Araldite<sup>®</sup> se solidifie en 24 heures. Le mélange Araldite<sup>®</sup>-catalyseur doit être traité aux ultrasons pour éliminer les bulles d'air. L'empreinte négative est placée dans un moule, puis le mélange Araldite<sup>®</sup> - catalyseur est versé à l'intérieur de celui-ci. Après 24 heures de contact, l'Araldite<sup>®</sup> se solidifie et nous donne l'empreinte positive qui sera séparée de l'empreinte négative (Figure 6).

### **1.3.3.2. Méthodes mécaniques**

A l'aide des empreintes positives, le relief cutané peut être quantifié en utilisant des techniques mécaniques. Ces méthodes sont basées sur un contact direct entre la réplique positive et un palpeur en diamant d'un diamètre de 2 $\mu$ m d'un rugosimètre (profilomètre).

#### **1.3.3.2.1. Profilométrie**

(MARKS and PEARSE, 1975 [159]; MAKKI et Coll., 1979 [155]; COOK, 1980 [42]; LEVEQUE, 1999 [141])

Le rugosimètre mécanique est initialement destiné aux industries mécaniques de pointe pour mesurer les caractéristiques de surface des métaux. Makki et Coll. en 1979 [155] ont eu l'idée de l'adapter à la quantification du microrelief cutané. Nous pouvons distinguer la profilométrie 2D (2 dimensions) et la profilométrie 3D (3 dimensions) surtout appelée surfométrie tridimensionnelle.

La profilométrie consiste à mesurer les profondeurs des sillons et les espacements entre les sillons à l'aide d'un palpeur à pointe en diamant. Le palpeur se déplace horizontalement à vitesse constante (environ 1 mm/s). Le déplacement du palpeur est converti en un signal électrique par l'intermédiaire d'un transducteur ou directement mesuré par un appareil optique. Nous détectons ainsi toute modification de la surface cutanée en utilisant des paramètres quantitatifs de profondeur des sillons et d'espacement des plateaux entre les lignes. Le principal avantage de cette technique est de pouvoir quantifier des profondeurs importantes (quelques millimètres).

Les paramètres de quantification utilisés par ces systèmes sont :

- Ra : écart moyen entre les creux et les pics par rapport à la ligne médiane sur la longueur totale.
- Rq : écart quadratique moyen par rapport à la ligne moyenne, de la rugosité d'un profil de surface sur toute la distance analysée.
- Rp : hauteur maximale du profil par rapport à la ligne médiane sur toute la distance analysée.
- Rt : correspond à l'amplitude maximale de variation du relief de la longueur totale balayée.
- Rmax : amplitude maximale de variation du relief de la longueur totale balayée par rapport à la ligne médiane.
- Rtm : moyenne des amplitudes maximales des profondeurs des sillons à l'intérieur de chaque unité de longueur de base.
- Sm : espacement moyen des sillons, l'évaluation étant faite sur la longueur totale.
- Rsk : Facteur d'asymétrie de la surface.
- Rku : Facteur d'aplatissement de la surface.
- Sv : Profondeur maximale des creux.
- Sz : Hauteur maximale de la surface.

#### **1.3.3.2.2. Surfométrie**

(MAKKI et Coll., 1984 [156]; LEVEQUE, 1999 [141])

La surfométrie tridimensionnelle permet de dresser une cartographie complète d'une partie rectangulaire d'une surface. Elle permet de tracer plusieurs profils parallèles et régulièrement espacés, afin de constituer un relevé des altitudes.

Cet appareil est constitué d'un capteur à pointe de diamant, d'un appareil de mesure des latitudes de la partie de surface étudiée et d'un logiciel de topographie adapté. Ces deux méthodes (profilométrie et surfométrie) permettent de mesurer les amplitudes du microrelief de la peau avec une haute résolution (supérieure à 0,5  $\mu\text{m}$ ).

Les principales différences entre les deux techniques résident dans le fait que la première est une technique rapide, simple et intéressante lorsque l'on possède un nombre élevé d'échantillons. Alors que la deuxième est une méthode longue mais qui offre une meilleure précision de mesure sur la surface totale, avec une représentation en 3 dimensions.

#### **1.3.3.2.3. Skin Chip<sup>®</sup>**

(LEVEQUE et QUERLEUX, 2003 [143])

C'est un appareil constitué de plusieurs micros détecteurs localisés sur une surface de  $(18 \times 12,8)$  mm<sup>2</sup>. Ces capteurs contiennent un circuit de retour permettant de renvoyer un signal électrique. Ce signal correspond à la conductance de la peau. Le signal est ainsi modulé suivant la topographie de la surface cutanée (le signal est maximal lorsque le capteur est en contact avec la peau et il est minimal dans le cas inverse).

Ce système permet de produire une image de la zone où l'appareil est appliqué. Elle présente une cartographie de la capacitance de la surface de la peau. La topographie de la peau est quantifiée par un logiciel permettant de détecter les principales orientations des lignes primaires du microrelief, ainsi que leurs densités.

Cette technique permet de visualiser une grande partie des détails topographiques (pores, lignes primaires et secondaires, rides, etc.) et d'avoir une bonne évaluation de la microstructure de la surface de la peau.

### **1.3.3.3. Les Méthodes optiques**

Pour ces méthodes, l'utilisation de l'empreinte négative est largement suffisante car la totalité des méthodes optiques présentées ci-dessous ont le gros avantage de ne pas nécessiter une empreinte positive. Les méthodes les plus connues et actuellement utilisées sont :

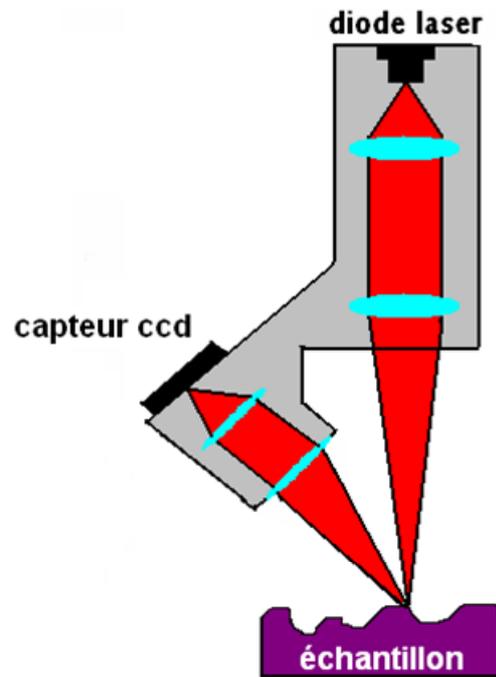
#### **1.3.3.3.1. La Microscopie Triangulaire**

(NITA et Coll., 1998 [185])

La méthode par triangulation (standard ou circulaire) utilise trois points de référence :

- la source fixe est une diode laser de longueur d'onde égale à 788 nm.
- le point à la surface doit être analysé, il varie beaucoup selon le relief local.
- l'image d'un point est formée par un système optique sur un détecteur plan.

Quand la totalité du système de mesure (Figure 7) est déplacée parallèlement à la surface, l'image formée sur le détecteur change de position et la mesure de ces positions donne la hauteur relative du point mesuré.



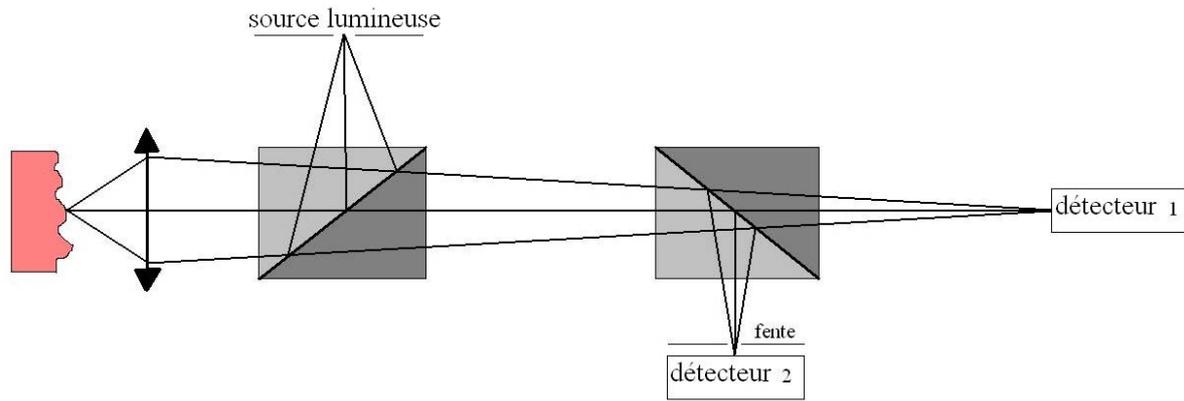
**Figure 7** : Schéma représentant le principe du système de mesure par triangulation (NITA et Coll., 1998 [185])

La profondeur est ainsi calculée par triangulation. La gamme ou profondeur de champ de l'appareil est définie comme étant la variation maximale de hauteur de la surface possible à analyser dans laquelle le faisceau lumineux est toujours focalisé. L'avantage de cette technique est qu'elle est capable de mesurer de grandes gammes (plusieurs dizaines de millimètres). Mais, par contre, cette méthode est sensible aux effets d'ombre (du fait de la position du détecteur).

#### **1.3.3.3.2. La Microscopie à Défocalisation**

(GORECKI et Coll.; 1983 [93])

Un faisceau de lumière blanche est focalisé sur la surface à étudier. La hauteur  $z$  de chaque élément de surface est déduite de la défocalisation du faisceau. La lumière rétrodiffusée par la surface est analysée par deux photodétecteurs symétriques par rapport à un cube séparateur. Une fente est placée devant les deux photodétecteurs (Figure 8).

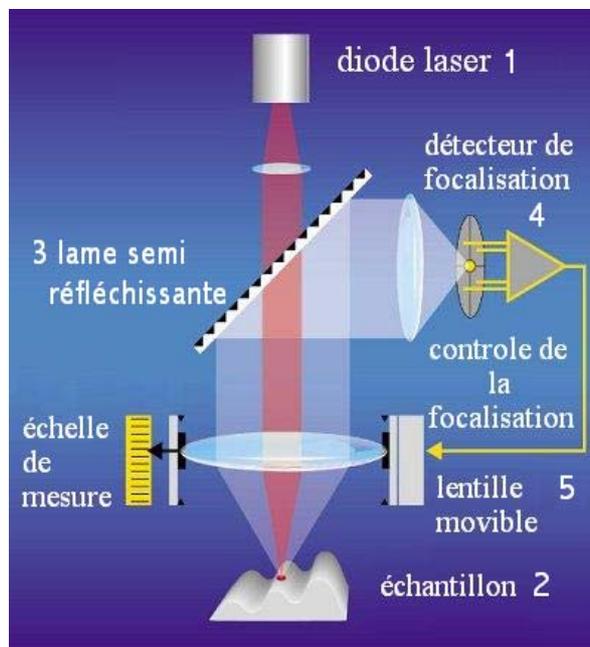


**Figure 8** : Schéma représentant le principe de l'analyse d'une surface par un microscope à défocalisation (ASSOUL; 1991 [12])

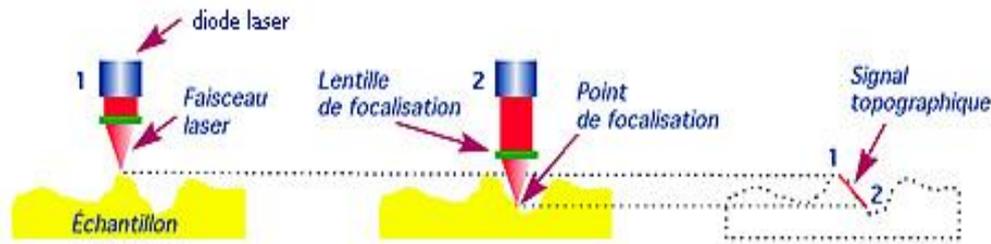
### 1.3.3.3. La Microscopie Laser à Refocalisation

(EFSEN et Coll.; 1995 [71], SAYLES et Coll.; 1988 [226], POTORAC et Coll. ; 1996 [200])

Le principe de ce système (Figure 9) est le suivant : une diode laser (1) est focalisée sur la surface à mesurer (2). La partie réfléchiée par le miroir semi réfléchissant (3) est alors renvoyée sur un ensemble de photodiodes (4).



**Figure 9** : Schéma de la microscopie à refocalisation (SAYLES et Coll.; 1988 [226])



**Figure 10** : Principe de la microscopie laser à refocalisation

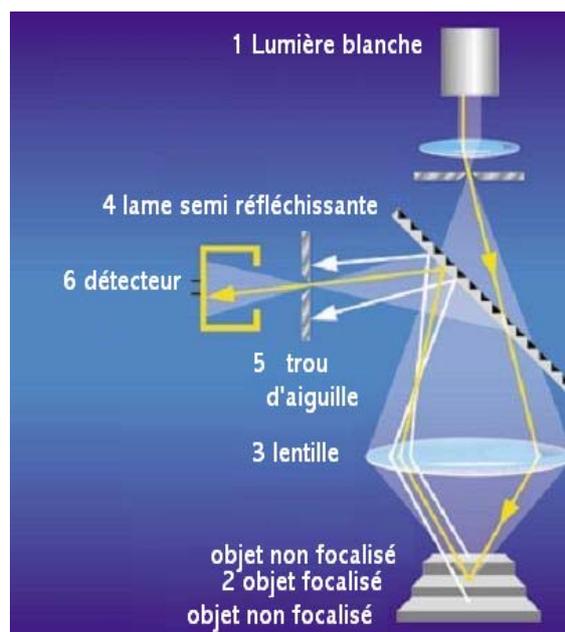
Quand l'échantillon à mesurer est déplacé, chaque variation de relief donnera une défocalisation et diminuera l'intensité de la lumière reçue par le détecteur. Le moteur déplace alors une lentille (5) afin d'obtenir sur les photodiodes une intensité lumineuse réfléchie maximale, le système est alors focalisé (Figure 10). Le diamètre du spot sur une surface plane est de  $1\mu\text{m}$  et varie lorsqu'il est projeté sur une surface rugueuse. La variation de diamètre du spot lors de la mesure déclenche une recherche de focalisation automatique par un déplacement vertical de la lentille. C'est le déplacement vertical de la lentille qui nous permettra de déduire le signal topographique. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'étudier une grande surface, mais ses inconvénients sont importants :

- oblige à trouver un nouveau point de focalisation lors de variations brusques en hauteur.
- peu rapide (0.5 mm /s).
- contient des éléments en mouvement qui induisent des erreurs supplémentaires.

#### 1.3.3.3.4. La Microscopie Confocale en Lumière Blanche et à Balayage Laser

(NEW et Coll.; 1991[182])

En microscopie optique conventionnelle, l'ensemble du champ d'observation est éclairé de manière homogène : le microscope est dit à champ large. Dans cette configuration, les différents plans de l'image qui se superposent par transparence ne peuvent être discernés. En microscopie confocale, un seul point focal va être éclairé et seule la lumière provenant de ce point sera observée. Ce mode d'éclairage va permettre d'obtenir une discrimination en profondeur.



**Figure 11** : Schéma de la microscopie confocale représentant le principe de fonctionnement (NEW et Coll.; 1991 [182])

Principe de fonctionnement (Figure 11) :

Une source de lumière (1) envoie un faisceau qui est focalisé en un point de l'objet (2). La lumière revenant de l'objet traverse la lentille (3) et est réfléchiée par la lame semi-transparente (4) vers le détecteur. Le trou d'aiguille (5) joue un rôle essentiel dans cette configuration puisque seule la lumière provenant de l'objet atteindra le détecteur. En effet, la lumière provenant de points situés au-dessus ou au-dessous de l'objet est filtrée par le trou d'aiguille. Le photomultiplicateur (6) recueille le faisceau lumineux issu du trou d'aiguille, puis transmet le signal à un système informatique.

Si ce microscope est utilisé avec une source de lumière blanche, il aura une profondeur de champ étendue, c'est-à-dire qu'une faible variation de l'objet à la distance de focalisation n'induit pas une image floue de l'objet.

L'utilisation d'une source de lumière blanche à la place d'une source laser élimine tout problème de speckle (aspect granulaire présentant des tâches claires et sombres causées par des interférences constructives et destructives du laser).

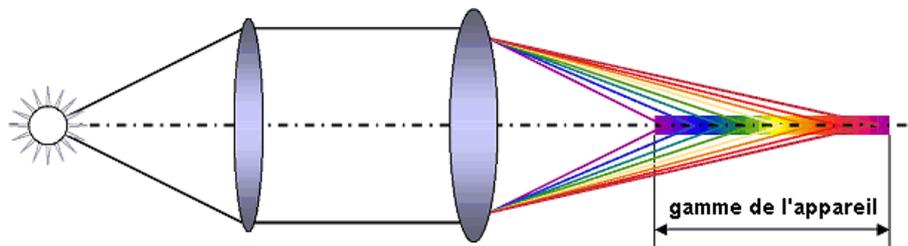
Cependant, la microscopie confocale laser à balayage (CLSM : Confocal Light Scanning Microscopy) est largement utilisée car le laser est une source cohérente de lumière et son intensité est beaucoup plus importante qu'en lumière blanche. Une reconstitution de l'image 3D de l'objet pourra ainsi être effectuée avec beaucoup plus de précision et de rapidité. En général, c'est une technique bien adaptée à l'étude de l'efficacité d'un produit

dermo-cosmétique avec une possible localisation précise de la surface à étudier mais son prix est élevé.

#### 1.3.3.3.5. La Microscopie Confocale à Aberration Chromatique

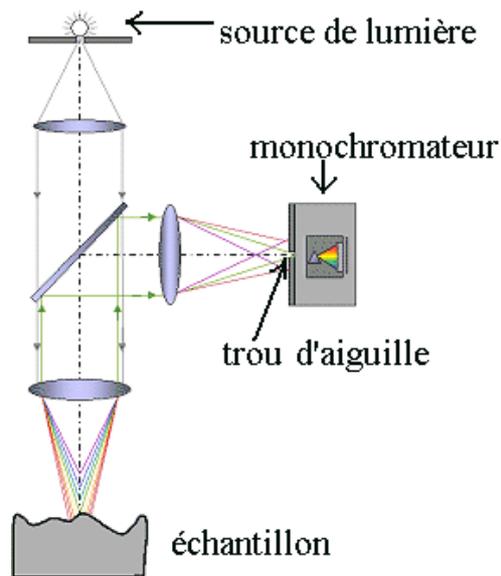
(DIGITALSURF; 2005 [65])

L'aberration chromatique (Figure 12) désigne la propriété d'une lentille de focaliser différentes longueurs d'ondes en des points différents. Ce phénomène est en général considéré comme un défaut dans les systèmes optiques (caméras, appareils photo) et des lentilles achromatiques sont utilisées. Ici, c'est justement ce "défaut" qui est exploité.



**Figure 12** : Schéma représentant le principe de l'aberration chromatique

Les composants de la lumière blanche sont dispersés par l'objectif chromatique le long de l'axe optique. L'appareil de mesure utilise une source de lumière blanche et un objectif produisant une dispersion des points focaux le long de l'axe optique (aberration chromatique). L'ensemble est associé à un dispositif confocal qui sélectionne la longueur d'onde focalisée sur la surface à mesurer (Figure 13). Le détecteur est constitué d'un spectrophotomètre qui analyse la longueur d'onde possédant la plus forte intensité. La connaissance de la relation entre la longueur d'onde et la distance du point focal permet de mesurer le microrelief. Seule la longueur d'onde focalisée sur la surface à mesurer passera par le trou d'aiguille situé devant le spectrophotomètre, les autres longueurs d'ondes sont éliminées.



**Figure 13** : Schéma représentant le principe de fonctionnement de la microscopie confocale à aberration chromatique (DIGITALSURF; 2005 [65])

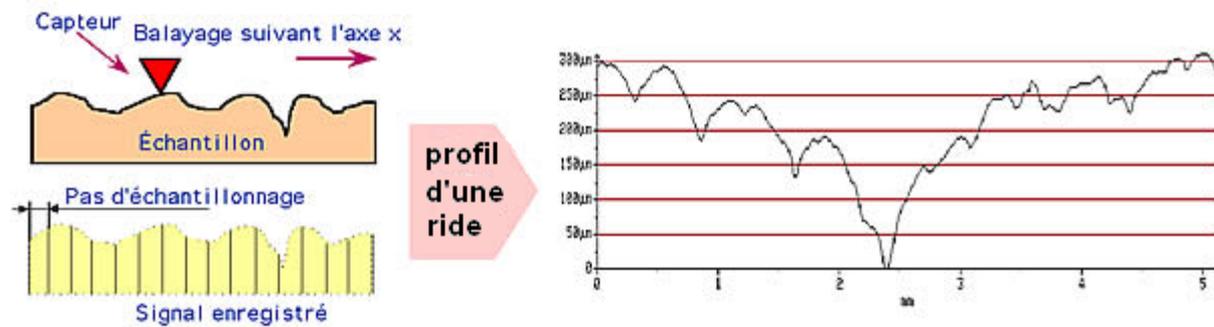
Les avantages de cette méthode :

- Il n'est pas nécessaire de déplacer l'objectif pour couvrir la gamme à mesurer par rapport à un système confocal classique.
- Pas de pièce en mouvement.
- Pas de problème d'ombrage.

Ses inconvénients :

- Renvoyer suffisamment de lumière.
- Diamètre du faisceau large.

D'une manière générale, toutes les techniques précédemment développées, que ce soit: la microscopie triangulaire, la microscopie à défocalisation, la microscopie laser à refocalisation ou la microscopie confocale, reconstituent le microrelief cutané de la façon suivante : un balayage ligne par ligne du microrelief cutané est réalisé, chaque ligne est constituée d'un certain nombre de points espacés d'un pas d'échantillonnage donné (Figure 14).



**Figure 14** : Principe du balayage (MIGNOT et Coll., 1996 [172])

Pour faire l'acquisition d'une ligne, le capteur se déplace suivant un axe x de façon à mesurer une certaine longueur. En mettant côte à côte les profils mesurés, espacés d'un pas d'échantillonnage, on va pouvoir reconstituer une image 3D du relief topographique de la surface (Figure 15).

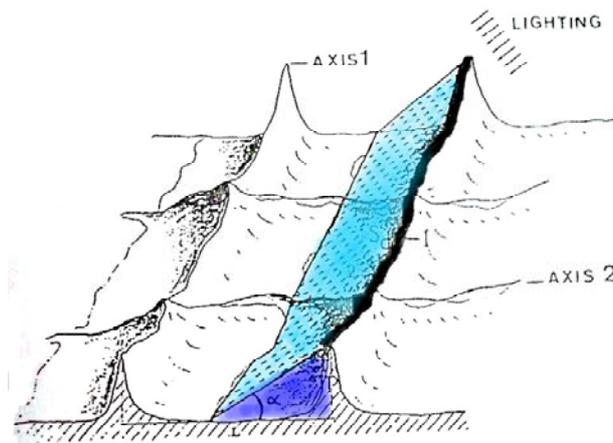


**Figure 15** : Acquisition d'une image du microrelief cutané

### 1.3.3.3.6. La Méthode d'Ombre (Shadow Casting)

(CORCUFF et Coll., 1982 [46]; CORCUFF et Coll., 1984 [47]; LEVEQUE, 1999 [141])

Cette méthode (Figure16) consiste à éclairer une réplique négative par une source de lumière parallèle avec un certain angle, pour produire des ombres. Ces ombres sont plus larges quand les sillons sont plus hauts. Pour cette raison, un angle d'incidence faible d'éclairage doit être choisi dans le cas de sillon profond (rides par exemple). Un calcul trigonométrique permet d'accéder à la valeur moyenne de la densité et à la valeur moyenne de la profondeur des lignes. L'intensité de l'éclairage et l'angle d'incidence influencent les résultats. Ils doivent être choisis selon la profondeur et la densité du relief, pour minimiser la perte d'information due aux ombres. Cette méthode ne peut être employée pour quantifier le microrelief cutané d'une personne âgée, car les rides vont masquer le microrelief.

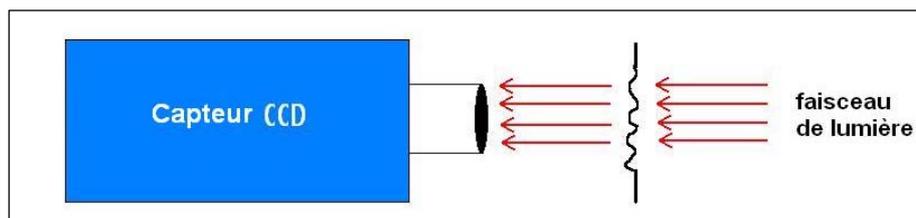


**Figure 16** : Illustration de la méthode des ombrages (CORCUFF et Coll., 1984 [47])

#### 1.3.3.3.7. Profilométrie de Transmission

(LAGARDE et Coll., 2001 [136])

Cette méthode utilise le fait que l'intensité lumineuse est fonction de l'épaisseur de la réplique positive. L'appareillage (Figure 17) se compose d'une camera CCD (Charge Couple Device) et d'une source lumineuse. La réplique est ainsi éclairée et l'intensité lumineuse transmise est captée par la camera CCD et transformée en impulsion électrique. Le signal est ensuite traité par un logiciel.



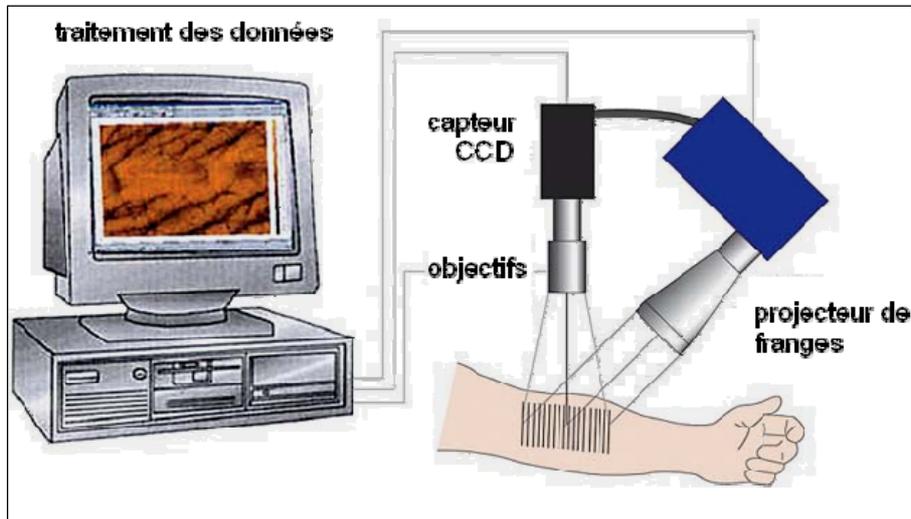
**Figure 17** : Schéma représentant le principe de mesure du microrelief cutané par un profilomètre de transmission

#### 1.3.3.3.8. La Méthode par Projection de Franges

(LAGARDE et Coll., 2001[136]; JACOB et Coll., 2004[116]; SANDOZ et Coll., 2004 [219])

Le système de mesure se compose d'une tête optique librement mobile (composée d'un capteur CCD et d'un projecteur de franges) ainsi que d'un ordinateur d'évaluation servant à traiter les données (Figure 18). Une série de franges noires et blanches sont projetées sur la surface à étudier. Le relief de l'objet induit une déformation des franges due à la différence

entre l'angle d'observation des franges et l'angle avec lequel elles sont projetées. C'est ce phénomène qui nous permet de quantifier le microrelief de l'objet. Cette méthode est appliquée aussi bien sur des répliques négatives qu'*in-vivo*, sur tout le corps ou sur 1 cm<sup>2</sup>. Le temps d'acquisition est très rapide. La précision est de 5 micromètres.



**Figure 18** : Schéma de la méthode par Projection de franges (LAGARDE et Coll.; 2001[136])

Les inconvénients de cette technique sont :

- les acquisitions 3D *in vivo* sont difficiles à cause des mouvements involontaires du sujet.
- la peau n'est pas opaque, une partie de la lumière réfléchi est due aux couches plus profondes de la peau.
- certaines zones pentues de la surface seront cachées par l'ombre portée du relief qui les entoure.

## *1.4. L'Absorption Cutanée*

---

## 1.4. L'ABSORPTION CUTANEE

---

### Sommaire

1.4.1. Mécanisme de l'absorption cutanée .....	66
1.4.2. Facteurs influençant la pénétration cutanée .....	67
1.4.2.1. La peau .....	67
La région .....	67
La race .....	67
Le sexe .....	67
L'âge .....	67
L'intégrité de la peau .....	68
L'hydratation et occlusion .....	68
Le pH .....	69
La Température .....	69
1.4.2.2. La formulation .....	69
La forme galénique .....	69
La fonction réservoir du S.C. ....	70
Les accélérateurs d'absorption .....	70
1.4.2.3. Nature du principe actif .....	71
1.4.3. Méthodes d'évaluation cutanée des produits topiques .....	72
1.4.3.1. Les méthodes ex-vivo .....	72
1.4.3.1.1. Les cellules de Franz .....	72
1.4.3.1.2. La dialyse d'équilibre .....	72
1.4.3.2. Les méthodes in-vivo .....	73
1.4.3.2.1. Les bulles de succion .....	73
1.4.3. 2.2. Les biopsies .....	73
1.4.3. 2.3. La méthode de stripping .....	73
1.4.3. 2.4. La méthode des différences .....	73
1.4.3. 2. 5. La microdialyse .....	73
1.4.4. Les Cellules de Franz .....	74
1.4.4.1. Principe des Cellules de Franz .....	75
a) La membrane .....	75
b) La phase réceptrice .....	75
c) Expérimentations .....	76
1.4.5. Quantification des molécules après passage cutané .....	77

La peau n'est pas impénétrable. Une fois la molécule appliquée à la surface de la peau humaine, elle va se libérer en traversant par étapes les différentes couches de la peau. Chaque étape se caractérise par une vitesse propre. La résistance à la pénétration n'est pas uniforme tout au long du cheminement d'une molécule.

Donc, l'absorption percutanée est définie comme étant le transport de substances topiques jusqu'à la circulation systémique.

Deux voies de pénétration de substances dans la peau sont connues :

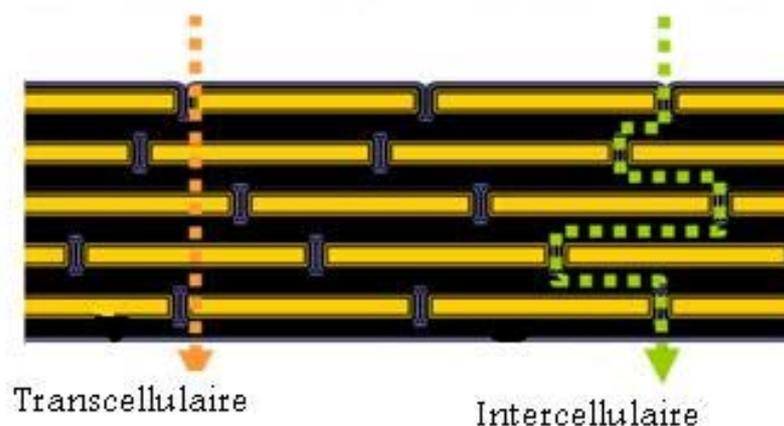
a) Voie transépidermique où nous distinguons deux modes de diffusion :

- Transcellulaire ou transcornéocytaire :

C'est l'une des deux principales voies de passage transcutané, elle est directe, empruntée par les molécules de petite taille. Elle est considérée comme voie principale de la pénétration transcutanée (SCHEUPLEIN, 1965 [234]) (Figure 19).

- Intercellulaire :

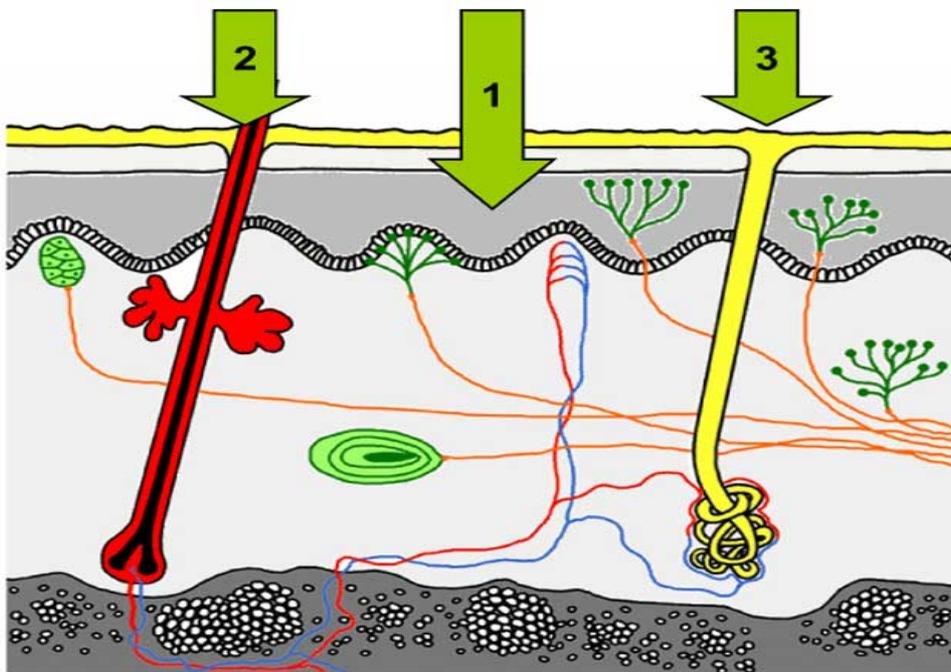
Elle emprunte la voie tortueuse du ciment lipidique intercellulaire (pour les molécules amphiphiles ou lipophiles). Le volume des espaces intercellulaires ne dépasse pas 5 % de celui du SC (BISAILLON, 1985 [23]) et présente des zones hydrophiles et des zones hydrophobes (ELIAS, 1981[75]; 1983[76]) (Figure 19).



**Figure 19** : Représentation schématique de la diffusion intracellulaire et intercellulaire de molécules à travers le SC (d'après Elias, 1983[76]).

### b) Voie transannexielle :

Les annexes (système pilo-sébacé, glandes sudoripares) ne représentent que 0,1 à 1 % de la surface totale de la peau (WAHLBERG, 1968 [263]). Cette surface réduite permet une pénétration plus rapide mais plus restreinte des molécules. Les annexes ont la possibilité de jouer un rôle de réservoir de particules libérant lentement les principes actifs (hydrocortisone, acide niflumique, caféine et acide p-aminobenzoïque) (ILLEL et Coll., 1988 [112] ; 1991[113]) (Figure 20).



**Figure 20** : Les voies de passages des substances à travers la peau humaine :  
(1) voie trans-épidermique; (2) voie trans-folliculaire; (3) voie à travers les glandes sudoripares (d'après Schaeffer et Coll., 1998 [232])

### 1.4.1. Mécanisme de l'absorption cutanée

C'est un phénomène de diffusion passive qui s'exerce. Les molécules traversent la surface cutanée (de nature lipophile), puis diffusent dans les différentes couches de l'épiderme, continuent ensuite à diffuser dans le derme (hydrophile). Ce phénomène comprend plusieurs étapes : (SCHAEFER et Coll., 1982 [233] ; ZATZ, 1983 [273]; MAKKI et Coll., 1996 [157]).

- Pénétration cutanée qui constitue l'entrée d'une molécule dans les couches de la peau.
- Pérméation de la substance au niveau du SC, puis sa diffusion à travers l'épiderme. C'est la pénétration d'une couche vers l'autre.
- Résorption, qui est l'entrée de la substance dans le système vasculaire au niveau du derme (circulation sanguine ou lymphatique).

La perméabilité cutanée obéit habituellement à la loi générale de Fick (TREGGAR, 1966 [250]; BUTTLER et Coll., 1996 [33]). Le flux de substance, c'est-à-dire la quantité de substance diffusée par unité de temps et de surface, est donné par la relation suivante :

$$J = \frac{D \cdot km}{e} (C_0 - C_i)$$

J = flux percutané exprimé en mg /cm<sup>2</sup> /h

(C<sub>0</sub> - C<sub>i</sub>) = différence de concentration de part et d'autre de la membrane

K<sub>m</sub> = coefficient de partage d'une molécule entre la membrane (couches de la peau) et le véhicule

D = coefficient de diffusion en cm<sup>2</sup> /h dans la membrane

e = épaisseur de la membrane exprimée en μm

La valeur de J d'une molécule dépend des propriétés physico-chimiques de la préparation, de sa concentration dans son véhicule et de l'épaisseur de la membrane que la molécule traverse.

## 1.4.2. Facteurs influençant la pénétration cutanée

Trois facteurs essentiels peuvent intervenir pour influencer l'absorption cutanée d'une substance déposée sur la peau : l'origine de la peau, la préparation galénique et la molécule.

### 1.4.2.1. La peau

#### La région

L'épaisseur cutanée, le nombre de couches cellulaires et le nombre de glandes sébacées et sudorales varient selon la localisation. La peau de l'abdomen par exemple est plus épaisse que la peau de l'avant-bras (AGACHE et Coll., 1981 [5]). Maibach et Coll. en 1971 [152] ont montré que le taux d'absorption est inversement proportionnel à l'épaisseur cutanée et ceci conditionne la vitesse de l'absorption cutanée (IDSON, 1975 [110]; BISALLION, 1985 [23])

#### La race

L'absorption diminue avec l'épaisseur de l'épiderme qui est variable selon la race :

Race blanche : environ une douzaine de couches.

Race jaune : environ une quinzaine de couches.

Race noire : plus épaisse, environ 25 couches.

Donc, la barrière épidermique est plus efficace chez les Noirs que dans les autres races. Stoughton en 1972 a démontré que la pénétration du C<sup>14</sup>- acetonide de fluocinolone était plus faible chez les Noirs que chez les Blancs (STOUGHTON, 1972 [247]; HERNANDEZ et MERCIER-FRENZEL, 1994 [108]).

#### Le sexe

La structure cutanée de l'homme et de la femme est identique. Cependant, il y a quelques différences. La peau masculine est légèrement plus épaisse que la peau des femmes. Les follicules pileux sont plus nombreux chez les hommes que chez les femmes, d'où une absorption cutanée plus accentuée (HERNANDEZ et MERCIER-FRENZEL, 1994 [108]).

#### L'âge

La peau de l'enfant est plus perméable que celle de l'adulte. Le ratio surface corporelle/poids de l'enfant est trois fois plus important que celui de l'adulte. Cette différence fait que l'application d'une même dose de produit peut être beaucoup plus toxique chez un

enfant que chez un adulte car la quantité absorbée par unité de poids est beaucoup plus importante. Kristopher et Klingman en 1965 ont montré que l'absorption percutanée de la C<sup>14</sup> testostérone était plus importante chez les sujets jeunes (19-30 ans) que chez les sujets âgés (71-82 ans). L'intense circulation cutanée favorise l'absorption en accélérant le renouvellement de la phase liquide en contact avec le SC.

D'autre part, le vieillissement entraîne un amincissement au niveau de l'épiderme et du derme provoquant une augmentation de l'absorption cutanée. Mais le ralentissement du renouvellement du SC, constaté chez les sujet âgés, favorise la persistance des molécules au niveau du SC (le temps de renouvellement du SC est le double chez la personne âgée par rapport à une personne jeune). De plus, le nombre de capillaires dermiques diminue et la jonction dermo-épidermique est aplatie, ce qui diminue sensiblement la surface de contact et par conséquent l'absorption cutanée (KLIGMAN, 1983 [125]; WESTER et MAIBACH, 1983 [265]; ROBERT et BISAILO, 1985 [209]; HERNANDEZ et MERCIER-FRENZEL, 1994 [108]; BOLOGNIA, 1995 [26] ; MAC-MARY et Coll., 1996 [151])

#### **L'intégrité de la peau**

Certaines conditions pathologiques et lésions de la couche cornée protectrice peuvent modifier l'absorption. Les phénomènes inflammatoires, le psoriasis et autres processus inflammatoires modifient la perméabilité cutanée (KLIGMAN, 1983 [125]; ROBERT et BISAILO, 1985 [209]).

#### **L'hydratation et occlusion**

L'hydratation du SC augmente considérablement sa perméabilité. La perméabilité de la couche cornée hydratée est 10 fois supérieure à celle du SC. Il a même été démontré que l'hydratation cutanée permettait de diminuer la concentration du produit appliqué de 5 à 15 %. L'augmentation de la teneur en eau du SC peut se faire par migration de l'eau des couches profondes, par un apport externe ou par occlusion. Le pourcentage d'eau peut ainsi être augmenté jusqu'à 50 %.

L'hydratation cornée peut être augmentée par occlusion (couvrir la région d'application par une membrane). L'occlusion augmente la température locale, puis favorise une vasodilatation qui va augmenter l'absorption cutanée. Elle empêche l'évaporation de l'eau et de certaines substances (gaz carbonique) et prolonge le contact de la préparation avec la peau. L'influence de l'occlusion sur l'absorption cutanée est la somme de tous ces phénomènes (MALKINSON et FERGUSON, 1955 [158] ; VICKERS, 1963 [259] ; STOUGHTON, 1972

[247] ; MAYNADIER et PEYRON, 1980 [167]; PRUNIERAS, 1981 [201]; IDSON, 1983 [111]; ZATZ, 1983 [273]; HERNANDEZ et MERCIER-FRENZEL., 1994 [108]; MAKKI et Coll., 1996 [157]).

Les principaux effets nuisibles de l'occlusion (surtout quand elle est prolongée) :

- Hyper-hydratation cutanée
- augmentation et modification de la flore microbienne cutanée
- augmentation du gaz carbonique
- augmentation du pH cutané.

### **Le pH**

Le pH du véhicule et de la peau sont très importants pour la diffusion des substances. Les propriétés acide ou alcaline des substances topiques ont une influence sur la solubilité et le coefficient de partage de la molécule dans les différentes couches de la peau et par suite sur la pénétration des substances. Le pH a une influence sur le degré d'ionisation de certaines molécules. Si les valeurs du pH cutané sont trop élevées ou trop basses, on peut craindre une lésion cutanée. Ce facteur doit être évalué avec précision (ZATZ ,1983 [274] ; WAGNER et Coll., 2003 [262]).

### **La Température**

La température est un paramètre essentiel dont il faut tenir compte dans les expérimentations *ex-vivo* et *in-vivo* de l'absorption cutanée. Les études cliniques de libération transdermique de nicotine, nitroglycérine, clonidine et méthyle-salicylate ont démontré une augmentation significative du taux d'absorption, avec un pic de concentration considérable, après avoir exposé des sujets à un milieu chaud (sauna) et après des exercices physiques (VANAKISKI et SEPPALAT, 1998 [253]).

#### **1.4.2.2. La formulation**

##### **La forme galénique**

La forme galénique d'un produit dermo-cosmétique (lotion, gel, crème... etc.) a une influence sur la pénétration cutanée de la substance et/ou sur sa vitesse d'absorption. Toutefois, dans certains cas où l'excipient hydrophile perd son eau et forme un film à la surface cutanée, l'absorption augmente par effet occlusif.

Dans le cas des gels, le filmogène est isolant. La répétition d'applications de couches successives est donc sans intérêt. La première couche desséchée sert d'obstacle à la pénétration du principe actif.

Les gels hydrophiles ne facilitent généralement pas la pénétration du fait du film de polymère qu'ils déposent sur la peau ; c'est pourquoi ils contiennent très souvent une assez forte proportion d'éthanol qui permet une meilleure effraction de la barrière cutanée.

Les véhicules anhydres tels que la vaseline ont un rôle important dans la pénétration cutanée. Ils sont très lipophiles et occlusifs. Ils agissent comme un patch occlusif qui augmente l'hydratation cutanée, favorisant ainsi le passage de molécules hydrophiles (ZATZ, 1983[274]; ROBERT et Coll., 1985[209] ; MARTINI, 1996 [161]).

### **La fonction réservoir du SC**

L'étude de pénétration percutanée de l'hydrocortisone chez les singes 'Rhésus' a démontré que la quantité absorbée augmente entre la première application (1er jour) et la dernière (8ème jour) dans un traitement 'dose unique' par jour. D'autre part, dans une étude récente de doses multiples de C<sup>14</sup>hydrocortisone, l'augmentation d'absorption était significative avec une application 3 fois/jour comparée à 1 fois/jour. La cause de cette augmentation ne peut être expliquée que par la fonction réservoir que joue le SC (WESTER et Coll., 1980 [267]; WESTER et Coll., 1995 [266]; BENFELDE, 1999 [16]).

### **Les promoteurs d'absorption**

(MAYNADIER et PEYRON, 1980 [167]; ROBERT et BISAILO, 1985 [209])

#### **a) Solvants aprotiques comme Le dimethylsulfoxyde (DMSO)**

Le DMSO est considéré comme un des plus puissants accélérateurs d'absorption cutanée. Il est capable de multiplier par 20 la pénétration de l'eau *in-vivo* et majore très fortement l'absorption de nombreuses substances. Malheureusement, les effets irritants et toxiques limitent l'utilisation du DMSO comme celle des autres solvants aprotiques.

#### **b) Solvants organiques**

Les solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol, l'éther, l'acétone...etc., sont considérés comme dénaturants pour le SC. Des mélanges éthanol-éther sont capables

d'extraire 10 à 20 % du matériel lipidique du SC, transformant ainsi la couche cornée en une membrane poreuse non sélective.

### c) Modificateurs de la kératine

Ce sont des substances qui peuvent augmenter la perméabilité cutanée en modifiant chimiquement la kératine du SC. Les plus connues sont l'acide salicylique (kératolytique), l'urée, l'allantoïne et l'acide lactique (ramollissent en hydratant la kératine). L'urée et l'acide salicylique multiplient par deux la pénétration cutanée de l'hydrocortisone.

### d) Surfactants

Les surfactants peuvent augmenter la pénétration cutanée de nombreuses substances : hexachlorophène, sels de nickel, corticostéroïdes ... etc. Les surfactants anioniques (lauryl sulfate de sodium) sont les plus actifs, suivis par les cationiques et les non ioniques.

### e) Autres substances

L'azone (dodecylazacyclo-heptan-2-one), présente une activité 12 fois supérieure à celle des solvants aprotiques, tout en conservant une très faible toxicité. L'insectifuge N, N-diethyl-m-toluamide est aussi utilisé comme accélérateur de l'absorption.

### **1.4.2.3. Nature du principe actif**

La peau se comporte comme un filtre qui laisse passer les molécules d'une certaine grosseur. Les longues molécules linéaires plus ou moins ramifiées (molécules lipophiles) ont moins de facilité pour s'insérer entre les cellules cornées que des molécules de forme plus ramassée (hydrophile). Plus la molécule est grosse (augmentation de la lipophilie), plus son coefficient de diffusion est faible. Les substances lipophiles s'accumulent dans le ciment intercellulaire et se séparent difficilement. Les substances hydrophiles ne peuvent traverser que si la peau est hydratée au maximum et elles ont tendance à demeurer dans les véhicules aqueux sauf si ces derniers s'évaporent. Les molécules les plus aptes à pénétrer sont de polarité amphiphile car elles possèdent une partie hydrophile et une partie lipophile (ZATZ, 1983 [273]; ROBERT et BISAILO, 1985 [209]; MARTINI, 2003 [162]).

### 1.4.3. Méthodes d'évaluation cutanée des produits topiques

L'évaluation de la pénétration cutanée d'une molécule est très importante pour deux raisons essentielles :

- **En thérapeutique**, afin de connaître le niveau d'action de cette molécule (à la surface de la peau, dans l'épiderme, le derme) et pour connaître le pourcentage de substances ayant traversé la peau par rapport à la quantité appliquée.
- **En cosmétologie**, pour pouvoir évaluer la limite de diffusion de la molécule et son pourcentage de pénétration par rapport à la quantité appliquée, dans le but d'éviter un passage systémique important et de connaître la quantité fixée dans les différentes couches de la peau.

En général, différentes techniques sont utilisées pour mesurer l'évaluation de l'absorption transcutanée et le choix de la méthode dépend du type d'étude à réaliser et du protocole d'application à envisager (AGACHE, 2000 [6]; LEVEQUE et Coll., 2004 [142]).

#### 1.4.3.1. Les méthodes *ex-vivo*

##### 1.4.3.1.1. Les cellules de Franz

La méthode des cellules de Franz est une des techniques de diffusion la plus utilisée pour une évaluation *ex-vivo* du passage cutané des produits médicamenteux et cosmétiques. Une solution (ou formulation) contenant la molécule à étudier est déposée dans la chambre donneuse. La molécule diffuse ensuite à travers une membrane et elle est collectée dans la chambre réceptrice (FRANZ, 1975 [87]). Afin de limiter les études réalisées *in-vivo* sur l'homme ou l'animal, les tests *ex-vivo* ont été développés pour des études préliminaires de la pénétration de produits topiques (CASTIEL-HIGOUNEC et GALL, 1996 [35]). Cette technique peut être utilisée avec occlusion et sans occlusion.

##### 1.4.3.1.2. La dialyse d'équilibre

C'est une méthode qui peut être réalisée seulement en état occlusif (MAKKI et Coll., 1991) [1].

### **1.4.3.2. Les méthodes *in-vivo***

#### **1.4.3.2.1. Les bulles de succion**

(KIISTALA et MUSTAKALLION, 1967 [123]; LOWE et VANDER LEUN, 1968 [150]; KIISTALA, 1972 [122]; MURET et MARY, 2000 [179])

Une dépression appliquée sur la peau provoque un décollement au niveau de la jonction dermo-épidermique avec formation d'une bulle remplie de liquide interstitiel. Ce phénomène avait déjà été observé par Unna, un dermatologue allemand, en 1878, puis repris par Weidenfeld en 1900. En 1950, Blank et Miller ont utilisé la technique des bulles de succion *in-vitro* sur peau d'abdomen et en 1956, Bielecky a utilisé cette technique *in-vivo* sur des peaux pathologiques. En 1967, Kiistala et Mustakallio ont étudié la perméabilité cutanée par cette méthode. Les bulles de succion sont considérées comme une technique invasive.

#### **1.4.3. 2.2. Les biopsies**

Elles consistent à prélever une portion de tissu d'un organe, afin de pouvoir l'étudier (en histologie ou en biochimie). C'est une méthode invasive, ce qui limite la répétition des mesures (FARMER, 2000 [81])

#### **1.4.3. 2.3. La méthode de stripping**

Elle consiste à arracher les couches du SC à l'aide d'un ruban adhésif pour mesurer la quantité d'une substance ayant pénétré le SC. Cette méthode est utilisée *in-vivo* pour prédire la pénétration trans-épidermique chez l'homme (SCHAEFER et Coll., 1998 [232]).

#### **1.4.3. 2.4. La méthode des différences**

Elle consiste à explorer le taux de pénétration d'un produit à partir de la quantité restante à la surface de la peau en fin d'étude (CASTIEL-HIGOUNENC et GAIL, 1996 [35]).

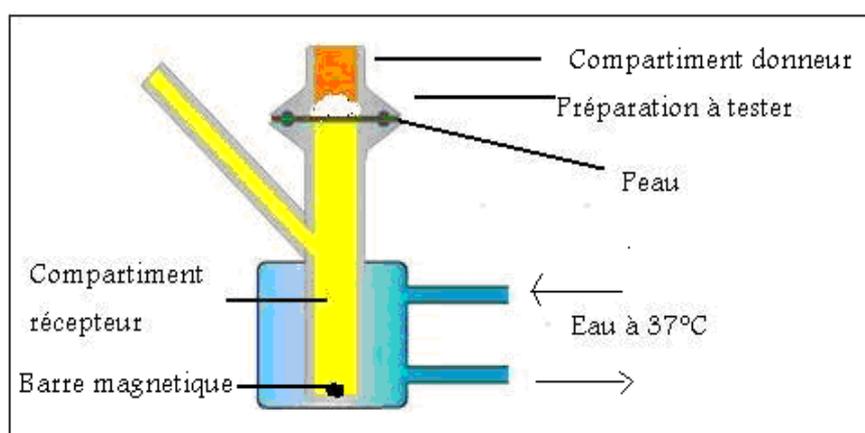
#### **1.4.3. 2. 5. La microdialyse**

C'est une technique qui permet la collecte de molécules au niveau du derme ou de l'hypoderme. Le principe de la microdialyse a été développé par Ungerstedt en 1984, en insérant pour la première fois une sonde au niveau d'un cerveau de rat afin de collecter des neurotransmetteurs. Cette technique est aujourd'hui utilisée, *in-vivo*, dans différents tissus tels que le foie, le cœur, les reins, les muscles ou la peau (ELMQUIST et SAWCHUK, 1997 [77]). Au niveau dermique, cette technique a été appliquée pour évaluer l'absorption cutanée de différentes substances dans les préparations topiques. C'est une technique peu invasive qui

fournit les informations pharmacocinétiques directement des organes cibles. Elle donne la possibilité de collecter au niveau du derme des substances aussi bien endogènes qu'exogènes et aussi bien *ex-vivo* qu'*in-vivo* (KREILGAARD, 2002 [129]; LEVEQUE et Coll., 2004 [142]; MARY et Coll., 1998 [II]).

### 1.4.4. Les Cellules de Franz

Dans notre étude, nous avons utilisé les cellules de Franz comme technique d'évaluation de passage cutané *ex-vivo* (Figure 21). C'est une méthode recommandée par COLIPA (DIEMBECK et Coll., 1999 [64]; EC, 2004 [69]) et elle est utilisée dans un grand nombre d'études d'évaluation des molécules cosmétiques (Tableau 4).



**Figure 21** : Schéma représentatif de la Cellule de Franz.

Auteurs	Substance Cosmétique
PATIL et Coll., 1995 [195]	Sodium Lauryl Sulfate
BRINON et Coll., 1999 [31]	Benzophénone-4 (Filtre solaire)
Cal et SZNITOWSKA, 2003 [34]	Terpens acyclique
STAILING et Coll., 2003 [245]	p-phenylenediamine (Teinture de cheveux)
VAN SANDT et Coll., 2004 [255]	Caféine et acide benzoïque
SANTHANAM et Coll., 2004 [220]	N, N-diethyl-m-toluamide
VENIER et Coll., 2004 [256]	5 glycols éthers

**Tableau 4** : l'utilisation des cellules de diffusion dans les études de pénétration cutanée des différentes substances utilisées en cosmétologie.

### 1.4.4.1. Principe des Cellules de Franz

#### a) La membrane

Pour réaliser les études de pénétration et d'absorption cutanées, *ex vivo*, en utilisant les cellules de Franz, plusieurs sortes de membranes sont utilisées : peau humaine, peau animale ou bien des membranes synthétiques.

#### b) La phase réceptrice

La partie réceptrice contient un liquide receveur pour remplacer la microcirculation physiologique. Ce liquide peut varier selon la polarité de la molécule étudiée. Avec les molécules hydrophiles, une solution saline tamponnée est utilisée, et concernant les molécules lipophiles, une solution d'albumine pure ou mélangée avec d'autres solubilisateurs (les surfactants non ioniques) (DIEMBECK et Coll., 1999 [64]). La phase réceptrice la plus couramment utilisée est le tampon phosphate à pH 7,4. Si la substance est lipophile, l'albumine est alors nécessaire (BRONAUGH et STEWART, 1985 [32]). La phase réceptrice est prélevée à intervalle de temps régulier et la molécule est dosée afin de déterminer la cinétique de pénétration cutanée.

La quantité de produit retrouvée dans le liquide receveur est considérée comme biodisponible car elle correspond à la quantité qui serait passée dans la circulation systémique. En effet, le derme étant très vascularisé, les quantités de produits présentes dans la couche dermique de la peau sont considérées comme biodisponibles, tandis que celles retrouvées dans le SC ne sont pas biodisponibles (car ce sont des cellules mortes (cornéocytes) qui n'ont pas de contact avec la circulation sanguine). De plus, cette couche est sans arrêt renouvelée par une desquamation régulière (STEILING et Coll., 2001 [245]).

Nous pouvons ainsi estimer la pénétration cutanée, *in-vivo*, en extrapolant les données *ex-vivo*. Dans certain cas, la partie donneuse peut être recouverte, afin de prévenir l'évaporation : ceci provoque un effet occlusif. Selon le type d'étude, le derme peut être séparé de l'épiderme au niveau de la jonction dermo-épidermique grâce à la chaleur (FERGUSON, 1977 [85]; DIEMBECK et Coll., 1999 [64]). Un stripping peut être également réalisé pour imiter le processus physiologique de desquamation (SCHAEFER et REDELMER, 1996 [231]).

### c) Expérimentations

La peau est positionnée entre la cellule donneuse et la chambre réceptrice. Le tout est clampé avec une pince métallique. La partie supérieure est ouverte et en contact avec l'air. La partie inférieure est close : le fluide dans la chambre réceptrice est maintenu à 37°C grâce à un bain-marie. L'agitateur magnétique permet d'obtenir un mélange homogène de la substance à étudier avec le liquide récepteur. Généralement, il est souhaitable de ne pas dépasser une durée d'étude de 24 à 36 heures pour que la peau ne soit pas abîmée (BARTNIK et Coll., 1987 [14]; DIEMBECK et Coll., 1999[64]).

La durée de l'étude est choisie selon la nature et la destination d'utilisation de la molécule testée (DIEMBECK et Coll., 1999 [64]):

- Préparations avec rinçage : la préparation est déposée sur la peau pour un temps strict. Le fragment de peau sera rincé et puis l'expérimentation continue sur 24 heures.
- Préparations sans rinçage : la préparation reste sur la peau pour une durée de 24 heures maximum. Or pour évaluer la pénétration cutanée, la viabilité de la peau n'est pas nécessaire car il s'agit d'une diffusion passive.

Il existe différents types de cellules de diffusion :

- Pour les cellules statiques, les aliquots de la phase réceptrice sont prélevés durant l'expérience ou à la fin (cellules de Franz).
- Pour les cellules dynamiques, on pompe le liquide récepteur de la chambre réceptrice de la cellule avec une pompe péristaltique. Après avoir quitté la cellule, le liquide est collecté dans un collecteur de fraction automatique. Cette technique donne la possibilité d'un prélèvement et d'un remplissage automatique du milieu récepteur.

### 1.4.5. Quantification des molécules après passage cutané

Une fois la molécule passée à travers la membrane de la cellule de Franz vers le liquide récepteur, une nouvelle étape commence : la quantification de la molécule.

Plusieurs types de techniques analytiques sensibles sont utilisés :

- HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance, CLHP).
- Spectrométrie de masse
- Absorption atomique etc....

Durant notre travail, nous avons choisi l'HPLC qui est une technique utilisée fréquemment pour analyser les substances collectées par cellules de diffusion (LATOURE, 1982 [138] ; BONNEAU, 1987 [28]; KREJCI et Coll., 1987 [130] ; NAGELS, 1997 [181]).

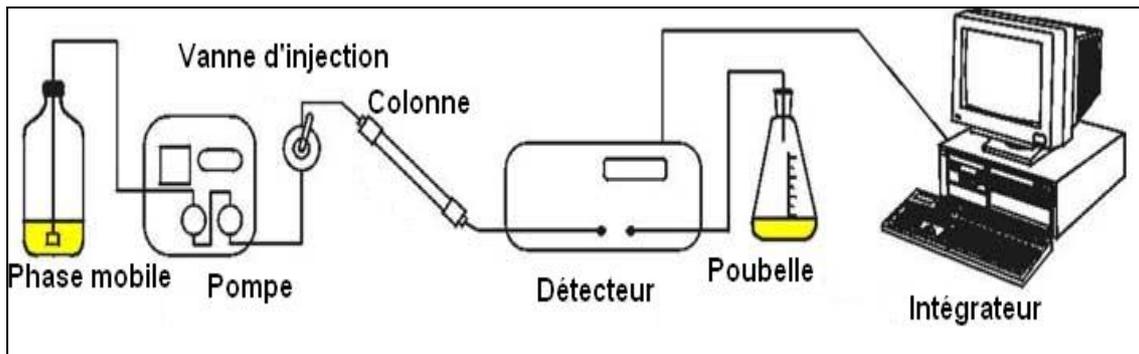
Parmi les avantages de cette technique, il est utile de citer :

- C'est une méthode simple.
- Elle est moins coûteuse que le chromatographe gazeuse couplée au spectromètre de masse.

De plus, l'HPLC connaît une vaste utilisation dans la quantification de molécules utilisées en cosmétologie (Tableau 5).

<b>Auteurs</b>	<b>Substance Cosmétique</b>
SCALIA et Coll.; 1995 [227]	Vitamine A palmitate, Vitamine E
POTARD et Coll.; 1999 [199]	Caféine
LABAT et Coll.; 2000 [133]	Méthyl, ethyl, propyl, butyl- Parabène
CHISVERT et Coll.; 2001 [40]	Sulisobenzone, oxybenzone, etc. (Filtres d' UV)
STEILING et Coll.; 2001 [245]	bis-(5-amino-1-hydroxyphenyl)-méthane (Teinture de cheveux)
CHANG, CHANG; 2003 [38]	Glycolique acide et arbutin (Agents blanchisseur de peau)
SARVEIYA et Coll.; 2004 [225]	Octylsalicylate (Filtre solaire)

**Tableau 5** : L'utilisation de l'HPLC dans la quantification des substances utilisées en cosmétologie



**Figure 22** : Schéma de l' HPLC : La phase mobile fait migrer les différents constituants de l'échantillon et ceci d'autant plus lentement qu'ils auront d'affinité pour la phase stationnaire (colonne). Les constituants séparés passeront dans un détecteur spécifique et seront quantifiés par un système d'intégration.

Le principe de dosage de l'HPLC résulte de la distribution dynamique des solutés à analyser entre deux phases non miscibles :

- Une phase stationnaire liquide ou solide.
- Une phase mobile liquide.

Les molécules se répartissent dans deux phases non miscibles jusqu'à l'établissement d'un équilibre. Cette répartition dépend des propriétés de chaque molécule vis-à-vis des phases considérées. Le système (Figure 22) est composé :

- d'un ou plusieurs réservoirs de phase mobile qui contiennent soit des solvants purs soit des mélanges de solvants de concentrations connues.
- d'une pompe qui permet un bon écoulement de la phase mobile dans la colonne.
- d'un système d'injection.
- d'une colonne en acier inox, de quelques centimètres de long et de 1 à 8 mm de diamètre. La phase stationnaire est immobilisée à l'intérieur.
- d'un détecteur qui permet à la fois de mettre en évidence la sortie des solutés de la colonne en indiquant le temps de rétention qui est propre à chaque constituant et de donner un signal dont l'aire sous la courbe est proportionnelle à la quantité de chacun des constituants d'un mélange.

## *1.5. Les parabènes*

---

## 1.5. LES PARABENES

---

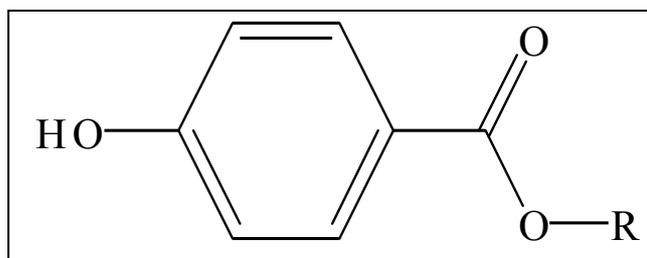
### Sommaire

1.5.1. Propriétés physicochimiques des parabènes .....	82
1.5.1.1. Synthèse des parabènes .....	82
1.5.1.2. Méthyl parabène (MP) .....	83
1.5.1.3. Ethyl parabène (EP) .....	83
1.5.1.4. Propyl parabène (PP).....	84
1.5.1.5. Butyl parabène (BP) .....	84
1.5.2. Utilisation des parabènes.....	84
1.5.3. Pharmacocinétique des parabènes .....	86
1.5.4. Réglementation de l'utilisation des Parabènes .....	87
1.5.5. Les effets secondaires des parabènes .....	89
1.5.5.1. Les parabènes sont allergisants .....	89
1.5.5.2. Les parabènes ont une activité oestrogénique (estrogen-like activity) .....	89
1.5.5.3. Les parabènes ont un effet spermato-toxique.....	90
1.5.5.4. Les parabènes sont-ils cancérigènes ? .....	90
1.5.5.5. Le méthyl parabène et le soleil.....	90
1.5.5.6. L'effet du méthyl parabène sur les kératinocytes du Stratum Corneum .....	91
1.5.5.7. Les parabens inhibent l'activité cutanée humaine de l'estrogène sulfortransferase .....	91
1.5.5.8. Les méthyl-, propyl- et butyl-parabène peuvent provoquer une irritation oculaire .....	91

Les PDC contiennent plusieurs sortes de substances chimiques : des principes actifs, des surfactants, des conservateurs, des parfums, des promoteurs d'absorption, des colorants....etc. Ces molécules chimiques sont en contact avec la peau humaine et possèdent un potentiel de pénétration important et parfois, dans certaines conditions, un éventuel passage dans la circulation générale.

Comme la plupart des PDC contiennent de l'eau, les conservateurs sont recommandés pour assurer une prévention contre les micro-organismes. Les parabènes sont les conservateurs les plus utilisés dans les PDC tels que les shampoings, lotions, déodorants...etc.

Les parabènes sont des substances synthétisées par estérification à partir d'un composé chimique, l'acide para-hydroxybenzoïque (PHBA). Ils possèdent une structure simple (Figure 23) formée de 6 atomes de carbone avec un groupe hydroxyle (-OH) et un groupe alkyl ester de part et d'autre. Ils sont repérés dans les produits alimentaires comme additifs : de E 214 à E 219 (EFSA, 2004 [70]). Dans les produits cosmétiques, ils apparaissent sous leur nom propre, comme Méthyl parabène (MP), Ethyl parabène (EP), Propyl parabène (PP), Butyl parabène (BP).



**Figure 23** : Structure de l'acide *p*-hydroxybenzoïque.

- Si R = CH<sub>3</sub> → Méthyl parabène
- Si R = CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub> → Ethyl parabène
- Si R = CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> → Propyl parabène
- Si R = CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub> → Butyl parabène

Les parabènes existent aussi à l'état naturel dans certains aliments (ALI et Coll., 1998 [8]):

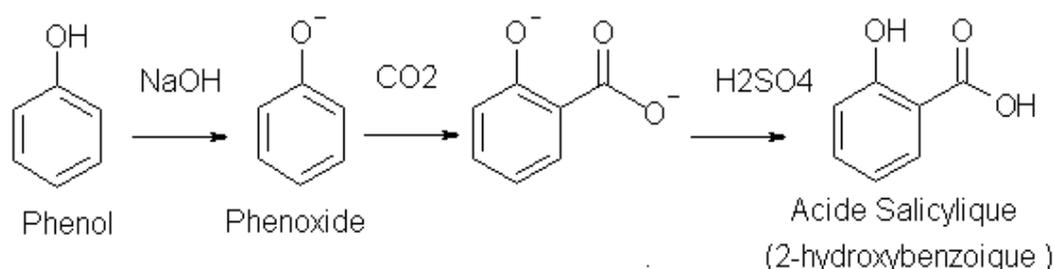
- MP se trouve dans les mûres, jus de fruits de la passion, vin blanc, vanille bourbon.
- PP se trouve dans la partie aérienne de la plante *Stocksia brahuica* de la famille Sapindacée.

Pour réaliser un effet anti-bactérien, les parabènes inhibent le processus des mitochondries des microorganismes et leur transport membranaire. L'activité antimicrobienne des parabènes augmente quand leur lipophilie augmente. L'addition du propylène glycol dans une formulation contenant des parabènes augmente l'activité antimicrobienne de ces derniers. De plus, lorsqu'ils sont dissous dans un véhicule aqueux, il existe une corrélation entre leur  $\text{Log}_{10}P$  (polarité) et leur perméabilité, car plus ils sont lipophiles, plus ils sont solubles dans le SC (DONALD, 1980 [68]; DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54]; FCC,1996 [82]; ALI et Coll., 1998 [8]; GRUVBERGER et Coll., 1998 [97]; SONI et Coll.; 2001 [241]; 2002[243]; 2005 [242]).

## 1.5.1. Propriétés physicochimiques des parabènes

### 1.5.1.1. Synthèse des parabènes

La réaction de Kolbe, appelée parfois **réaction de Kolbe-Schmitt** (Figure 24), est une réaction de carboxylation où le phénolate de sodium (le sel de sodium du phénol) est d'abord traité avec le dioxyde de carbone sous pression (100 atmosphères) à  $125^\circ$ , puis avec l'acide sulfurique. Le produit final est un acide hydroxy aromatique dont l'acide salicylique (acide o-hydroxybenzoïque), précurseur de l'aspirine, est un exemple notable. Dans cette réaction, il se forme aussi du p-hydroxybenzoïque.



**Figure 24** : Synthèse de l'acide 2-hydroxybenzoïque

L'acide p-hydroxybenzoïque (PHBA) se forme en modifiant la réaction de Kolbe-Schmitt par l'utilisation de potassium phénoxyde et du dioxyde de carbone. L'estérification du PHBA par un alcool approprié (selon la molécule) donne les parabènes (KOLBE, 1860 [126]; SHMITT, 1883 [237]; LINDSEY et JESKEY, 1957 [146]; SHAKIROV et Coll., 1983 [236]; LACK et FUCHS, 1992 [134])

### **1.5.1.2. Méthyl parabène (MP)**

(SIRI MSDS INDEX, 2007 [239] ; MERCK INDEX, 2007 [171]; SONI et Coll., 2005 [242])

Le MP (CAS No 99-76-3, E 218) est connu sous plusieurs noms :

- 4-Hydroxybenzoic acid methyl ester
- Methyl p-hydroxybenzoate
- Tegosept M
- Methyl Chemosept
- Methyl Parasept.

De couleur blanche, un gramme est dissout dans 400 ml d'eau, dans 70 ml de glycérol chaud, très soluble dans l'alcool, dans l'acétone et dans l'éther. Sa solubilité dans l'eau est de 0.25 % w/w à 20°C et de 0.3 % w/w à 25°C. Sa masse moléculaire est de 152.15 Da et son point de fusion est de 131°C.

### **1.5.1.3. Ethyl parabène (EP)**

(SIRI MSDS INDEX, 2007 [239] ; MERCK INDEX, 2007 [171]; SONI et Coll., 2005 [242])

L'EP (CAS No 120-47-8, E 214) est connu sous plusieurs noms :

- 4-Hydroxybenzoïque acide ethyl ester
- Ethyl p-hydroxybenzoate
- Ethyl Parasept
- Solbrol A

L'EP est préparé par une estérification de cristaux d'acide p-hydroxybenzoïque. Il est très soluble dans l'alcool et dans l'éther. Sa solubilité dans l'eau à 20°C est de 0.070 % w/w et à 25°C, elle est de 0.075 % w/w. Sa masse moléculaire est de 166.18 Da et son point de fusion est de 116°C.

#### **1.5.1.4. Propyl parabène (PP)**

(SIRI MSDS INDEX, 2007 [239] ; MERCK INDEX, 2007 [171]; SONI et Coll., 2005 [242])

Le PP (CAS No 94-13-3, E 216) est connu sous plusieurs noms :

- 4-Hydroxybenzoic acid propyl ester
- Propyl p-hydroxybenzoate
- Ethyl Parasept
- Solbrol A

Ce sont des cristaux blancs, ayant une solubilité très faible dans l'eau chaude. Il est très soluble dans l'alcool et dans l'éther. Sa masse moléculaire est de 180.20 Da et son point de fusion est de 96°C.

#### **1.5.1.5. Butyl parabène (BP)**

(SIRI MSDS INDEX, 2007 [239] ; MERCK INDEX, 2007 [171]; SONI et Coll., 2005 [242])

Le BP (CAS No 99-76-3) est connu sous plusieurs noms :

- 4-Hydroxybenzoic acid butyl ester
- n-Butyl p-hydroxybenzoate
- Butopten
- Butyl Chemosept
- Butyl Parasept
- Tegosept Butyl

C'est une poudre cristalline, soluble dans l'acétone, l'alcool, l'éther, le chloroforme et le propylène. Sa masse moléculaire est de 194.23 Da et son point de fusion est de 69-68 °C.

### **1.5.2. Utilisation des parabènes**

La contamination microbienne est le problème majeur qui peut altérer la sécurité des formulations galéniques. Le développement des microbes dans un médicament ou un produit cosmétique dépend de la composition de la phase aqueuse, des composants chimiques et même aussi des conditions physiques (température, humidité...etc.). Le choix d'un bon conservateur est vivement recommandé, puisque ce choix influence les caractéristiques des

formulations cosmétiques au niveau de leur couleur, odeur, viscosité...etc. (DONALD, 1980 [68]).

Les parabènes sont utilisés depuis 1920 (SABALITSCHKA, 1930 [216]; SONI et Coll., 2005 [242]) pour prévenir le développement des bactéries et des champignons dans un grand nombre de produits d'hygiène, alimentaires, médicaments et produits cosmétiques. Ces molécules ont différentes activités biologiques.

Un rapport publié en 1984 par Elder et Busch [73] a montré que les parabènes sont présents dans près de 13 200 produits cosmétiques différents. Rastogi et Coll. en 1995 [204] ont détecté les parabènes dans 77 % des produits cosmétiques rincés et dans 99 % sans rinçage. La concentration totale des parabènes dans ces formulations cosmétiques était de 0.01 % à 0.87 %

Les parabènes présentent les critères d'un conservateur idéal. En général, leurs avantages d'utilisation dans une formulation cosmétique peuvent être résumés par les points suivants :

- Possèdent un large spectre contre les bactéries et les champignons.
- Ont un faible degré de toxicité.
- Sont efficaces même à faible dose.
- Sont stables dans des différents degrés de pH et dans l'air.
- Résistent en cas d'hydrolyse dans l'eau ou bien dans des solutions acides.
- Sont suffisamment solubles dans l'eau pour produire une efficacité dans la phase aqueuse.
- Leur usage est sécurisé, relativement non irritant.
- Sont sans couleur, ni odeur, ni goût.
- Ils sont considérés par les laboratoires comme les conservateurs les plus efficaces et sont depuis quelque temps les plus décriés.

(CTFA, 1973 [51]; ELDER, 1984 [72]; DAL POZZO and PASTORI, 1996 [54]; OISHI, 2004 [192]; SONI et Coll.; 2001 [241] ; 2002 [243] ; 2005 [242])

### 1.5.3. Pharmacocinétique des parabènes

(DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54] ; LOBEMEIER et Coll., 1996 [147] ; BANDO et Coll., 1997 [13] ; KITAGAWA et Coll., 1997 [124]; SARTORELLI et Coll., 2000 [224] ; HARVEY, 2003 [103] ; EFSA, 2004 [70]; GOLDEN et Coll., 2005 [92])

Par voie orale, les parabènes sont absorbés d'une façon rapide et presque complète par l'intestin chez les rats, les lapins et les chiens (SONI et Coll.; 2001 [241] ; 2002 [243] ; 2005 [242]). Ils sont hydrolysés par l'estérase hépatique et des enzymes de conjugaison pour donner plusieurs métabolites tels que l'acide para-hydroxybenzoïque (PHBA), des glucuroconjugés et de sulfoconjugés chez le rat et le lapin. L'excrétion urinaire de ces métabolites est d'environ 86 % à 24 heures. Ces études montrent qu'après absorption par voie orale, chez l'animal, les méthyl-, ethyl- et propyl- parabènes sont complètement éliminés par l'organisme et ne s'y accumulent pas.

Bien que les estérases aient une grande influence sur le métabolisme des parabènes par voie orale (surtout après leur premier passage hépatique), les parabènes n'ont pas tout à fait la même pharmacocinétique suite à une application topique. Il est important de rappeler que la peau contient des enzymes capables de catalyser de substances endogènes et exogènes (xénobiotiques) ; cette fonction permet de convertir les molécules lipophiles en molécules solubles dans l'eau qui seront ainsi éliminées par voie biliaire ou urinaire. Les carboxylesterases présentes dans la peau et le tissu adipeux peuvent modifier l'hydrolyse des parabènes en PHBA et peuvent ainsi influencer leur absorption cutanée. Au niveau des produits cosmétiques, les parabènes sont absorbés directement et d'une façon rapide à travers la peau normale. Ce passage transcutané des parabènes est influencé par la présence de plusieurs promoteurs d'absorption ajoutés dans la formulation des cosmétiques.

Selon Lobemeier et Coll. (1996) [147], nous pouvons distinguer quatre types de carboxylesterases capables d'hydrolyser les esters de parabènes. Leurs activités sont basées dans les différentes couches cutanées, et surtout l'hypoderme et son tissu adipeux :

Type 1 : C'est le plus dominant et il préfère généralement le MP. Son activité diminue avec la diminution de la longueur de la chaîne de l'ester de parabène.

Type 2 : Il est localisé dans l'hypoderme et a une activité inhibitrice des organophosphorés.

Type 3 : Parmi tous les esters de parabènes, ceux à la chaîne la plus longue sont les préférés de ces estérases. De plus, leur activité diminue avec la diminution de la chaîne ester du parabène. Ce type d'estérase est extrait des kératinocytes.

Type 4 : cette estérase se trouve dans le sang.

### **1.5.4. Réglementation de l'utilisation des parabènes**

(DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54]; EFSA, 2004 [70]; SONI et Coll., 2005 [242])

Depuis de nombreuses années, les parabènes sont utilisés dans la conservation des produits alimentaires (gelées d'enrobage autour du pâté, viandes séchées, chips, compléments alimentaires liquides, confiseries...etc.) et des produits cosmétiques (crème hydratante, gel douche, anti-perspirant...etc.). Actuellement, les parabènes sont retrouvés dans près de 90 % des cosmétiques mis sur le marché (SONI et Coll., 2005 [242]).

Les parabènes sont usuellement retrouvés dans les produits suivants :

- Crèmes et pommades
- Crèmes barrières
- Produits cosmétiques : crèmes dépilatoires, crèmes solaires, dentifrices, déodorants, lotions après rasage, poudres, savons, bâtons à lèvres, teintures capillaires...etc.
- Ovules et suppositoires
- Solutions injectables
- Gouttes nasales, ophtalmologiques et auriculaires
- Aérosols
- Potions et sirops
- Aliments : assaisonnements, caviar et autres œufs de poisson, conserves de poissons, crèmes, gelées, jambons, jus de fruits, préparations à base de lait, sauces industrielles, sirops, viandes hachées
- Colles et pansements
- Cirages
- Graisses industrielles et huiles.

En tant que conservateurs entrant dans la composition aussi bien des aliments que des produits cosmétiques, ces molécules sont légiférées au niveau national par l'Agence Française de Sécurité des Aliments (AFSA) lorsqu'ils sont contenus dans les aliments et par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) lorsqu'ils sont contenus dans les cosmétiques. L'Union Européenne réévalue régulièrement l'utilisation de tous les conservateurs où leur application dans les produits cosmétiques est réglementée par la directive 76/768/ CEE (du 27 juillet 1976 et ses modifications successives, Annexe VI, part 1, référence 12) :

*« On entend par agents conservateurs les substances qui sont ajoutées comme ingrédients à des produits cosmétiques principalement pour inhiber le développement de micro-organismes dans ces produits. Pour les acide para-hydroxybenzoïques, ses sels et esters (parabènes), la concentration maximale autorisée est de 0,4 % pour un ester et 0,8 % pour les mélanges d'esters. »*

### **1.5.5. Les effets secondaires des parabènes**

Depuis quelques années, des résultats basés sur des études scientifiques publiées au niveau international accusent les parabènes de provoquer plusieurs effets secondaires. En 1956, une première étude sur la toxicité aiguë et chronique de PHBA et du MP, EP, BP, chez les souris, les rats et les chiens a été présentée par Mathews et Coll. [166]. Puis en 1998, Routledge et Coll. étaient les premiers à rapporter une activité oestrogénique aux parabènes. Ils ont confirmé une liaison possible entre les parabènes et les récepteurs oestrogéniques dans l'utérus des rongeurs et les cellules de seins humains (cellules MCF-7).

En 2001, l'Ecole danoise de pharmacie a publié dans son rapport annuel une étude *in-vitro* sur le pouvoir oestrogénique des parabènes. Les résultats ont montré que la prolifération des cellules MCF7 a augmenté avec la dose de parabènes (ANDERSEN et Coll., 2001 [9]). La polémique sur les parabènes a repris après la découverte de parabènes dans les tumeurs de cancer de seins chez la femme (MC GRATH, 2003[168]; DARBRE et Coll., 2004[58]; HARVEY et DARBRE, 2004[104]).

Les effets indésirables des parabènes se sont multipliés et diversifiés selon différents épisodes :

#### **1.5.5.1. Les parabènes sont allergisants**

(ANGELINI et Coll., 1997 [10]; SIMPSON, 1998 [238]; MOWAD, 2000 [177])

Les parabènes peuvent provoquer des allergies de contact. De nombreuses personnes ont été victimes de réactions allergiques aux cosmétiques contenant de parabènes.

#### **1.5.5.2. Les parabènes ont une activité oestrogénique (estrogen-like activity)**

Après plusieurs études utéro-trophiques *in-vitro* et *in-vivo*, Routledge et Coll. [213] ont montré que les parabènes ont un effet oestrogénique faible. Parmi les 4 types d'esters testés, MP, EP, PP et BP, le butyl parabène avait l'activité oestrogénique la plus puissante. Par contre, l'effet oestrogénique du BP est 100,000 fois plus faible que celui du 17 $\beta$ -estradiol (ROUTLEDGE et Coll., 1998 [213]; PEDERSEN et Coll., 2000 [196]) (Annexe 2).

### **1.5.5.3. Les parabènes ont un effet spermato-toxique**

(OISHI, 2001 [189]; 2002 [190] [191])

De nombreuses études ont été menées par OISHI sur des rongeurs pour évaluer les effets oestrogéniques des parabènes (MP, EP, PP, BP). Si le MP et l'EP n'ont présenté aucun effet sur les hormones et les organes reproducteurs, même à très forte dose, le PP a provoqué une réduction de la production de spermatozoïdes. Par contre, l'administration sous-cutanée du BP a engendré, *in vivo*, des réponses utéro-trophiques positives (ROUTLEDGE et Coll., 1998 [213]) (Annexe 2).

### **1.5.5.4. Les parabènes sont-ils cancérigènes ?**

(DARBRE et Coll., 2003 [59]; DARBRE, 2004 [57]; DARBRE et Coll., 2004 [58]; HARVEY et DARBRE, 2004 [104])

En janvier 2004, une étude publiée dans le Journal of Applied Toxicology a révélé la présence de parabènes dans des tissus mammaires cancéreux. L'auteur, Philippa Darbre de l'Université de Reading au Royaume-Uni, ne démontrait cependant pas l'existence d'un lien de cause à effet entre la présence de parabènes et le développement du cancer du sein. Certains parabènes comme le PP, le BP et l'isobutyl parabène ont tout de même des effets oestrogéniques confirmés par de nombreuses publications. Aussi, la coïncidence est-elle suffisamment troublante pour alimenter la polémique (Annexe2).

### **1.5.5.5. Le méthyl parabène et le soleil**

(HANDA et Coll. ; 2006 [100])

Un groupe de chercheurs de l'Université de médecine de Tokyo, en 2006, ont examiné les effets d'exposition des UV-B sur des kératinocytes humains préalablement traités par le MP. Cette étude a montré que le méthyle parabène, appliqué sur la peau à une concentration telle qu'on le trouve dans les produits cosmétiques, peut accélérer le vieillissement cutané si la peau a été exposée au soleil. (Annexe 2).

#### **1.5.5.6. L'effet du méthyl parabène sur les kératinocytes du *Stratum Corneum***

(ISHIWATARI et Coll., 2007 [114])

Dans ce travail, ISHIWATARI et Coll. ont étudié l'effet des MP en dose journalière sur la prolifération des kératinocytes. Ils ont étudié l'effet de l'exposition à long terme de MP sur les kératinocytes en *ex-vivo* et *in-vivo*. Après un mois d'application journalière d'un produit cosmétique contenant du MP, ce dernier persistait sans être métabolisé au niveau du SC. Ces résultats montrent que l'application des formulations topiques contenant du MP entraîne une accumulation du MP dans le SC et que le MP pourrait avoir une influence sur le vieillissement cutané (Annexe 2).

#### **1.5.5.7. Les parabènes inhibent l'activité cutanée humaine de l'estrogène sulfotransférase**

L'estrogène aide dans la prévention du vieillissement cutané. Cette hormone empêche la dégradation du collagène chez les femmes après la ménopause. De plus, l'estrogène maintient l'hydratation de la peau en augmentant l'acide hyaluronique et les mucopolysaccharides (SHAH et MAIBACH, 2001 [235]; BENSALAH et Coll., 2006 [17]). Une étude menée par Prusakiewicz et Coll. en 2007 [202] a montré que les parabènes exercent leur effet oestrogénique (augmentation du taux de l'estrogène dans la peau) en inhibant l'estrogène sulfotransférase (une enzyme qui catalyse l'estrogène) dans la peau. Ces résultats suggèrent qu'une application topique et chronique d'une formulation contenant des parabènes pourrait prolonger l'effet oestrogénique dans la peau, et par suite mener un effet anti-vieillessement (Annexe 2).

#### **1.5.5.8. Les méthyl-, propyl- et butyl-parabène peuvent provoquer une irritation oculaire**

(SIVASEGARAN et Coll., 2007 [240])

Cette étude porte sur la réaction (en fonction du temps) des cornées bovines cultivées au contact du MP, BP et PP présents dans les produits ophtalmiques. Le pouvoir irritant des trois parabènes a été examiné sur les plans optique et cellulaire. Le BP a été trouvé le plus irritant (Annexe 2).

**Mise au point par l'AFSSAPS sur les PARABENES (ROUSSELLE, 2005 [212])**

L'AFSSAPS a mis en place un groupe de travail chargé d'étudier les données toxicologiques et pharmacologiques actuelles et notamment les données sur d'éventuelles perturbations hormonales que pourraient provoquer les parabènes. L'AFSSAPS a indiqué le 29 septembre 2005 que :

*« Les parabènes sont présents dans 80 % des produits cosmétiques en raison de leur efficacité anti-microbienne et de leur relative innocuité, vis-à-vis de des effets sensibilisants, notamment. Les parabènes ont un large spectre d'activité sur les bactéries, les moisissures, les levures et les champignons. Ils sont efficaces à faible concentration et les mélanges de parabènes ont un effet synergique. Ils sont facilement détruits par l'organisme. Des études ont démontré la destruction des parabènes après application sur la peau, ce qui explique la faible exposition systémique du consommateur. Les possibilités de substitution des parabènes par d'autres conservateurs sont limitées, car de nombreux autres conservateurs ne sont pas aussi efficaces et ne présentent pas une aussi bonne tolérance et autant de données de sécurité. Il a été démontré que les parabènes pouvaient dans certaines conditions, franchir la barrière cutanée chez l'animal mais les effets néfastes d'un éventuel passage à travers la peau des parabènes chez l'homme ne sont pas à ce jour démontrés. La plupart des études de toxicité générale (aiguë, sub-aiguë, chronique) réalisées sur différentes espèces animales ont permis de montrer l'absence d'effets toxiques, génotoxiques, cancérigènes et tératogènes de ces composés. Par ailleurs, en raison de leur hydrolyse dans l'organisme, ils ne sont pas susceptibles de s'accumuler dans les tissus. Des effets sur la fertilité ont été rapportés chez l'animal dans certaines études réalisées avec le propylparabène et le butylparabène, à des doses susceptibles aux doses d'exposition humaine. De nouvelles études examinant spécifiquement ces effets ont été réalisées par l'industrie cosmétique. Les rapports complets ont été transmis à l'Afssaps en vue de leur expertise par la commission de cosmétologie.*

*Ainsi, au vu de l'ensemble des données disponibles et des conclusions de comités d'experts de la Commission Européenne dans le domaine cosmétique et alimentaire, et après expertise de l'ensemble des études actuellement disponibles, la commission de cosmétologie du 29 septembre 2005 s'est prononcée favorablement à la poursuite de l'utilisation, aux conditions prévues par la réglementation actuelle, de 4 des 5 parabènes les plus couramment utilisés (méthyl, éthyl, propyl et butyl parabènes).*

*Pour l'isobutylparabène, la commission de cosmétologie s'est montrée favorable à la poursuite de l'utilisation dans les produits cosmétiques de ce conservateur, sous réserve que des études complémentaires soient réalisées permettant de confirmer l'absence de risques, aux conditions d'utilisation dans les produits cosmétiques.*

*Concernant les esters d'alkyle de l'acide parahydroxybenzoïque, notamment le benzylparabène, la commission de cosmétologie a émis des réserves concernant leur utilisation compte tenu du manque de données permettant d'écartier un risque toxique sur la reproduction. Considérant d'une part que les données nécessaires ne seront pas fournies par les industriels et d'autre part, l'absence d'intérêt d'utilisation de ces substances selon les industriels cosmétiques, l'Afssaps proposera au niveau communautaire une inscription nominative des esters évalués favorablement, en lieu et place de la mention générique actuelle 'esters de l'acide parahydroxybenzoïque'. Ceci permettra d'identifier les esters utilisables sans risque, et de ne pas inciter à l'utilisation de substances à risque non évalué »*

*Partie 2*  
*Travaux personnels*

---

# INTRODUCTION

---

L'utilisation des Produits Dermo-Cosmétiques (PDC) augmente de plus en plus. Cette utilisation est courante pour un grand ensemble de la population (enfants, adultes, jeunes et âgées). Ces produits sont fabriqués dans plusieurs pays et circulent dans tous les marchés internationaux. Grâce à la globalisation, les marchés sont inondés de PDC de toutes sortes et de toutes marques.

La directive européenne sur les cosmétiques veille sur la sécurité de molécules utilisées en cosmétologie. Selon ce texte, les cosmétiques ne doivent pas nuire à la santé humaine (DAHINGER-BROOMER, 1996 [52]). Les cosmétiques subissent un grand nombre de contrôles pour vérifier leur sécurité. Mais ces études ne tiennent pas compte de l'application continue journalière et sur de longues périodes, ni du risque d'accumulation que peut engendrer cette utilisation fréquente. D'autre part, l'efficacité n'est pas contrôlée par l'Etat, elle est juste vérifiée par le producteur lui-même.

## **L'objectif de notre travail a été orienté vers :**

1- Une comparaison de plusieurs techniques de quantification du microrelief cutané dans le but de trouver la méthode la plus fiable, surtout à l'heure actuelle où il existe plusieurs techniques utilisées (mécanique avec contact et optique sans contact). Le but de cette comparaison est de s'assurer de la meilleure technique pour contrôler l'efficacité des PDC et par conséquent d'empêcher la publicité mensongère de produits inefficaces, de et protéger le consommateur contre les fraudes.

2- Une étude d'évaluation du passage percutané des molécules susceptibles d'être nocives et utilisées dans la plupart des PDC : les parabènes. Cette partie est divisée en trois sous-chapitres :

2.1.- Etude de solubilité et de polarité des parabènes, dans le but d'établir une relation entre la lipophilie et le passage cutané de ces molécules.

2.2.- Etude *ex-vivo* du passage cutané des parabènes dans une formulation cosmétique commerciale. Les parabènes seront quantifiés après leur passage à travers les couches épiderme-derme.

2.3.- Etude sur les conditions optimales pour une meilleure quantification des substances utilisées dans les produits cosmétiques, au niveau du derme.

## *2.1. Comparaison des techniques de quantification du relief cutané*

---

## 2.1. COMPARAISON DE TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DU RELIEF CUTANE

---

### Sommaire :

2.1. Comparaison de techniques de quantification du relief cutané.....	98
2.1.1. Confection des répliques .....	100
2.1.1.1. Les Répliques Négatives (RN).....	100
2.1.1.2. Les Répliques Positives (RP) .....	101
2.1.2. Etudes qualitatives.....	102
2.1.3. Etudes quantitatives.....	103
2.1.3.1. Profilométrie mécanique .....	103
2.1.3.1.1. Analyse et résultats par Profilomètre .....	104
2.1.3.2. Projection de Franges .....	106
2.1.3.2.1. Les mesure in vivo .....	107
2.1.3.2.1.1. Résultats des mesures in vivo.....	107
2.1.3.2.2. Les mesures in vitro .....	108
2.1.3.2.2.1. Résultats pour les mesures in vitro:.....	108
2.1.4. Conclusion.....	109
2.1.4.1. Résultats du Profilomètre .....	109
2.1.4.2. Comparaison des deux méthodes de la technique de Franges .....	109
2.1.4.2. Comparaison des résultats des différentes techniques .....	110

De l'observation visuelle à la quantification, en utilisant des palpeurs mécaniques ou optiques, les techniques d'évaluation de la microtopographie sont sans cesse en évolution. De nos jours, de nombreux types d'appareils mécaniques et optiques sont utilisés. Ces méthodes qui permettent la caractérisation et la quantification de la microtopographie cutanée ont beaucoup évolué (des procédés mécaniques, optiques) et les chercheurs ont développé dernièrement des techniques dites *in-vivo* (LAGARDE et Coll., 2001 [136]; JACOB et Coll., 2004 [116] ; SANDOZ et Coll., 2004 [219]).

Pour effectuer ces mesures, il est indispensable d'effectuer des empreintes de la peau à étudier. Les répliques du microrelief cutané ont été réalisées sur l'avant-bras droit d'une femme de 25 ans. Cette région est assez plate avec une faible pilosité, facilitant la confection des empreintes. La région cutanée de l'avant-bras a été délimitée à l'aide d'un stylo marqueur pour pouvoir faire plusieurs répliques de la même zone.

Nous avons utilisé le profilomètre comme méthode mécanique de contact et les projections de franges comme technique optique (sans contact). Cette dernière permet de quantifier la microtopographie cutanée *in-vitro* (sur des répliques négatives de la peau) et *in-vivo* (directement sur la surface de la peau).

Dans ce travail nous avons comparé les résultats de plusieurs mesures topographiques des mêmes empreintes après quantification avec ces différentes techniques (mécanique et optique, *in-vitro* et *in-vivo*).

## 2.1.1. Confection des répliques

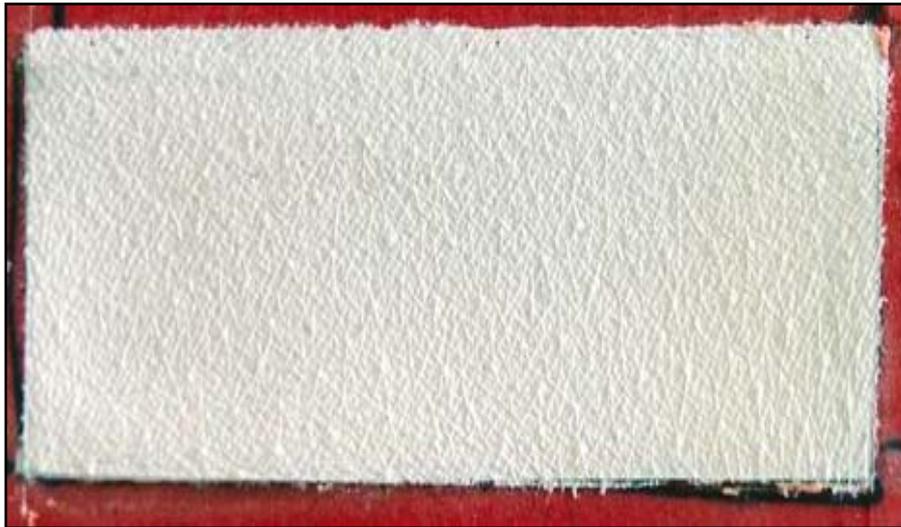
### 2.1.1.1. Les Répliques Négatives (RN)

(MAKKI et Coll., 1979 [155]; MAKKI, 1980 [153])

Les répliques négatives (RN) ont été réalisées à l'aide de Silflo<sup>®</sup> provenant de l'entreprise Digital Surf, à Besançon. Trois ml de Silflo<sup>®</sup> ont été mélangés à 2-3 gouttes d'un catalyseur spécifique. Le mélange doit être bien homogène sinon les parties non mélangées ne pourront se polymériser et la réplique négative sera inutilisable. Lors du moulage de la réplique négative, le sujet est assis, l'avant-bras reposant sur une table et les paumes des mains tournées vers le haut (Figure 25). Un cadre a été confectionné permettant ainsi de contenir le Silflo<sup>®</sup>. Ce cadre est collé sur la peau à l'aide de scotch double face. Sur le cadre est indiqué l'orientation de l'axe du bras à l'aide d'encoche, ainsi que le haut et le bas à l'aide d'un stylo. Cette orientation a été choisie arbitrairement parallèle à l'axe du corps. La zone répliquée est de 6cm<sup>2</sup> (Figure 26).



**Figure 25** : Confection d'une réplique négative à l'aide de Silflo<sup>®</sup> utilisée pour la quantification du microrelief cutané (avant-bras d'une femme de 25 ans)



**Figure 26** : Réplique négative de l'avant-bras d'une femme de 25 ans.

#### **2.1.1.2. Les Répliques Positives (RP)**

(MAKKI et Coll., 1979[155] ; MAKKI, 1980 [153])

Pour le profilomètre mécanique, nous avons besoin de répliques rigides qui peuvent résister au balayage du palpeur dur en diamant. Les répliques positives sont alors confectionnées à l'aide d'une résine : l'Araldite<sup>®</sup>. Grâce à sa rigidité, elle est utilisée pour la quantification de la microtopographie cutanée par le profilomètre mécanique et pour l'observation par microscopie électronique à balayage.

Pour réaliser ces répliques, nous préparons un mélange de polymère composé de 5 volumes d'Araldite<sup>®</sup> et d'un volume de catalyseur spécifique, puis nous homogénéisons le mélange. Ensuite nous plaçons le mélange dans un bac à ultrasons pendant une quinzaine de minutes afin d'en éliminer les bulles d'air qui se sont formées.

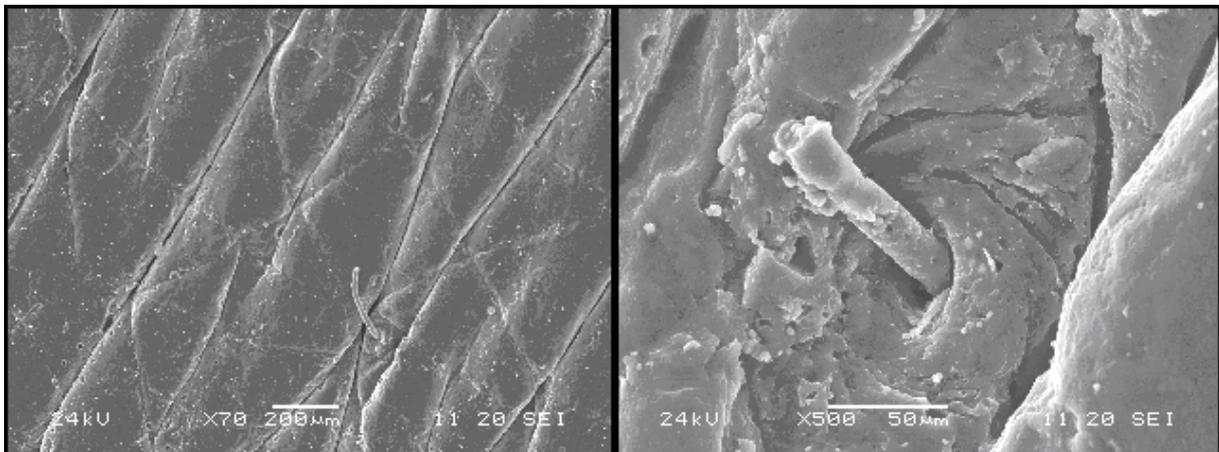
Pendant ce temps, nous réalisons un moule sur les contours de la réplique négative réalisée précédemment, pour que le mélange d'Araldite<sup>®</sup> ne se répande pas, quand nous étalons la préparation sur la réplique négative. Nous laissons la RP se polymériser pendant 24 heures environ. Nous disposons alors d'une réplique positive après séparation de la RN (Figure 27).



**Figure 27** : Réplique positive de l'avant-bras d'une femme de 25 ans

### 2.1.2. Etudes qualitatives

Le Microscope Electronique à Balayage (MEB) a été utilisé pour visualiser l'aspect qualitatif du microrelief cutané à l'aide d'une réplique positive. Le MEB est un appareil qui permet d'obtenir une image grossie de la surface de la peau, pour mieux voir les détails qui peuvent caractériser la surface de la peau (Figure 28).



**Figure 28** : Image d'une réplique positive de l'avant-bras d'une femme de 25 ans par MEB

### 2.1.3. Etudes quantitatives

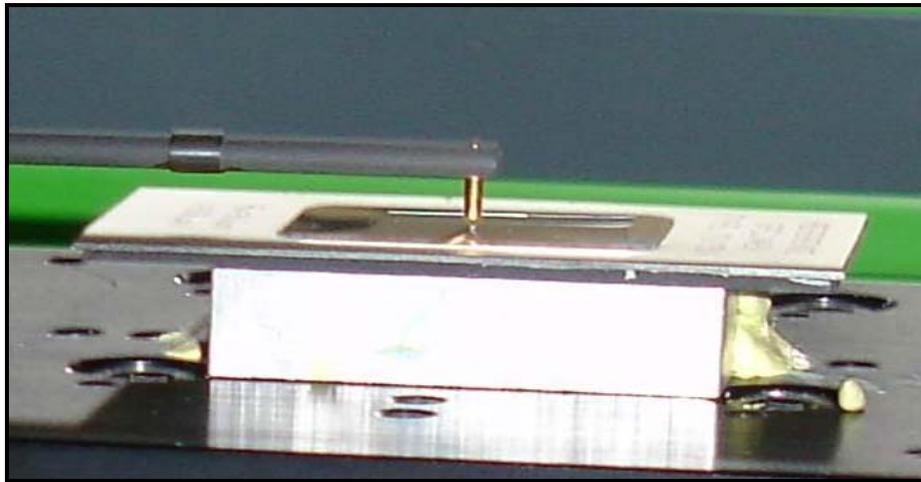
#### 2.1.3.1. Profilométrie mécanique

Avec la profilométrie mécanique (Figure 29), le système d'acquisition de données rugosimétriques est constitué de quatre éléments que l'on peut décrire ci-après :

- 1- Un capteur de rugosité interchangeable de type tactile
- 2- Un ensemble mécanique permettant le déplacement de la surface de l'échantillon à tester à l'aide d'un moteur travaillant en mode pas à pas ou en mode continu, devant le capteur qui est maintenu en position fixe
- 3- Un bloc électronique qui d'une part assure le conditionnement du signal du capteur afin de le numériser et d'autre part réalise l'alimentation des moteurs de déplacement pas à pas
- 4- Une structure informatique qui favorise le pilotage des moteurs et de la numérisation du signal



**Figure 29** : Le système de profilométrie mécanique



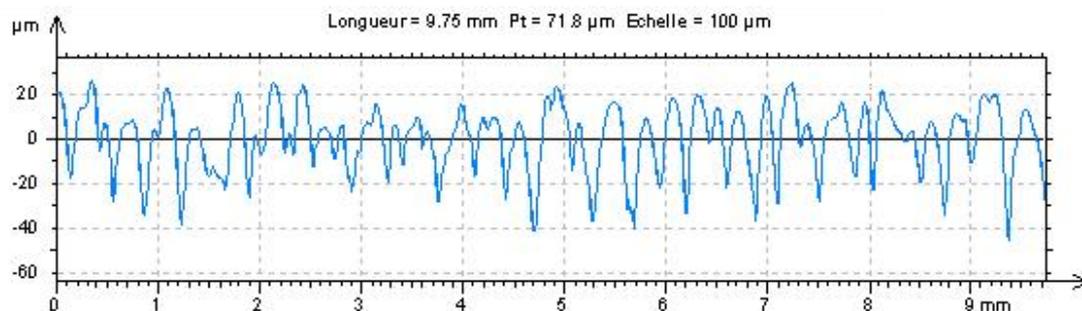
**Figure 30** : Le capteur de rugosité, palpeur à pointe de diamant

Nous plaçons notre empreinte positive sur une table d'orientation motorisée pas à pas suivant les directions  $x$  et  $y$  (Figure 30). Nous fixons un point d'origine pour définir une surface de  $100 \text{ mm}^2$ . Nous choisissons le pas ( $20 \mu\text{m}$  dans nos expériences) et nous déclenchons l'acquisition. Le palpeur parcourt la surface à analyser selon une ligne droite et une orientation définie par rapport à l'axe du corps qui est prise comme origine ( $0^\circ$ ). Le palpeur se déplace à une vitesse constante en exerçant une force de traction sur notre réplique. Le capteur mécanique enregistre les déplacements verticaux ( $Z$ ) qui sont ensuite transformés en signaux électriques amplifiés puis analysés par un logiciel programmé sur un ordinateur.

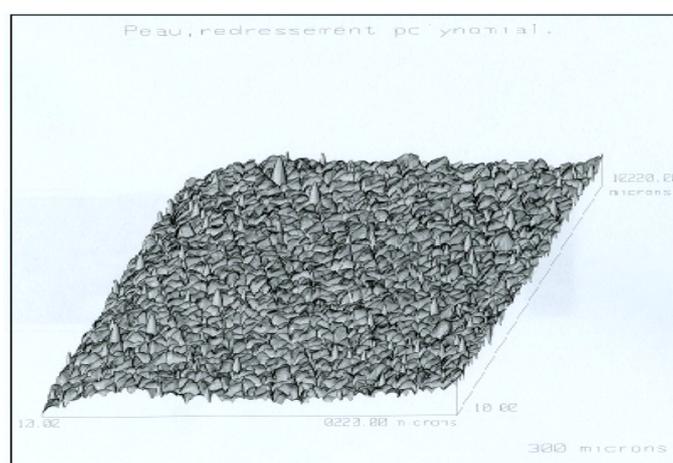
### **2.1.3.1.1. Analyse et résultats par profilomètre**

Lorsque nous étudions la surface de la réplique, nous balayons sa surface en réalisant plusieurs profils parallèles (Figure 31). En les mettant bout à bout nous pouvons reconstituer une image 3D de la surface cutanée (Figure 32).

## 2.1. Comparaison des techniques de quantification du relief cutané



**Figure 31** : Profil obtenu par profilométrie mécanique (Réplique positive, avant-bras d'une femme de 25 ans)



**Figure 32** : Image en 3D représentant la surface de la peau (Succession de profils)

Le tableau 6 présente les résultats des balayages de plusieurs RP de la même surface de l'avant-bras ( $n = 7$ ). Dans ce tableau nous nous contentons juste des données des paramètres les plus utilisés :  $R_{tm}$  (profondeur moyenne des sillons) et  $S_m$  (espacement moyen des sillons).

	$R_{tm}$ ( $\mu\text{m}$ )	$S_m$ ( $\mu\text{m}$ )
Moyenne	45.7	400
Ecart type	0.2	36
Coefficient de variation %	0.5	9

**Tableau 6** : Résultats de l'analyse par profilométrie mécanique faisant apparaître les deux paramètres les plus caractéristiques du relief cutané

### 2.1.3.2. Projection de franges

Une zone a été délimitée sur l'avant-bras droit à l'aide d'un stylo pour effectuer toujours les mesures sur la même région. Deux séries de mesures ont pu être réalisées : une série de mesures *in-vivo* et une série *in-vitro* (c'est-à-dire à partir de répliques négatives). Une attention toute particulière a été apportée pour que l'orientation de la zone à analyser (l'avant-bras) soit rigoureusement la même lors des mesures *in-vivo* et *in-vitro*.

Durant les manipulations avec la technique de projection de franges, nous avons réalisé une lecture *in-vivo* directement sur la peau puis nous avons confectionné les répliques négatives pour ne pas avoir de résidus de Silflo<sup>®</sup> sur la surface étudiée.



**Figure 33** : Une photographie sur la réalisation de mesure *in vivo* par la technique de la projection de franges

### 2.1.3.2.1. Les mesure *in-vivo*

La zone à mesurer sur l'avant-bras est positionnée sous l'appareillage. Un anneau lié à l'appareillage est placé sur la zone permettant ainsi d'avoir une distance fixe entre l'appareil et la zone de mesure. Les réglages plus fins de distances sont contrôlés par un ordinateur. Un ajustement manuel du capteur CCD est nécessaire pour capter le maximum d'intensité lumineuse. L'acquisition se fait alors en un temps très court, de l'ordre d'une demi-seconde.

#### 2.1.3.2.1.1. Résultats des mesures *in-vivo*

Paramètres	Moyenne	Ecart type
Rt ( $\mu\text{m}$ )	724,20	50,48
Ra ( $\mu\text{m}$ )	48,60	4,37
Rq ( $\mu\text{m}$ )	62,53	6,41
Rsk	-0,318	0,08
Rku	4,305	0,95
Rp ( $\mu\text{m}$ )	328,75	32,37
Sv ( $\mu\text{m}$ )	395,62	19,30
Sz ( $\mu\text{m}$ )	697,98	56,66
Rtm ( $\mu\text{m}$ )	524,40	86,59
Surface de mesure ( $\text{mm}^2$ )	197,71	27,18

**Tableau 7** : Moyenne des résultats,  $\pm$  écart type des paramètres de quantifications *in-vivo* de la surface de l'avant-bras d'une femme de 25 ans.

### 2.1.3.2.2. Les mesures *in-vitro*

La réplique négative est déposée sous l'appareillage. Il n'est pas nécessaire dans ce cas de déployer l'anneau car nous pourrions régler sans problème la distance entre l'appareil et la réplique négative. Le même protocole expérimental précédent est appliqué pour la réplique négative. La mesure par projection de franges sur la RN est beaucoup plus simple à réaliser car elle est statique et sa surface n'est pas incurvée. La quasi-totalité des points mesurés sont analysés, contrairement à la méthode *in vivo*, dont une partie des points de mesures sont non analysables du fait des mouvements de l'avant-bras. Un logiciel permet de minimiser la concavité de l'avant-bras.

#### 2.1.3.2.2.1. Résultats pour les mesures *in-vitro*

Paramètres	Moyenne	Ecart type
Rt ( $\mu\text{m}$ )	190,48	2,82
Ra ( $\mu\text{m}$ )	14,78	0,26
Rq ( $\mu\text{m}$ )	18,98	0,46
Rsk	-0,26	0,05
Rku	4,15	0,14
Rp ( $\mu\text{m}$ )	85,42	3,28
Sv ( $\mu\text{m}$ )	104,94	2,46
Sz ( $\mu\text{m}$ )	190,48	2,82
Rtm ( $\mu\text{m}$ )	163,41	3,46
Surface de mesure ( $\text{mm}^2$ )	259	0

**Tableau 8** : Moyenne des résultats,  $\pm$  écart type des paramètres de quantifications de la RP de la surface de l'avant-bras d'une femme de 25 ans.

## 2.1.4. Conclusion

### 2.1.4.1. Résultats du profilomètre

Les moyennes des résultats obtenus à partir du profilomètre mécanique ont un écart type et un coefficient de variation faibles (Tableau 6). Les mesures réalisées par profilométrie mécanique ont une bonne reproductibilité et sont donc très fiables.

### 2.1.4.2. Comparaison des deux méthodes de la technique de franges

Paramètres	Moyenne		Ecart Type		CV (%)	
	<i>In-vivo</i>	R.N.	<i>In-vivo</i>	R.N.	<i>In-vivo</i>	R.N.
<b>Rp (µm)</b>	328,75	85,42	32,37	3,28	9,84	3,84
<b>Rtm (µm)</b>	524,40	163,41	86,59	3,46	16,51	2,12

**Tableau 9** : Comparaison des mesures obtenues *in-vivo* et réplique négative (RN) de la surface de l'avant-bras d'une femme de 25 ans

Lors de cette étude comparative, deux paramètres ont été utilisés : Rp et Rtm (Tableau 9). Ce sont en effet les paramètres qui caractérisent le mieux le microrelief cutané. Le coefficient de variation, qui est le rapport entre l'écart type et la moyenne, reflète la variabilité entre chaque analyse du même échantillon. Les valeurs moyennes *in-vivo* de Rp et Rtm varient d'un facteur compris entre 3 et 4 par rapport aux valeurs *in-vitro* (RN). Les mesures faites *in-vivo* ont un coefficient de variation très important. Elles manquent de reproductibilité.

Après une étude statistique utilisant le « Student Test », nous pouvons confirmer que la différence entre les résultats de la RN et *in-vivo* est significative ( $p_{(RN / In Vivo)} = 1.24 \text{ E-}23 < 0.01$ ).

Plusieurs explications concernant les résultats de l'analyse *in-vivo* peuvent être envisagées :

- les mouvements involontaires du sujet, dus à des tremblements et aux mouvements causés par la respiration et le flux sanguin, peuvent expliquer en partie les différences entre les mesures réalisées *in-vivo* et *in-vitro*.
- Un dérèglement possible de l'appareil pendant les mesures *in-vivo*.

## 2.1. Comparaison des techniques de quantification du relief cutané

- l'apparition au niveau des franges lumineuses de réflexions multiples, qui a induit un bruit sur l'image *in-vivo*.

### 2.1.4.2. Comparaison des résultats des différentes techniques

	Moyenne			Ecart Type			CV (%)		
	<i>R.P.</i>	<i>R.N.</i>	<i>In-vivo</i>	<i>R.P.</i>	<i>R.N.</i>	<i>In-vivo</i>	<i>R.P.</i>	<i>R.N.</i>	<i>In-vivo</i>
<b>Paramètre</b>									
<b>Rtm (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	44.90	163,41	524,40	1.30	3,46	86,59	2.90	2,12	16,51

**Tableau 10** : Comparaison entre les mesures réalisées par profilométrie mécanique (RP) et projection de franges (RN et *in-vivo*).

Les mesures réalisées avec les RP et RN ont un écart type et un coefficient de variations faibles (Tableau 10). En comparant les résultats des RP (profilométrie) et les RN (par projection de franges), les valeurs moyennes de Rtm varient d'un facteur 4 par mesure optique (utilisant les RN) ou mécanique (RP) (Tableau 10). Les deux techniques ont une très bonne reproductibilité.

D'après les études statistiques, nous pouvons conclure que la différence entre les résultats des RP, RN et *in-vivo* sont significatives ( $p_{(RP/RN)} = 4.1 \text{ E-}23 < 0.01$  et le  $p_{(RP/in vivo)} = 1.7 \text{ E-}11 < 0.01$ ). L'écart entre les valeurs obtenues peut s'expliquer en partie par les pertes d'informations engendrées par la RP, en plus de celles du RN.

## *2.2. Contrôle du passage cutané des parabènes utilisés en PDC*

---

## 2.2. CONTROLE DU PASSAGE CUTANE DES PARABENES UTILISES EN PDC

---

### Sommaire :

2.2.1. L'influence de la polarité des parabènes sur leur passage cutané.....	113
2.2.1.1. Détermination de la polarité des parabènes.....	115
2.2.1.1.1. La technique HPLC.....	115
2.2.1.1.2 Solubilité des parabènes.....	115
2.2.1.1.3. Polarité des parabènes.....	115
2.2.1.2. Conclusion.....	116
2.2.2. Evaluation du passage cutané des principaux parabènes utilisés dans les PDC.....	117
2.2.2.1. Matériels.....	118
2.2.2.1.1. Substances chimiques.....	118
2.2.2.1.2. La peau.....	118
2.2.2.1.3. Cellules de Franz.....	118
2.2.2.2. Méthodes.....	119
2.2.2.2.1. Quantification par HPLC.....	120
2.2.2.2.2. Quantification des parabènes dans le produit cosmétique.....	120
2.2.2.2.3. Quantification des parabènes du milieu récepteur (BSA).....	121
2.2.2.3. Résultats.....	122
2.2.2.3.1. Groupe expérimental 1 (G1).....	122
2.2.2.3.2. Groupe expérimental 2 (G2).....	123
2.2.2.4. Conclusion.....	125
2.2.3. Conditions optimales pour une meilleure évaluation du passage cutané des PDC.....	127
2.2.3.1. Matériels.....	128
2.2.3.1.1. Substances chimiques.....	128
2.2.3.1.2. Peau Humaine.....	128
2.2.3.1.3. Cellules de Franz.....	128
2.2.3.2. Méthodes.....	128
2.2.3.2.1. Passage cutané avec cellules de Franz.....	128
2.2.3.2.2. Lavage de la surface de la peau.....	128
2.2.3.2.3. Quantification par HPLC.....	129
2.2.3.3. Résultats.....	129
2.2.3.4. Conclusion.....	130

### **2.2.1. L'influence de la polarité des parabènes sur leur passage cutané**

Les théories et les techniques physico-chimiques sont employées parfois pour analyser et expliciter certains mécanismes d'action biologique des molécules (RIBAUD et Coll., 1994 [208]; HARRISON et Coll., 1996 [102]). Les valeurs de la solubilité et de la polarité des molécules donnent une estimation sur leur absorption cutanée (EC, 2004 [69]).

Dans ce travail, nous allons mettre en évidence la solubilité et la polarité des parabènes et décrire l'influence de ces caractères physico-chimiques sur l'absorption percutanée de ces molécules. Cette étude nous aidera à déterminer l'affinité des parabènes pour les couches de la peau et donc à avoir une première approche sur le devenir de ces molécules une fois appliquées sur la surface de la peau avant même de réaliser une étude expérimentale d'absorption cutanée.

#### **Définition de la solubilité**

Selon DEARDEN en 1991 [61], la solubilité d'un composé peut être considérée comme étant son partage entre son réseau cristallin et le solvant. Si les forces maintenant les molécules dans le cristal sont élevées, sa solubilité sera faible.

#### **Définition de la polarité et du Coefficient de Partage (CP)**

(LEO et Coll., 1971 [140]; VALVANI et Coll., 1981 [252]; MORIMOTO et Coll., 1992 [176]; KUBINY, 1994 [131]; HANSCH et LEO, 1995 [101]; HADGEDDORN-LEWEK et LIPPOLD, 1995 [99]).

La polarité permet d'exprimer la lipophilie ou l'hydrophobie d'un composé. Le terme lipophilie signifie l'attraction envers les lipides, quant à l'hydrophobie, c'est la répulsion pour l'eau. La polarité est calculée par le Log<sub>10</sub> du Coefficient du Partage (CP).

Le CP est défini par le rapport des concentrations à l'équilibre d'un soluté entre deux phases non miscibles ou partiellement miscibles. C'est une estimation de la préférence d'un soluté pour la phase organique (org) / phase aqueuse (aq) :

$$CP = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

Cette loi de partage ne s'applique qu'à température, pression et pH constants pour les solutions diluées. Le CP est caractéristique d'une substance donnée pour un couple de solvants donné. Plus la valeur du CP augmente, plus la molécule aura une affinité élevée pour le *stratum corneum* (SC) et plus elle se fixera pour être diffusée facilement (à cause de la nature lipophile de SC). Pour les molécules à visée systémique, le CP = coefficient *Stratum Corneum* (SC) / véhicule (v)  $[K_{sc/v}]$  devra être tel que le passage dans le SC soit possible et tel que les molécules puissent passer de cet environnement (lipophile) dans les tissus de nature hydrophile. La perméabilité d'une substance dans le SC est en relation linéaire avec le  $K_{sc/v}$  de la même substance.

Le  $K_{sc/v}$  étant difficilement calculable, il est remplacé par le CP octanol/eau en partant du fait que le contenu lipidique de SC a une solubilité similaire à celle de l'octanol (GUY et HADGRAFT; 1989). La grande majorité des auteurs s'accordent à reconnaître que l'octanol possède la même polarité que le SC (CHESSELS et Coll., 1991 [39]; KUBINYI, 1994 [131]; HANSH et LEO, 1995 [101]). Ainsi le passage de molécules à travers la peau peut être prédit à partir de leur CP n-octanol / eau (JACKSON et Coll., 1993 [115]; LIEN et GAO, 1995 [144]). Le système n-octanol / eau est un modèle efficace pour estimer la probabilité de pénétration des molécules à travers les différentes couches de la peau et d'autres membranes et tissus biologiques.

La polarité est évaluée par le logarithme décimal du CP n-octanol / eau =  $\text{Log}_{10} K_{\text{oct/ eau}}$ .

Une molécule est considérée comme :

- Lipophile si  $\text{Log}_{10} K_{\text{octanol/ eau}} > 0$
- Hydrophile si  $\text{Log}_{10} K_{\text{octanol/ eau}} < 0$

Le système de n-octanol/eau est un système de solvants régulièrement utilisé pour mesurer les CP car il présente beaucoup d'avantages (DEARDEN et BRESNEN, 1988 [62]; KUBINYI, 1994 [131]; HANSCH et LEO, 1995 [101]):

- C'est un modèle adéquat des constituants lipidiques des membranes biologiques.
- La présence d'un groupement hydroxyle permet l'interaction avec de nombreux groupements polaires de différents solutés.
- En dépit de son caractère lipophile, il dissout beaucoup de composés organiques.
- L'octanol a une faible pression de vapeur, ce qui favorise des mesures reproductibles.
- L'octanol possède une faible absorption en UV donc cela facilite l'analyse quantitative.
- L'octanol possède une faible toxicité.

### 2.2.1.1. Détermination de la polarité des parabènes

#### 2.2.1.1.1. La technique HPLC

Nous avons utilisé la colonne RP18 munie d'un injecteur délivrant 50µL de solution à quantifier. La phase mobile est constituée d'un mélange Acétonitril-Tampon phosphate (50/50) (v/v). Le débit est de 1.10mL/min et la pression est stabilisée à 3000Pa (Pascal). Le détecteur UV est fixé à 254nm. Nous avons préparé deux gammes d'étalons de solutions MP / EP et PP/ BP dans l'eau (GROSA et Coll., 2006 [96]) (Annexe 3.1).

#### 2.2.1.1.2 Solubilité des parabènes

Des solutions saturées dans l'eau de chaque parabène (MP, EP, PP, BP) ont été préparées puis diluées au 10<sup>ème</sup> et au 20<sup>ème</sup>, après filtration. La dilution nous permet d'être dans les limites de détection et de quantification de l'HPLC. Trente µl de chaque échantillon ont été injectés en HPLC en triplet. Le tableau 11 présente la solubilité des parabènes en mg/ml.

Parabènes	Solubilité dans l'eau en mg/ml
MP	2.19 ± 0.05
PP	1.05 ± 0.02
PP	0.38 ± 0.02
BP	0.26 ± 0.01

**Tableau 11** : Solubilité des parabènes dans l'eau en mg / ml

#### 2.2.1.1.3. Polarité des parabènes

Cinq ml de solution aqueuse saturée ( $C_{\text{saturation}}$ ) de chaque parabène ont été prélevés, auxquels nous avons ajouté 5 ml d'octanol. Après agitation mécanique pendant 15 minutes et centrifugation pendant 15 minutes à 3000 tours/min, la phase aqueuse ( $C_{\text{aqueuse}}$ ) a été prélevée. Les parabènes ont été dosés par HPLC. Obtenant la concentration en parabènes restant dans la phase aqueuse, et connaissant la concentration à saturation de chaque parabène, la concentration des parabènes dans l'octanol ( $C_{\text{octanol}}$ ) est identifiée par simple soustraction :

$$C_{\text{(saturation)}} - C_{\text{(aqueuse)}} = C_{\text{(octanol)}}$$

Pour calculer le  $CP = C_{(octanol)} / C_{(aqueuse)}$

La polarité sera calculée à partir du  $\text{Log}_{10}$  de CP

Le tableau 12 présente la polarité des parabènes obtenue par la méthode décrite ci-dessus.

<b>Parabènes</b>	<b>Polarité</b>
<b>MP</b>	$1.97 \pm 0.01$
<b>PP</b>	$2.79 \pm 0.04$
<b>PP</b>	$3.08 \pm 0.02$
<b>BP</b>	$3.70 \pm 0.01$

**Tableau 12** : Polarité des parabènes

### 2.2.1.2. Conclusion

La pénétration de substances à travers la peau est influencée par des interactions molécules-peau. Pour qu'une molécule appliquée à la surface de la peau puisse atteindre la circulation générale, il faut qu'elle traverse les couches lipo-protéiques et aqueuses : une molécule trop lipophile ou hydrophile pénètre peu ou pas, à travers le SC (couche lipophile) (LEE et Coll., 1994 [139] ; SAID et Coll., 1997 [217]) Ce travail permet de réaliser une approche sur le caractère des molécules et leur affinité pour les différentes couches de la peau humaine. Nos résultats sont concordants avec la littérature et montrent que la lipophilie de ces molécules augmente avec la longueur de leurs chaînes (DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54]). La moins lipophile est le MP, tandis que la plus lipophile est le BP (Tableau 12). Les valeurs obtenues peuvent nous laisser penser que le BP, et voire même le PP, risquent de s'accumuler dans la peau du fait de leur forte lipophilie (supérieure à 3). Quant au MP, il risque de traverser facilement la peau puisqu'il est le moins lipophile de ces 4 molécules. Ces résultats permettent de nous renseigner sur le passage de ces molécules à travers la peau humaine avant de réaliser l'expérimentation avec les cellules de Franz. Ils permettent d'avoir une première approche sur ce qui se passera lorsqu'un produit cosmétique contenant les 4 parabènes, de différente polarité, sera appliqué *in-vivo* sur la peau humaine.

### **2.2.2. Evaluation du passage cutané des principaux parabènes utilisés dans les PDC (Etude *ex-vivo*)**

Dans cette étude, nous avons évalué la pénétration percutanée des parabènes. Pour mener à bien cette étude sur la pénétration, puis la libération des parabènes après qu'ils ont traversé la peau, nous avons utilisé la méthode *ex-vivo* de cellules de Franz, puis les parabènes ont été quantifiés par HPLC.

Des doses précises d'un lait corporel (un PDC commercial acheté dans une pharmacie) ont été appliquées sur des fragments de peau issus de la chirurgie plastique. Cette lotion contient les quatre parabènes les plus utilisés dans les formulations cosmétiques : Méthyl Parabène (MP), Ethyl Parabène (EP), Propyl Parabène (PP) et Butyl Parabène (BP).

L'objectif principal de cette étude était de déterminer la pénétration de ces molécules à travers les couches épiderme-derme humaines et de prévoir leur possible passage dans la circulation sanguine générale et les tissus de l'organisme. Notre protocole expérimental a été orienté par l'utilisation actuelle des cosmétiques dans la vie quotidienne normale : utilisation de produits de soin une ou plusieurs fois par jour et/ou pendant de longues périodes. Deux groupes d'expérimentations ont été réalisés afin de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation des cosmétiques :

- le premier groupe (G1) ayant pour objectif de connaître le comportement de ces substances chimiques concernant leur pénétration en relation avec leur polarité
- le deuxième groupe (G2) pour évaluer l'utilisation d'un produit cosmétique plusieurs fois dans la journée ainsi que son éventuelle accumulation dans les tissus.

### 2.2.2.1. Matériels

#### 2.2.2.1.1. Substances chimiques

Les poudres de MP, EP, PP, BP (pureté 99 %) et le sérum albumine bovine (BSA) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Strasbourg- France).

La lotion corporelle contenant MP, EP, PP, BP est achetée dans une pharmacie. Ce produit cosmétique a été choisi car c'est un des PDC les plus utilisés (LORETZ et Coll., 2004 [149]).

#### 2.2.2.1.2. La peau

On a utilisé des fragments de peau humaine provenant d'abdomino-plasties (Hôpital Jean-Minjoz, Besançon) pratiquées chez des sujets de sexe féminin (35-45 ans). Chaque peau est congelée à -18 °C immédiatement après l'intervention, la durée de congélation n'excédant pas 3 mois.

La veille de l'expérimentation, les morceaux de peau sont placés sur une feuille d'aluminium et mis à décongeler à la température de 4°C. Moins d'une heure avant l'expérimentation, la partie graisseuse de l'hypoderme est retirée soigneusement à l'aide de ciseaux courbes et de pinces à griffes. Pour chaque étude, 6 morceaux de peau sont préparés, de 16 cm<sup>2</sup> environ, à partir d'une même pièce d'abdomino-plastie.

#### 2.2.2.1.3. Cellules de Franz

Six cellules de Franz de type FDC 200 (Sommerville, NJ, USA) sont utilisées. Chaque fragment de peau de 3 x 3 cm est placé sur les cellules de Franz. La surface d'absorption de la peau est de 3.14 cm<sup>2</sup>. Les chambres réceptrices ont été remplies d'une solution d'albumine bovine (BSA) à 3 % afin d'imiter le fluide physiologique (DAL POZZO et Coll., 1996 [53]), maintenues à 37°C au bain-marie. Des agitateurs magnétiques ont permis d'obtenir un mélange homogène de parabènes avec la phase réceptrice renfermant la solution d'albumine.

Après la préparation des cellules de Franz, une dose bien définie (0.1mL = 45 mg) de la lotion corporelle est appliquée sur la surface externe de la peau et étalée à l'aide d'un tube en verre.



**Figure 34** : Les cellules de Franz après la fixation de morceaux de peau (couches épiderme-derme)

#### 2.2.2.2. Méthodes

Deux groupes d'expérimentations ont été menés :

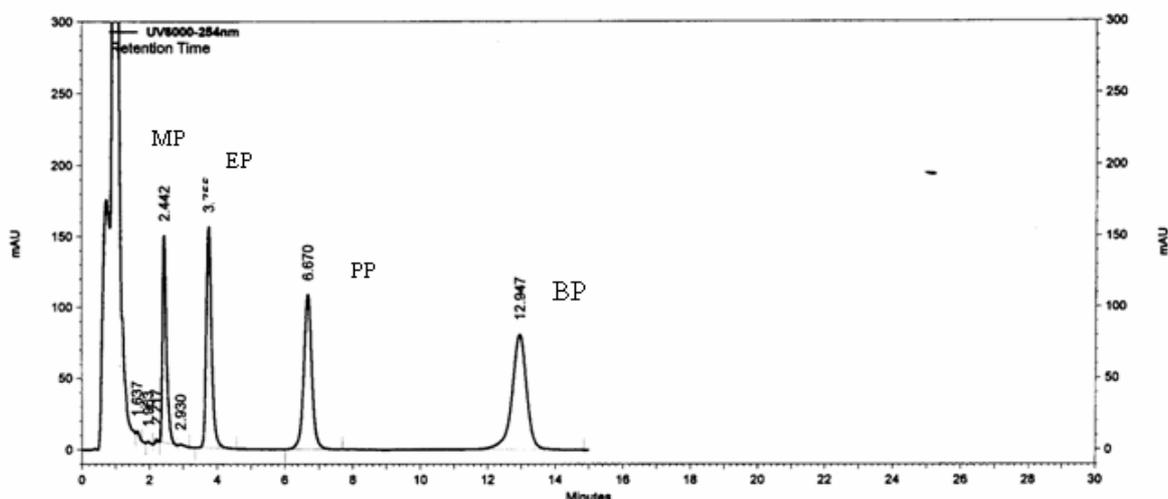
- Le premier groupe **G1** (nombre d'expérimentations = 4, avec 6 cellules de Franz chacune), avec un seul dépôt de 0.1mL sur la peau (à un temps T0h) : le prélèvement du fluide récepteur et son renouvellement sont effectués trois fois ; après 12 heures (T12h), 24 heures (T24h) et 36 heures (T36h) (pas de renouvellement du fluide récepteur à T36h).
- Le deuxième groupe **G2** (nombre d'expérimentations = 4 avec 6 cellules de Franz chacune), avec trois dépôts (de 0.1mL chacun) effectués à des intervalles de temps réguliers à T0h, T12h et T24h (l'application du PDC suivait le renouvellement). Le fluide récepteur est prélevé et renouvelé à T12h, T24h et T36h (pas de renouvellement du fluide récepteur à T36h).

Les molécules ayant traversé la membrane (les couches épiderme-derme) ont été récupérées par le fluide récepteur de la cellule de Franz. Les molécules dans ce liquide seront quantifiées par la suite avec HPLC.

### 2.2.2.2.1. Quantification par HPLC

La colonne utilisée en HPLC est une RP18. La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol/eau (50/50) (v/v). Le débit était de 1.10mL/min et la pression était stabilisée à 3000Pa. Le détecteur UV était fixé à 254nm (Labat et Coll., 2000 [133]; Saad et coll., 2005 [215]).

Une gamme d'étalonnage pour chaque parabène dans une solution méthanol / eau a été réalisée (Annexe 3.2). La figure 35 présente la détection des parabènes dans une solution méthanol/ eau et indique leur temps de rétention.



**Figure 35** : Chromatogramme d'HPLC des parabènes dans une solution méthanol/ eau avec leur temps de rétention

### 2.2.2.2.2. Quantification des parabènes dans le produit cosmétique

Pour calculer le pourcentage de chaque parabène dans le produit cosmétique, 1 g du lait corporel a été mélangé avec 5 ml de méthanol. Après une agitation de 5 minutes, le mélange a été centrifugé pendant 10 min. Le surnageant obtenu à la fin de la centrifugation a été placé sous évaporation dans un bain-marie (à 50°C) et sous pression d'azote. Les résidus ont été dilués ensuite dans 200 µl de phase mobile (méthanol/ eau : 50/50) et puis injectés dans l'HPLC. A l'aide des courbes d'étalonnage, les quantités des parabènes dans le produit cosmétique ont été calculées. Le tableau 13 présente le pourcentage de chaque parabène dans le lait corporel.

<b>Molécule</b>	<b>Concentration dans le lait corporel</b>
<b>MP</b>	0.10 %
<b>EP</b>	0.08 %
<b>PP</b>	0.20 %
<b>BP</b>	0.15 %

**Tableau 13** : Pourcentage de chaque parabène dans le lait corporel

### **2.2.2.2.3. Quantification des parabènes du milieu récepteur (BSA)**

Après leur passage à travers les couches épiderme-derme, les parabènes seront fixés à l'albumine (BSA) dans la phase réceptrice. Il était donc nécessaire, avant de procéder à l'analyse, de faire subir une déproteinisation du liquide récepteur des cellules de Franz.

#### 2.2.2.2.3.1. Courbes d'étalonnages des parabènes dans le BSA 3 %

L'extraction des parabènes a été faite par un mélange de 4mL d'acéonitril et 1mL de méthanol pour chaque tube (DAL POZZO et Coll., 1991 [53]). La solution obtenue a été centrifugée pendant 10 min à 3000 rpm (1700 x g). Le surnageant a été récolté dans des tubes que nous avons ensuite placés sous évaporation à 50°C grâce à un bain-marie et sous flux d'azote. Les résidus secs de parabènes obtenus ont été ensuite dilués dans 200µL de phase mobile (méthanol/eau : 50/50). Les solutions obtenues ont été injectées en triplet (50µL chacune) en HPLC. Une gamme d'étalonnage pour chaque parabène est réalisée (Annexe 3.3).

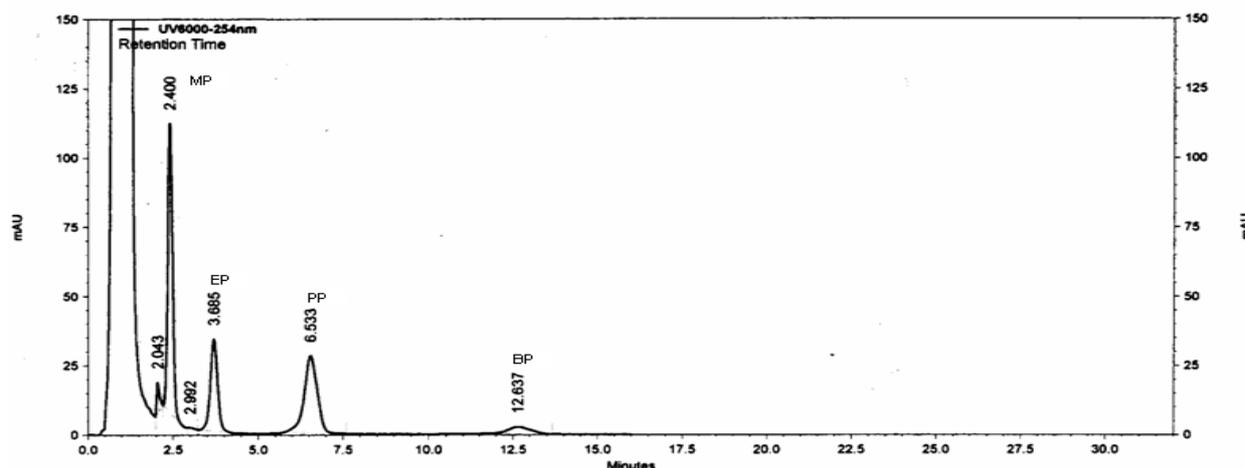
#### 2.2.2.2.3.2. Quantification des parabènes dans le fluide récepteur

La même méthode décrite ci-dessus a été utilisée pour quantifier les parabènes collectés dans le milieu récepteur des cellules de Franz.

### 2.2.2.3. Résultats

#### 2.2.2.3.1. Groupe expérimental 1 (G1)

Le chromatogramme de la Figure 36 montre la détection des parabènes par HPLC après leur passage à travers la peau et leur récupération dans la solution réceptrice avec une seule application du PDC sur la peau (0.1 mL à T 0h).



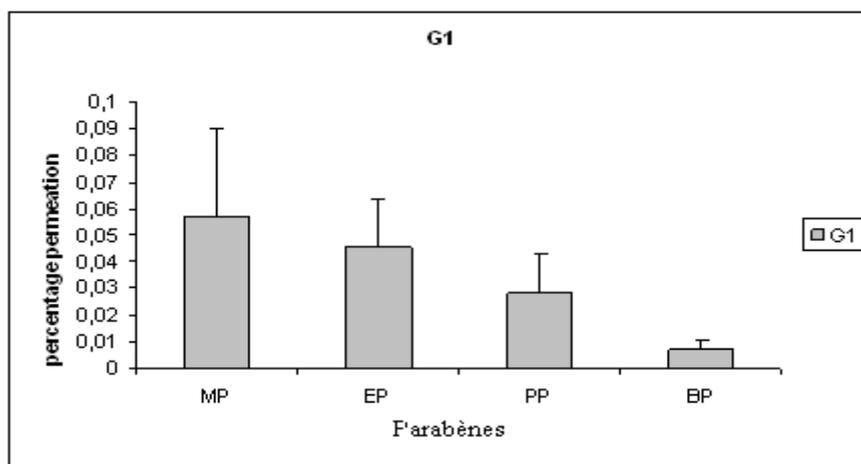
**Figure 36** : Chromatogramme obtenu de l'analyse des parabènes dans le fluide récepteur après leur passage à travers la peau (G1)

Les quantités des parabènes détectées dans le fluide récepteur ont été calculées. Le tableau 14 présente la quantité de parabènes traversant les couches épiderme-derme et cumulée dans le fluide récepteur après chaque prélèvement (TP 12h, TP 24h, TP 36h) ( $\pm$  Écart type).

Parabène	TP 12h	TP 24h	TP 36h
MP	$0.423 \pm 0.160$	$1.91 \pm 1.15$	$0.220 \pm 0.15$
EP	$0.332 \pm 0.100$	$1.00 \pm 0.40$	$0.246 \pm 0.10$
PP	$0.470 \pm 0.110$	$1.41 \pm 0.70$	$0.678 \pm 0.30$
BP	$0.031 \pm 0.004$	$0.24 \pm 0.11$	$0.218 \pm 0.10$

**Tableau 14** : Expérimentation de G1: quantités de parabènes dans le liquide récepteur (valeurs  $\pm$  écart type en  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ )

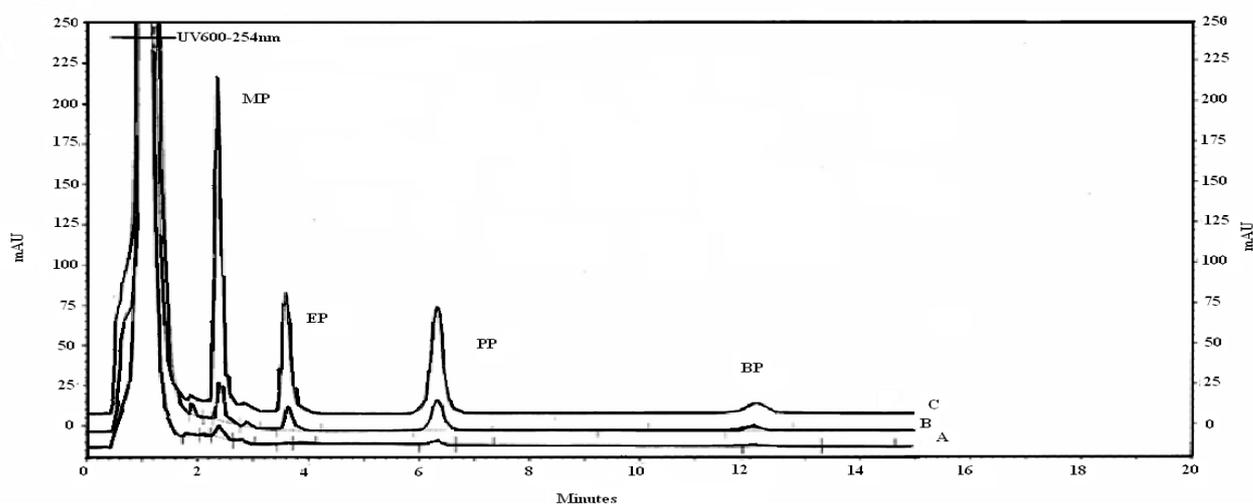
Le pourcentage de la quantité de chaque parabène cumulée dans le liquide récepteur après 36 heures est présenté dans la Figure 37.



**Figure 37** : Pourcentage de quantités des parabènes (G1) (avec leur écart type) dans le milieu récepteur après 36 heures

### 2.2.2.3.2. Groupe expérimental 2 (G2)

Dans ce groupe d'expérimentation, nous avons effectué trois applications du même PDC (0.1 mL chaque dépôt) sur des intervalles de temps différents (T 0h, T 12h, T 24h). Les prélèvements du liquide récepteur et son renouvellement s'effectuaient à TP 12h, TP 24h, TP 36h. Le dépôt du PDC suivait toujours le renouvellement du fluide récepteur à TP 12h et TP 24h (sauf pour T 0h). La Figure 38 montre le passage des parabènes après chaque prélèvement à TP 12h, TP 24h, TP 36h. Elle présente les chromatogrammes de chaque prélèvement et montre clairement l'évolution du passage après chaque application du PDC.



**Figure 38** : Expérimentation G2: Superposition des chromatogrammes obtenus à l'analyse des parabènes du fluide récepteur après 3 dépôts :  
A : analyse du prélèvement effectué à TP 12h  
B : analyse du prélèvement effectué à TP 24h  
C : analyse du prélèvement effectué à TP 36h

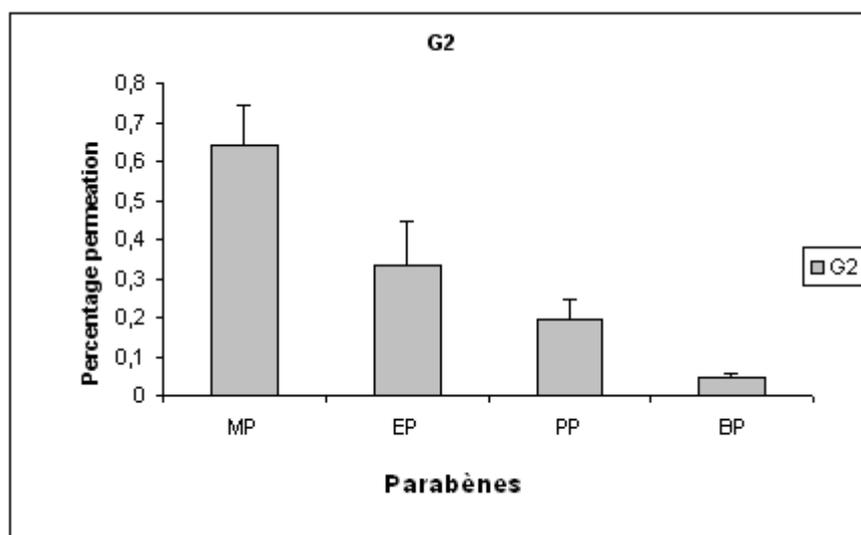
## 2.2. Contrôle du passage cutané des Parabènes utilisés en PDC

Les quantités de parabènes détectées dans les fluides récepteurs à chaque prélèvement (TP) sont représentées dans le Tableau 15 (avec leur écart type).

Parabène	TP 12h	TP 24h	TP 36h
MP	$0.59 \pm 0.17$	$3.39 \pm 0.70$	$5.59 \pm 0.63$
EP	$0.31 \pm 0.07$	$1.33 \pm 0.30$	$2.23 \pm 0.96$
PP	$0.56 \pm 0.24$	$2.04 \pm 0.49$	$3.28 \pm 0.77$
BP	$0.03 \pm 0.01$	$0.28 \pm 0.09$	$0.66 \pm 0.17$

**Tableau 15** : Expérimentation G2 : quantités de parabènes dans le liquide récepteur  
(Valeurs  $\pm$  écart type en  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ )

L'histogramme de la Figure 39 montre le pourcentage de passage des parabènes dans le fluide récepteur durant G2 après 36 heures.



**Figure 39** : Pourcentage de quantités des parabènes (G2) (avec leur écart type) dans le milieu récepteur après 36 heures.

### 2.2.2.4. Conclusion

#### Groupe expérimental (G1) :

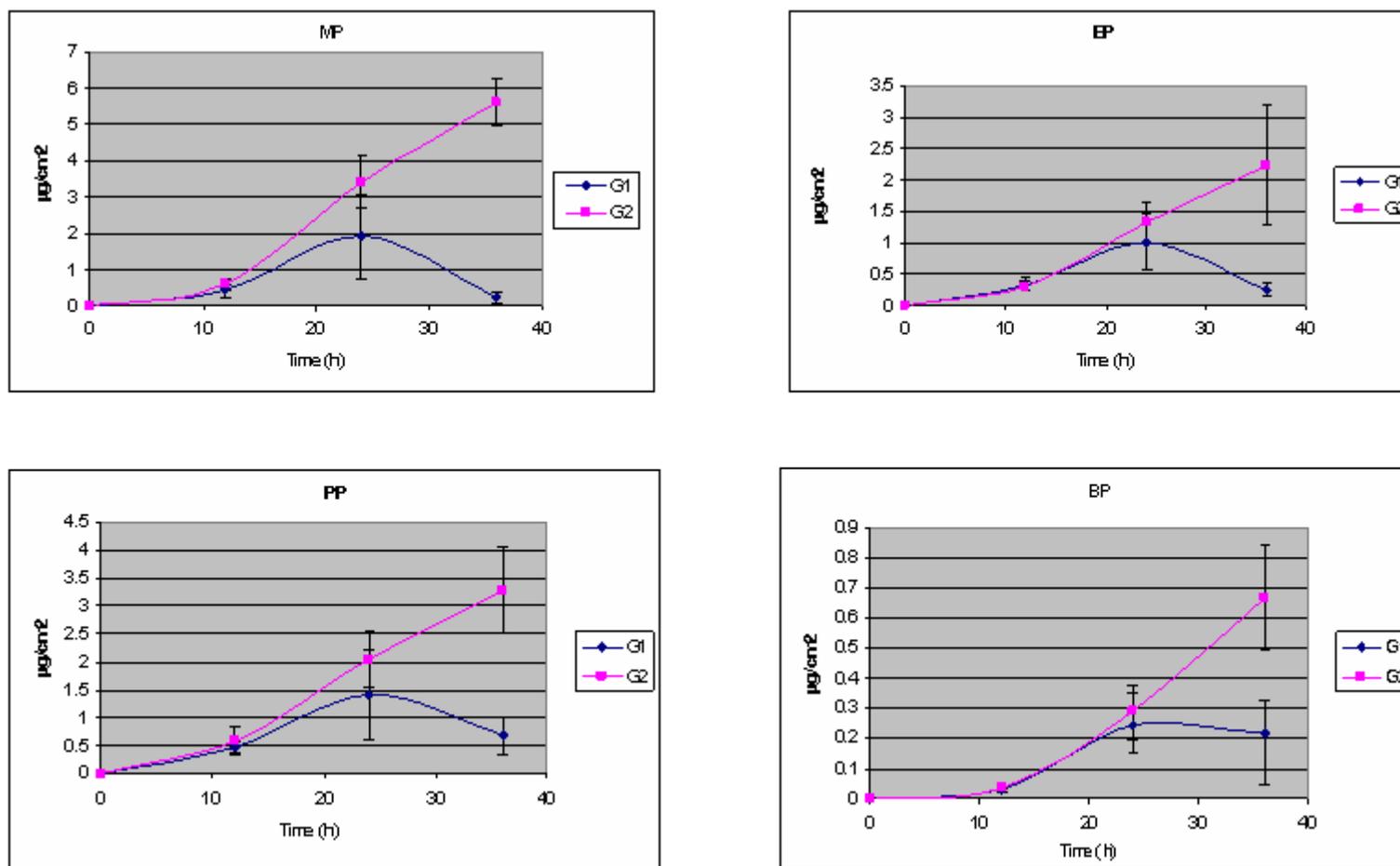
La détermination des parabènes dans le milieu récepteur montre que le MP et le EP sont bien libérés des couches cutanées et en quantité importante par rapport à PP et BP. La figure 40 indique les quantités de perméation des quatre parabènes. D'après l'étude de polarité effectuée en chapitre 2.2.1., nous pouvons conclure que le passage des parabènes dans ce PDC a été influencé par leur degré de lipophilie : plus la molécule est lipophile (BP > PP > EP > MP), moins elle passe les différentes couches de la peau (BP < PP < EP < MP) (Figure 37).

#### Groupe expérimental (G2) :

Les résultats de G2 montrent une augmentation de la quantité de chaque parabène dans le liquide récepteur après trois dépôts. Les quantités libérées dans le milieu récepteur, en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , sont indiquées dans le tableau 40. Comme dans G1, les quantités libérées à travers la peau sont en corrélation avec leur lipophilie (Figure 39). Les quantités accumulées dans le liquide récepteur ont été plus importantes dans le cas des MP et EP que PP et BP (Figure 39). De plus, nous remarquons que le passage des parabènes à travers les couches dermo-épidermiques est en relation avec la quantité déposée : plus nous appliquons le PDC comportant les parabènes, plus ces substances traversent les couches vers le milieu récepteur (Figure 40).

Notons que la quantité de PP (en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) est toujours supérieure à celle d'EP étant donné que la quantité initiale de PP dans le PDC est plus grande que celle d'EP (Tableau 13).

## 2.2. Contrôle du passage cutané des Parabènes utilisés en PDC



**Figure 40** : Une comparaison des quantités des parabènes dans le fluide récepteur (en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) après un seul dépôt à T0h (G1) et 3 dépôts à T 0h, T 12h, T 36h (G2)

### **2.2.3. Conditions optimales pour une meilleure évaluation du passage cutané des PDC**

D'une façon générale, le but des études de pénétration cutanée des PDC et leurs composants est d'obtenir des informations qualitatives ou/et quantitatives sur la quantité qui peut passer vers la circulation générale et les différents tissus du corps humain. Ces études donneront une évaluation de la quantité traversant les couches épiderme-derme chez l'homme. Donc elles doivent tenir compte des conditions générales d'utilisation de ces produits. Les quantités obtenues par ces études percutanées doivent être prises en considération pour calculer la marge de sécurité de ces molécules.

Dans ce travail, nous avons défini un nouveau protocole pour une évaluation optimale des PDC avec des conditions qui se rapprochent le plus possible de l'utilisation normale des PDC :

- Etalon Interne : pour plus d'exactitude dans les dosages, nous avons ajouté un étalon interne dans les échantillons : l'acide 4-hydroxybenzoïque.
- HSA 1.4 % : une solution d'albumine humaine 1.4 % a été utilisée comme phase réceptrice, étant donné que ce pourcentage est proche de celui du liquide interstitiel de la peau humaine (VERMEER et Coll., 1975).
- L'évaluation est faite avec 3 applications du produit sur 36 h et cela dans le but d'imiter l'utilisation fréquente des produits cosmétiques.
- Un produit cosmétique commercial a été utilisé.
- Nous avons lavé la surface de la peau après le passage des molécules étudiées, afin de quantifier la quantité restante.
- Nous avons utilisé une peau d'origine humaine.
- Nous avons utilisé la partie épiderme-derme de la peau pour évaluer les quantités de parabènes arrivant au niveau de la circulation sanguine.

### **2.2.3.1. Matériels**

#### **2.2.3.1.1. Substances chimiques**

Les poudres de MP, EP, PP, BP, l'albumine humaine (HSA) et l'acide 4-hydroxybenzoïque comme étalon interne (EI) (pureté 99 %) proviennent de chez Sigma-Aldrich (France).

Le produit cosmétique testé était le même lait corporel utilisé dans l'étude précédente (Chapitre 2.2.2.)

#### **2.2.3.1.2. Peau Humaine**

La préparation des fragments de peau était identique à celle décrite dans l'étude précédente, et provenant de la même région corporelle (abdomen) (Chapitre 2.2.2.)

#### **2.2.3.1.3. Cellules de Franz**

Dans cette étude, nous avons utilisé une solution de sérum albumine humain (HSA) à un pourcentage de 1.4 % car, selon la littérature, cette solution correspond à celle du liquide interstitiel de la peau humaine (VERMEER et Coll., 1975 [257]).

### **2.2.3.2. Méthodes**

#### **2.2.3.2.1. Passage cutané avec cellules de Franz**

Trois dépôts de 0.1mL du PDC ont été effectués à des intervalles de temps réguliers à T0h, T12h et T24h. Le fluide récepteur a été prélevé à T12h, T24h et T36h (pas de renouvellement du fluide récepteur à T36h). Ce groupe a été composé de 4 manipulations différentes avec des morceaux de peau différents.

#### **2.2.3.2.2. Lavage de la surface de la peau**

A la fin de la manipulation (après 36h), nous avons lavé la peau avec du méthanol. Les solutions récupérées ont été évaporées à 50°C grâce à un bain-marie et sous flux d'azote. Les résidus ont été ensuite dilués dans 200 µ L de phase mobile (méthanol / eau à 50/50), puis injectés en HPLC en triplet (50µl chacune) (Annexe 3.4).

### 2.2.3.2.3. Quantification par HPLC

Pour extraire les parabènes de la solution HSA, nous avons ajouté 2mL d'acétonitril par mL de liquide récepteur (JIANG et Coll., 1996 [117]; SARVEIYA et Coll., 2004 [225]). Ce mélange a été centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm (1700 x g). Ensuite, nous avons prélevé le surnageant et nous les avons placés sous évaporation à 50°C grâce à un bain-marie et sous flux d'azote. Les résidus dans les tubes ont été dilués avec 200 µL de phase mobile (méthanol / eau à 50/50), puis injectés en HPLC en triplet (50µl chacune) ((Annexe 3.5).

Au début, nous avons réalisé une gamme d'étalonnage de parabènes / l'étalon interne (EI) (Annexe 3.6).

### 2.2.3.3. Résultats

Nous avons calculé la quantité de chaque parabène dans le milieu récepteur (Annexe 3.7) après chaque prélèvement : TP 12h, TP 24h, TP 36h. Le Tableau 16 montre la quantité en µg/ cm<sup>2</sup> de chaque molécule après chaque prélèvement.

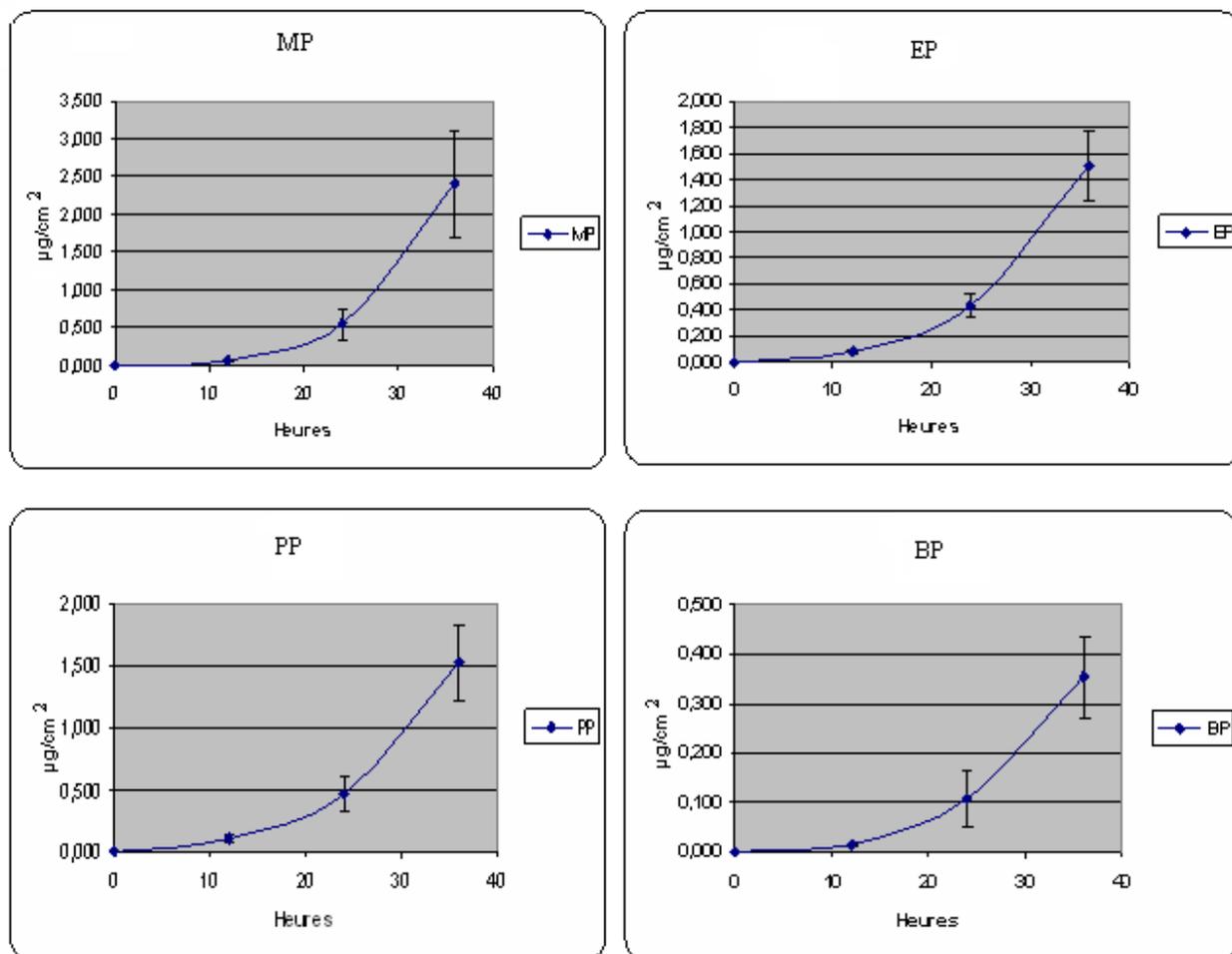
Parabènes	TP 12h	TP 24h	TP 36h
MP	0.060 ± 0.01	0.550 ± 0.2	2.40 ± 0.71
EP	0.080 ± 0.01	0.430 ± 0.08	1.51 ± 0.27
PP	0.101 ± 0.02	0.462 ± 0.129	1.51 ± 0.31
BP	0.014 ± 0.002	0.107 ± 0.056	0.35 ± 0.08

**Tableau 16** : Quantité de parabènes récupérée dans le fluide récepteur après les prélèvements à TP 12h, TP 24h, TP 36h (valeurs ± écart type µg / cm<sup>2</sup>).

Le Tableau 17 présente le pourcentage de parabènes trouvé à la surface et le pourcentage des parabènes traversant les couches épiderme-derme après 36h (accumulation dans la phase donneur après 36h).

Parabènes	% sur la surface	% Passage après 36 heures
MP	3.0 % ± 0.3	0.20 % ± 0.05
EP	3.3 % ± 0.4	0.17 % ± 0.02
PP	4.1 % ± 0.3	0.07 % ± 0.01
BP	4.9 % ± 0.4	0.02 % ± 0.01

**Tableau 17** : Pourcentage de quantité des parabènes sur la surface et celle de leur passage à travers les couches épiderme-derme dans une solution saline de HSA (valeurs ± écart type µg / cm<sup>2</sup>).



**Figure 41** : Passage des quatre parabènes à travers les couches derme-épidermiques durant 36 heures en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

#### 2.2.3.4. Conclusion

Durant les études d'absorption cutanée des molécules, le passage cutané est influencé par différents facteurs : le type de la formulation à tester, l'origine de la peau utilisée avec les cellules de diffusion, le type de la peau (épiderme, épiderme-derme), la composition du milieu récepteur...etc.

Le milieu récepteur (DIEMBECK et Coll., 1999 [64]; SARTORELLI et Coll., 2000 [224]; SCCP, 2006 [229])

Pour étudier la perméation cutanée d'un produit pharmaceutique ou dermo-cosmétique, le choix du liquide récepteur de la cellule de diffusion est une étape très importante. Généralement, la composition de ce milieu ne doit pas limiter la pénétration des substances testées. Une solubilité totale et une bonne stabilité de la molécule testée doivent être garanties :

- Pour les molécules hydrophiles : une solution saline ou bien tamponnée est généralement recommandée.
- Pour les molécules lipophiles, un sérum albumine ou des solubilisateurs comme les surfactants non-ioniques sont ajoutés en quantité considérable.

WILKINSON et WILLIAMS ont montré, en 2002 [268], que l'addition du BSA ou bien du PEG 20 (Polyéthylène glycol) au fluide récepteur augmente l'absorption cutanée des éthers glycol. De plus, l'interaction entre les médicaments et le BSA ou bien HSA est différente (SULKOWSKA, 2002 [248]).

Le rôle du liquide récepteur dans les cellules de Franz est d'imiter le fluide interstitiel *in-vivo* pour donner le profil réel de l'absorption cutanée d'une substance *in-vivo* (SARTORELLI et al, 2000 [224]). *C'est la raison pour laquelle l'utilisation du HSA à 1.4 % comme milieu récepteur représentera mieux le profil de l'absorption in vivo des PDC puisque cette concentration est considérée comme la plus proche de celle du fluide interstitiel de la peau humaine (VERMEER et Coll., 1975 [257]).*

### Origine de la peau

Des peaux de différentes origines sont actuellement utilisées dans les études d'absorption cutanées des molécules utilisées en cosmétique :

- Peau humaine
- Peau d'origine animale
- Peau artificielle ou de culture

Pour bien évaluer le passage cutané chez l'homme, la peau humaine est la plus appropriée, mais elle n'est pas toujours disponible (SCCP, 2006 [229]). Dans une étude comparative entre des peaux de différentes origines, les molécules lipophiles ont montré un important taux de pénétration à travers la peau de rat. Mais ce n'était pas le cas de la peau d'origine humaine. Les peaux de souris, porc, et lapin n'ont pas les mêmes fonctions barrière que celles de la peau humaine (ROSS et Coll., 2000 [211]; RAVENZWAAY et LEIBOLD, 2004 [205]).

D'autre part, le modèle de peau artificielle est loin d'être proche de la peau normale, puisque les recherches n'ont pas réussi jusqu'à maintenant à imiter la complexité de la peau naturelle (COQUETTE et Coll., 2000 [45]; SARTORELLI et Coll., 2000 [224]).

### Type de peau (DIEMBECK et Coll., 1999 [64] ; SCCP, 2006 [229])

Les membranes qui peuvent être utilisées lors d'un passage cutané de substances appliquées en cosmétologie sont :

- « Full-thickness » de 500-1000  $\mu\text{m}$  (épiderme-derme)
- « Split-thickness » de 200-500  $\mu\text{m}$
- Membrane épidermique

Dans le cas de molécule lipophile, l'épiderme seul est préférable pour limiter la rétention des molécules dans le derme *in-vitro*. Notons que l'utilisation des membranes épidermiques peut surestimer le passage des molécules *in-vivo* (VAN DE SANDT et Coll., 2000 [254]).

*Pour une meilleure évaluation du passage cutané des PDC et pour avoir une bonne estimation de la quantité qui a traversé la peau vers la circulation sanguine, l'utilisation de la partie derme-épidermique de la peau humaine est souhaitable.*

Dans ce travail, nous avons regroupé, en un seul protocole de travail, toutes les conditions optimales pour une meilleure étude du passage cutané des molécules médicamenteuses et cosmétiques. Le but était d'avoir une bonne estimation sur la quantité des parabènes qui peuvent traverser les couches derme-épidermique vers la circulation sanguine.

Par simple méthode mathématique, nous avons calculé la quantité de parabènes traversant la peau avec un pourcentage d'albumine bovine à 1.4 % et nous avons comparé le résultat avec celui de HSA à 1.4 % (Tableau 18).

<b>Parabènes</b>	<b>BSA (1.4%)</b>	<b>HSA (1.4%)</b>
MP	0.28 % $\pm$ 0.050	0.20 % $\pm$ 0.05
EP	0.16 % $\pm$ 0.050	0.17 % $\pm$ 0.02
PP	0.10 % $\pm$ 0.020	0.07 % $\pm$ 0.01
BP	0.02 % $\pm$ 0.005	0.02 % $\pm$ 0.01

**Tableau 18** : Tableau de comparaison de quantités de parabènes cumulées dans le milieu récepteur après 36 h avec BSA et HSA à 1.4 % (valeurs  $\pm$  écart type  $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ )

Nous avons réalisé une étude statistique (Student Test) pour confirmer si la différence entre les deux types d'albumine est significative :

$P = 0.0150 < 0.05$  donc la différence entre BSA et HSA est significative pour le MP.

$P = 0.3610 > 0.05$  donc la différence entre BSA et HSA n'est pas significative pour le EP.

$P = 0.0011 < 0.05$  donc la différence entre BSA et HSA est significative pour le PP.

$P = 0.4900 > 0.05$  donc la différence entre BSA et HSA n'est pas significative pour le BP.

Selon l'étude statistique, nous avons remarqué une différence significative entre les résultats BSA (1.4 %) et HSA (1.4 %) pour MP et PP. Ceci s'explique par le fait que nous avons utilisé des méthodes mathématiques pour calculer le passage des parabènes dans 1.4 % BSA et non après un passage cutané (comme dans le cas de HSA 1.4 %). Par suite, il est utile de réaliser des études d'absorption cutanée avec du 1.4 % BSA pour pouvoir comparer les résultats obtenus par ces deux différents types de liquide récepteur.

*Donc, il est indispensable d'utiliser l'albumine humaine à 1.4 % pour avoir une meilleure estimation du passage cutané des molécules utilisées en cosmétologie.*

## *2.3. Discussion Générale :*

*L'Utilisation Courante des PDC et  
les Législations Européennes et Internationales*

---

## 2.3. DISCUSSION GENERALE

---

### **Sommaire :**

2.3. L'utilisation courante des PDC et les législations Européennes et Internationales .....	136
2.3.1. Une efficacité à confirmer pour les PDC .....	136
2.3.1.1. Perspectives.....	138
2.3.2. La sécurité est indispensable pour les PDC .....	139
2.3.2.1. Notre point de vue sur les parabènes .....	142
2.3.2.1.1. Etudes de solubilité et de polarité des Parabènes.....	142
2.3.2.1.2. Etudes du passage cutané des Parabènes .....	143
2.3.2.1.3. Conditions optimales pour une meilleure évaluation du passage cutané.....	144
2.3.2.1.4. Propositions pour diminuer le passage dermique des Parabènes.....	146
2.3.3. Conclusion générale.....	149

## 2.3. L'utilisation courante des PDC et les législations Européennes et Internationales

Dans notre travail de thèse, nous étions intéressés par certains critères parmi les plus importants lors de l'utilisation d'un PDC par le consommateur :

- 1- L'efficacité du PDC
- 2- La sécurité du PDC

D'une façon générale, une personne se base sur ces deux aspects lors de son achat d'un produit cosmétique. Donc, il est normal que le consommateur soit protégé en lui assurant des produits cosmétiques de bonne qualité, efficaces, et surtout sans risque, à court et à long terme.

### 2.3.1. Une efficacité à confirmer pour les PDC

Les produits de maquillage, les teintures pour cheveux ont une efficacité visible. Pour ce qui concerne les produits censés nettoyer (les produits d'hygiène) ou réparer les méfaits du temps (les produits anti-âge), leur efficacité est plus difficile à évaluer. Il faut compter quelques jours, voire quelques mois pour que le consommateur affirme l'efficacité d'un produit anti-ride, par exemple.

Les PDC sont utilisés relativement plus que les médicaments. Le marché est chargé de toutes sortes de PDC venant des quatre coins du monde. Généralement, dans chaque pays, les PDC sont soumis à des réglementations rigoureuses.

Les médicaments doivent prouver leur efficacité et obtenir une autorisation de mise sur le marché par différents tests (l'article 4 de la directive européenne 65/65/EEC et ses annexes : <http://europa.eu/scadplus/leg/fr/lvb/l21136.htm> ). Mais, **pour les cosmétiques, c'est le fabricant qui veille sur l'efficacité de son produit avant de le commercialiser**. D'autre part, la réglementation sur la publicité trompeuse, qui a fait l'objet de la Directive 84/450/CEE (son équivalent français : Article 44 de la loi 73-1193 du 27 Décembre 1973 sur l'orientation du Commerce et de l'Artisanat), interdit à quiconque de faire valoir des allégations publicitaires que le produit n'a pas. Donc, dans le but de protéger le consommateur, il est souhaitable de vérifier l'efficacité de ces produits.

A l'heure actuelle, plusieurs types de techniques sont utilisés pour quantifier le microrelief cutané dans le but de vérifier l'efficacité des Produits Dermo-Cosmétiques. Ces méthodes sont très différentes : mécaniques et optiques (*in-vitro* et *in-vivo*).

Dans nos expérimentations, nous avons comparé trois techniques de quantification :

- 1- Technique mécanique (*avec contact*) en utilisant des **répliques positives** de la surface de la peau : la **profilométrie** et la **surfométrie**.
- 2- Technique Optique (*sans contact*) sur des **répliques négatives** : **La projection de franges**.
- 3- Technique Optique (*sans contact*) *in-vivo* : **La projection de franges**.

Dans nos résultats de mesures mécaniques, nous pouvons remarquer que les valeurs moyennes de profondeur des sillons, données par le paramètre Rtm et issues de notre étude, sont concordantes avec celles obtenues par Dr. MASOUY en 1983 [165] (en utilisant la même méthode, considérant la même fourchette d'âge, le même sexe et la même région corporelle) (Tableau 19). De plus, nous pouvons remarquer de faibles écart-types, ce qui traduit que la méthode est reproductible et qu'elle offre une grande fiabilité de résultat.

Profilométrie	Moyenne ± Ecart type	
	Nos résultats (2006)	Masouy, 1983 [165]
<b>Rtm (µm)</b>	45,7 ± 0,2	44,9 ± 1,3

**Tableau 19** : Comparaison des mesures obtenues par profilométrie et des données de la littérature (MASOUY, 1983 [165]) utilisant la même méthode et étudiant la même région corporelle (l'intérieur de l'avant-bras) d'une personne de sexe féminin, avec la même fourchette d'âge (25 ans).

En ce qui concerne les résultats réalisés par la projection de franges, les valeurs obtenues *in-vivo* (directement sur la surface interne de l'avant-bras) sont beaucoup plus élevées que celles réalisées *in-vitro*, sur RN (Tableau 10). Selon Marsaut (MARSAUT, 2004 [160]), le décalage de résultats *in-vivo*/ RN par projection de franges a été expliqué par deux raisons :

- 1- Le fait que la silicone formant la RN (le Silflo<sup>®</sup>) ne s'introduit pas totalement dans toutes les microstructures de la peau et occulte ainsi des informations. Ce phénomène se comporte comme un filtre qui lisse le relief de la peau.
- 2- L'apparition au niveau des franges lumineuses de réflexions multiples, ces nombreux points lumineux générant un bruit sur l'image. Ceci augmente alors la rugosité calculée *in-vivo*.

Notre étude du microrelief a montré qu'il y a une différence de résultats entre les différentes méthodes de quantification du microrelief, malgré l'analyse de surface d'une même région corporelle et en utilisant le même paramètre de quantification (R<sub>tm</sub>) (Tableaux 10 et 19).

En effet, les analyses de ces mesures ne s'effectuent pas de manière absolue mais le plus souvent sont utilisées de façon relative. Ces techniques sont utilisées pour évaluer l'efficacité d'un produit cosmétique ou dermatologique avant et après l'application de ces produits, donc ce sont des techniques comparatives. Les mesures *in-vivo* et les mesures sur RN nous permettent de conclure de la même manière sur un effet de l'application d'un produit topique. Les résultats obtenus sont valables à condition d'utiliser la même méthode avant et après application du produit à tester.

D'une façon générale, les méthodes optiques sont les plus intéressantes car elles constituent une étape essentielle pour l'analyse quantitative directe de la topographie de la surface de la peau *in-vivo*.

### 2.3.1.1. Perspectives

Les méthodes de quantification du microrelief cutané évoluent de plus en plus mais restent une question : laquelle de ces méthodes est la plus sensible et la plus fiable ? Pour répondre à ces questions, il faut utiliser toujours le même paramètre (R<sub>tm</sub> par exemple) pour bien comparer les résultats de différentes méthodes de quantification cutanée.

### 2.3.2. La sécurité est indispensable pour les PDC

Les substances chimiques sont souvent utilisées dans différents types de PDC qui sont ensuite appliqués sur la peau, les cheveux, ongles...etc. La tendance d'une molécule à pénétrer la peau dépend principalement de sa capacité à passer la barrière hydrophile/lipophile du stratum corneum. Ce potentiel de pénétration et rétention au niveau de la peau peut être influencé par différents facteurs tels que les propriétés physico-chimiques du principe actif, de l'excipient (SCHAFER, RIEDLMAYER, 1996 [231]; SAID et Coll., 1997[217] ; LEE et Coll., 1994[139]), l'occlusion (MAKKI et Coll., 1996[157]), le type de la formulation cosmétique et les promoteurs d'absorption (DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54]; BORRAS-BLASCO, 1997 [29]; KITAGAWA et Coll., 1997 [124]; WILLIAMS et BARRY, 2003 [269]). **Même après une application cutanée de petites doses, une utilisation fréquente et à long terme d'un PDC peut provoquer une rétention partielle de ces molécules au niveau des tissus humains sans qu'elles soient métabolisées, comme dans le cas des parabènes** (DARBRE, 2003 [59]; DARBRE et Coll., 2004 [58]; DARBRE, 2006 [55]; EL HUSSEIN et Coll., 2007 [74]).

Si les estérases hépatiques agissent sur le métabolisme de substances après une administration orale, la situation dans le cas d'une application topique n'est pas semblable. Le taux d'activité des enzymes de métabolisme, dans la peau, est faible par rapport à celui du foie (WILLIAMS, 2006 [271]). Le métabolisme cutané n'aboutit pas toujours à une détoxification et peut même activer certaines substances, menant à une toxicité locale et / ou systémique (BANDO, 1997 [13]; SARTORELLI et Coll., 2000 [224]; HARVEY, 2003 [103]; GOLDEN et Coll., 2005 [92]).

Selon les réglementations internationales, un produit cosmétique doit agir essentiellement au niveau de l'épiderme sans être absorbé au niveau du derme. Les réglementations tolèrent le passage de petites doses à travers les différentes couches de la peau, les follicules pilo-sébacés et les glandes sudorales. **Par conséquent, l'action des cosmétiques est superficielle** : un changement d'apparence sans perturber la structure et la fonction du corps humain ([2] selon la législation Européenne des cosmétiques ; [1] selon la législation des cosmétiques aux USA ; [4] selon la législation Japonaise).

**Les cosmétiques doivent être sans danger lors de leur usage dans des conditions normales d'utilisations** (D 76/768/CEE Art II in the EU). Pour la majorité des substances introduites dans les produits cosmétiques, aucune approbation n'est demandée pour l'utilisation

d'un nouvel ingrédient dans une formulation cosmétique. **Aux Etats Unis et en EU, le producteur et le distributeur du produit cosmétique prennent la responsabilité totale de la sécurité du produit fini.** Néanmoins, le FDA et les autorités locales Européennes peuvent inspecter les usines de production des produits cosmétiques ou leurs locaux à tout moment. La FDA peut collecter des échantillons pour les examiner et les analyser et peut aussi mener une enquête sur la sécurité des ingrédients utilisés (RPA ,2004 [214] ; FDA, 2005 [84]).

**Les PDC (utilisés d'une façon quotidienne ou occasionnelle) ne doivent pas nuire à la santé humaine et ne doivent présenter aucun danger dans les conditions d'utilisation normale** [3]. Le nombre de réactions secondaires liées à l'utilisation des cosmétiques est faible, en raison de l'auto-médication et de l'absence de consultation médicale (DI GIOVANNI, 2006[66]). Heureusement, ces réactions indésirables sont la plupart du temps superficielles, telles que les réactions allergiques et les dermatites de contact (BONDEEL, 1993 [27] ; BERNE Coll., 1996 [20] ; PASCHE-KOO et Coll., 1996 [193]; ANGELINI et Coll., 1997 [10]; NOHYNEK et SCHAFER, 2001 [186] ;KIEC-SWIEREZYNSKA et Coll., 2004 [120][121]; LINDBERG et Coll., 2004 [145] ; SOSTED et Coll., 2004 [244]). **Pourtant, quelques toxicités et même des cas de cancer sont liés à l'utilisation de certaines molécules cosmétiques** (Tableau 20) (Annexe 4).

D'autre part, quelques études nient la toxicité de certaines molécules suspectes comme les parabènes (SONI et Coll., 2005 [242] ; SCCP, 2005 [228] ; 2006 [230]), le diethyle phtalate (API, 2001 [11]) et les polyéthylènes glycols (FRUIJTIER-POLLOTH, 2005 [88]). Les experts du CIR (American Cosmetic Ingredient Review) ont publié de nombreuses études concernant l'évaluation de la sécurité de différentes substances utilisées en cosmétique. Ces études sont disponibles sur leur site internet [Consulté le 21/09/2006] : [www.cir-safety.org](http://www.cir-safety.org).

La SCCP (Scientific Committee on Cosmetic Product) ont publié aussi leur point de vue sur les molécules suspectes via leur site [Consulté le 21/09/2006]:

[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/sccp\\_opinions\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/sccp_opinions_en.htm)

<b>Auteurs</b>	<b>Etudes</b>	<b>Type d'études</b>
<b>Bluhm et Coll.2007</b> [25]	<b>Hair dyes</b> and risks of <b>glioma, meningioma, and acoustic neuroma</b>	In vivo
<b>Niculescu et al.2007</b> [184]	<b>Diethanolamine</b> alters <b>proliferation of mouse neural precursor cells</b>	In vitro
<b>Wang et Coll. 2007</b> [264]	<b>Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO (2)</b> particles in cultured human lymphoblastoid cells.	In vitro
<b>De Sanjose et Coll.2007</b> [63]	Association between personal use of <b>hair dyes</b> and <b>lymphoid neoplasms</b> in Europe.	In vivo
<b>Handa et Coll., 2006</b> [100]	<b>Methyl paraben</b> potentiates UV-induced <b>damage of skin keratinocytes</b>	In vitro
<b>Kunz et Fent, 2006</b> [132]	<b>Estrogenic activity</b> of <b>UV filter mixtures (Benzophenone-1)</b>	In vitro
<b>Murata et Coll., 2006</b> [178]	<b>Oxidative DNA damage</b> induced by <b>hair dye (Ortho-phenylenediamines)</b>	In vitro
<b>Patel et Coll., 2006</b> [194]	The effect of <b>chlorhexidine</b> in mouthwash product on human <b>osteoblast</b> cells	In vitro
<b>Miligi et Coll., 2005</b> [173]	Personal use of <b>hair dyes</b> and <b>hematolymphopoietic malignacies</b>	In vivo
<b>Darbre, 2005</b> [56]	<b>Aluminium, anti – perispirant</b> and <b>breast cancer</b>	Ex vivo
<b>Darbre et Coll., 2004</b> [58]	<b>parabens</b> in human <b>breast cancer</b>	In vivo
<b>Sosted et Coll., 2004</b> [244]	<b>Hair dye allergy (Toluen-2,5-diamine ; p-phenylenediamine )</b>	In vivo
<b>Cho et Coll., 2003</b> [41]	<b>hair dyeing</b> and <b>DNA damage</b> in human lymphocytes ( <b>p-phenylenediamine )</b>	In vivo
<b>Darbre et Coll., 2002</b> [60]	<b>Oestrogenic activity</b> of <b>isobutylparaben</b>	Ex and In vivo
<b>Gag-dominguez et Coll., 2001</b> [90]	Use of permanent <b>hair dyes</b> and <b>bladder cancer risk</b>	In vivo
<b>Oishi, 2001</b> [189]	Effects of <b>butylparaben</b> on the <b>male reproductive system</b> in rats	In vivo
<b>Marty et Coll., 1999</b> [164]	<b>Toxicity of Diethanolamine</b> in CD Rats and new Zealand white rabbits	In vivo
<b>Angelini et Coll., 1997</b> [10]	<b>Contact allergy to preservatives</b> and <b>perfumed</b> compounds	In vivo
<b>Nagata et Coll., 1997</b> [180]	<b>Interstitial pneumonitis and fibrosis</b> and <b>hair spray</b> .	In vivo
<b>Pashe-koo et Coll., 1996</b> [193]	Contact <b>urticaria</b> caused by <b>bovine collagen</b> in a <b>hair conditioner</b>	In vivo

**Tableau 20** : Différentes études de toxicité de quelques molécules chimiques utilisées en cosmétologie

Dans notre travail de thèse, et dans le but d'évaluer le passage cutané d'une molécule cosmétique suspecte, nous avons choisi un type de substance parmi celles citées dans le tableau 24 : les parabènes. Ce choix était basé sur le fait qu'un grand nombre d'études de haute valeur scientifique accusent les parabènes d'avoir des potentiels allergisants, toxiques et même cancérigènes (ANGELINI et Coll., 1997 [10]; ROUTLEDGE et Coll., 1998 [213] ; SIMPSON, 1998 [238]; MOWAD, 2000 [177] ; OISHI, 2001 [189]; 2002 [190][191]; DARBRE, 2004 [57]; DARBRE et Coll., 2004 [58]; HANDA et Coll., 2006 [100]) (Annexe 2).

### **2.3.2.1. Notre point de vue sur les parabènes**

L'évaluation de la sécurité des parabènes devient une nécessité, car ils sont utilisés dans différents produits cosmétiques. Par conséquent, la connaissance de leur pénétration cutanée est très importante pour bien évaluer les doses appliquées en fonction du temps et leurs effets (GOLDEN et Coll., 2005 [92]). La quantification des parabènes après leur passage percutané est donc nécessaire pour déterminer d'une façon exacte leurs risques d'accumulation dans le corps humain.

D'une façon générale, la quantification *ex-vivo* du passage cutané des cosmétiques est recommandée pour des raisons éthiques. Les cellules de diffusion (par exemple : cellules de Franz ; FRANZ, 1975[87]) sont largement utilisées comme technique permettant une quantification précise de substances pénétrant et traversant les couches de la peau. Ce système est utilisé pour son prix abordable et sa reproductibilité (LEVEQUE et Coll., 2004 [142]). Cette technique est considérée comme une première étape pour évaluer le passage à travers la peau des produits topiques (MAKKI et Coll., 1996 [157] ; WILLIAMS, 2006 [270]). Les cellules de Franz sont utilisées par différents laboratoires pour quantifier les substances cosmétiques à travers la peau (BORRAS-BLASCO et Coll., 1997 [29]; BRINON et Coll., 1999 [31]; DIEMBECK et Coll., 1999 [64]; JIANG et Coll., 1999 [118]; CAL et SZNITOWSKA., 2003 [34]; KREALING et Coll., 2004 [128]; VENIER et Coll., 2004 [256]; BRAIN et coll. 2005 [30]). Cette méthode d'étude est recommandée par la commission Européenne dans son document "Document on dermal absorption" (EC, 2004[69]).

#### **2.3.2.1.1. Etudes de solubilité et de polarité des parabènes**

Le passage des parabènes à travers la peau peut être prédit à partir de leurs valeurs de solubilité, de coefficient de partage et de polarité (EC, 2004 [69]) avant même de réaliser des études de passage cutané (JACKSON et Coll., 1993 [251]). La polarité de chaque parabène calculée par Valvani et Coll. en 1981 [252] était relativement proche de nos résultats (Tableau 21).

	Polarité			
	MP	EP	PP	BP
Nos résultats (2006)	1.97	2.79	3.08	3.7
VALVANI et Coll., 1981 [252]	1.96	2.41	3.04	3.57

**Tableau 21** : Comparaison des valeurs de polarité des parabènes  
(Comparaison entre nos résultats par rapport à la littérature)

### 2.3.2.1.2. Etudes du passage cutané des parabènes après une et plusieurs applications d'un PDC

Dans la deuxième partie de notre expérimentation, **nous avons manipulé dans les conditions les plus proches de l'utilisation (fréquente) des PDC**. Les couches épiderme-derme de la peau humaine ont été utilisées pour ce passage cutané, avec les BSA comme phase réceptrice. La forme galénique du produit était un lait corporel commercialisé en pharmacie et contenant les 4 parabènes les plus utilisés dans les formulations cosmétiques : MP, EP, PP, BP.

L'objectif de ces expériences était d'évaluer l'effet d'accumulation des molécules cosmétiques, dans le milieu récepteur, après des applications fréquentes et durant une période bien limitée. Nous avons comparé le passage des parabènes à travers la peau humaine après 1 et 3 applications (G1 et G2) (Figure 40).

Considérant le groupe expérimental G1, les quantités maximales de parabènes traversant la peau se situent à T 24h, puis leur libération dans la phase réceptrice diminue progressivement (Figure 37, Figure 40). Parmi les parabènes étudiés, les plus lipophiles (PP et BP) (Tableau 21) sont les moins libérés dans le fluide récepteur (Tableaux 14 et 15).

Dans le groupe expérimental G2, leur libération dans le liquide récepteur était aussi en fonction de leur lipophilie comme dans le cas de G1 (Figure 39, Figure 40). De même, le moins libéré était le plus lipophile (BP). Les grandes valeurs des écarts types sont provoquées par le fait que les morceaux de peau sont variés et proviennent de différentes patientes. Cependant, nous avons limité l'âge des patientes à 35-45 ans et nous avons utilisé des peaux de la même zone corporelle (abdomen). Les résultats de l'expérimentation G2 ont montré une augmentation claire des parabènes traversant les différentes couches de la peau après chaque application. Le passage

cutané du BP (l'ester le plus lipophile parmi les parabènes étudiés [Tableaux 12 et 21]) est relativement faible par rapport aux autres parabènes.

Le passage des parabènes dans le milieu récepteur (Solution BSA) des cellules de Franz était plus élevé dans G2 que G1. Cela peut être expliqué par le phénomène de saturation du réservoir dermique qui facilite le passage des molécules à travers les couches épiderme-derme en grandes quantités. Ces conditions peuvent être considérées comme semblables à celles *in-vivo* dans deux situations différentes :

- L'utilisation de plusieurs produits cosmétiques contenant des parabènes durant la journée
- L'application d'un de ces produits plusieurs fois durant la journée.

Il serait intéressant de calculer, *in-vivo*, sur une période d'une semaine, voire d'un mois, la quantité traversant les couches cutanées et pouvant être transportée par la circulation sanguine vers les différents tissus du corps humain.

### **2.3.2.1.3. Conditions optimales pour une meilleure évaluation du passage cutané des parabènes**

Dans le guide Européen sur les études d'absorption cutanée des substances cosmétiques (Guidance Document on Dermal Absorption) (EC, 2004 [69]), plusieurs types de peau et de liquides récepteurs sont autorisés durant les tests d'évaluation cutanée. Le choix des caractéristiques des cellules de diffusion, le choix de la phase réceptrice et sa composition, l'origine de la peau influencent le passage percutané des molécules (DIEMBECK et Coll., 1999 [64]; SARTORELLI et Coll., 2000 [224]). La pénétration percutanée des parabènes a été étudiée par plusieurs chercheurs (KOMASTU et SUZUKI, 1979 [127]; DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54]; BANDO et Coll., 1997 [13]; KITAGAWA et Coll., 1997 [124]; CROSS et ROBERTS., 2000 [50]; ESPOSITO et Coll., 2003 [79]; AKOMEAH et Coll., 2004 [7]). Dans ces études, des morceaux de peau de différentes origines ont été utilisés pour les études du passage cutané : peau de rat, de porc et peau humaine. Plusieurs types de liquides récepteurs ont été employés : tampon phosphate, solution éthanol/eau, solution sérum albumine. Les véhicules des parabènes (phase donneur) ont été aussi différents : acétone, éthanol, eau diionisée ...etc. (Tableau 22).

	<b>Dal Pozzo et Pastori, 1996[54]</b>	<b>Kitagawa et Coll., 1997[124]</b>	<b>Cross et Roberts, 2000 [50]</b>	<b>Akomeah et Coll., 2003 [7]</b>	<b>Esposito et coll., 2003[79]</b>	<b>El Hussein et Coll., 2007[74]</b>
<b>Parabènes</b>	MP, EP, PP, BP,	MP, EP, PP, BP	MP, EP, PP, BP	MP, BP	MP, EP, PP	<b>MP, EP, PP, BP</b>
<b>Formulations</b>	Formulations faites dans le laboratoire	Solutions avec des promoteurs de pénétration	Pommade commerciale pour les tests d'allergie	Solution parabènes / eau diionisée	Formulations faites dans le laboratoire	<b>Lait corporel commerciale</b>
<b>Méthodes d'évaluation cutanée</b>	Cellules de Franz	Cellules de Diffusion	Cellules de Franz	Cellules de Franz	Cellules de Franz	<b>Cellules de Franz</b>
<b>Type de la membrane</b>	Membrane épidermique (cadavre)	Membrane dermo- épidermique pocrine	Membrane épidermique humaine	Epiderme et membrane artificielle	membranes synthétiques	<b>Membrane dermo- épidermique</b>
<b>Fluide récepteur</b>	BSA 3 %	Tampon phosphate (PBS)	20 % éthanol	Tampon phosphate (PBS)	Isotonique Tampon phosphate (PBS)	<b>BSA 3%</b>
<b>Temps d'expérimentation</b>	8 heures	24 heures	10 heures	4 heures	8 heures	<b>36 heures</b>

**Tableau 22** : Tableau de comparaison entre les différentes études de passage de parabènes à travers différentes membranes.

Nous ne pouvons pas comparer nos résultats avec la bibliographie, puisque les conditions de notre étude sont différentes de la littérature où des peaux de différentes origines et plusieurs types de milieux récepteurs sont utilisés.

C'est pour cette raison que, dans cette partie de la thèse, nous avons réalisé un travail supplémentaire en établissant un protocole de travail se rapprochant le plus des conditions *in-vivo* d'utilisation d'un PDC :

- L'utilisation du HSA comme fluide récepteur,
- L'application des couches épiderme-derme comme membrane,
- Le lavage de la surface pour quantifier la quantité restante sur l'épiderme.

### **2.3.2.1.4. Propositions pour diminuer le passage dermique des parabènes**

Diminuer le passage cutané des parabènes réduira le risque d'accumulation dans le corps humain et par suite, diminuera leurs possibles effets indésirables. Parmi les parabènes les plus utilisés en cosmétologie (MP, EP, PP et BP), le passage cutané le plus important est celui du MP à cause de sa faible lipophilie (DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54] ; CROSS et ROBERTS, 2000 [50] ; EPOSITO et Coll., 2003 [79] ; AKOMEAH et Coll., 2003 [7] ; EL HUSSEIN et Coll., 2007 [74]).

#### **Plusieurs solutions sont proposées :**

- Des PDC sans parabènes (Paraben Free)

Malgré les différentes études affirmant les effets indésirables des parabènes (OISHI, 2002 [191] ; DARBRE, 2005 [56] ; PUGAZHENDHI et Coll., 2005 [203] ; HANDA et Coll., 2006 [100] ; SIVASEGARAN et Coll., 2007 [240]), certaines grandes industries cosmétologiques continuent à ajouter ces conservateurs dans leurs formulations. Ils assurent leur clientèle que les parabènes ne sont pas nocifs. Selon eux, le nombre d'essais durant les études de cancérogenèse est trop faible pour confirmer la toxicité de ces molécules (SCCP, 2006[230]).

Les parabènes possèdent un grand avantage sur d'autres conservateurs (page 73). C'est pour cette raison, et malgré le grand nombre de conservateurs alternatifs, que les laboratoires ne veulent

pas arrêter l'usage des parabènes, mais ils subissent actuellement la pression de l'opinion publique pour trouver des alternatives à ces molécules.

Alors que l'innocuité des parabènes est remise en question, les stratégies diffèrent selon les marques. Pour certains, le principe de précaution prévaut et des marques comme Caudalie ou l'Occitane ont commencé à changer leurs formules. Chez les plus grands groupes comme l'Oréal, des recherches sont en cours, mais sans formulation nouvelle pour l'instant. D'autres, comme Sanoflore ou Suzanne aux bains - entre autres...- se développent autour d'une éthique "sans parabènes".

D'autre part, un groupe à San Francisco (USA) nommé « Breast Cancer Action » s'est mobilisé pour lutter contre les menaces possibles des parabènes. Ce groupe a encouragé les consommateurs aux Etats-Unis à boycotter les produits d'Estée Lauder et Avon puisque la plupart de leurs formulations contiennent des parabènes (REISCH, 2005 [207]).

Il existe différentes substances conservatrices qui peuvent être utilisées à la place des parabènes. Les formules très grasses, comme une huile de massage, ne nécessitent souvent qu'un antioxydant (vitamine E par exemple) pour éviter le rancissement. Une crème composée majoritairement d'eau moisit si elle n'est pas bien conservée : les conservateurs utilisés sont l'alcool benzylique et l'acide déhydroacétique avec des huiles essentielles (naturellement antiseptiques) et de la vitamine E (antioxydant). Plusieurs laboratoires ont trouvé des alternatives aux parabènes. Quelques formulations «Paraben free » sont présentées dans l'annexe 5.

### - Une alternance dans l'utilisation de conservateurs

Quatre-vingt dix pour cent des produits cosmétiques contiennent des parabènes (ELDER, 1984 [72]; SONI et Coll., 2005 [243]). Les PDC contenant des parabènes sont en contact avec la peau humaine, le cuir chevelu, les lèvres, les muqueuses et les ongles. Plusieurs sortes de cosmétiques sont appliquées sur la surface cutanée, sans limiter la dose et la surface d'application. A long terme, les parabènes peuvent être retenus dans les tissus du corps sans s'hydrolyser et leurs effets nocifs peuvent augmenter avec une utilisation fréquente (DARBRE, 2004[57] ; DARBRE et Coll., 2004 [58]).

### - Le choix de la formulation du PDC

La formulation galénique a une grande influence sur le passage cutané des parabènes. D'après Dal Pozzo et Pastori en 1996 [54], le flux percutané des parabènes dans les émulsions huile/eau est plus important que dans eau/huile. Esposito et Coll. [79] ont montré en 2003 que le passage des parabènes dans une formulation gel hydrophile (Pemulen gel, Carbapol gel) augmente en fonction de leur polarité : plus l'ester est lipophile, plus il traverse la peau facilement.

Il est souhaitable d'utiliser les molécules les moins lipophiles telles le MP et le EP dans les émulsions eau / huile. Pour les molécules PP et BP, mieux vaut utiliser des formulations hydrophiles comme le gel et les émulsions huile/eau, dans le but de minimiser le passage cutané de ces molécules (DAL POZZO et PASTORI, 1996 [54] ; ESPOSITO et Coll., 2003 [79]).

### - Le nombre d'applications du PDC

Depuis 2002, plusieurs études ont établi un lien entre le cancer du sein et l'utilisation fréquente des antiperspirants contenant des parabènes (DARBRE et Coll., 2003 [59] ; DARBRE, 2004 [57]; DARBRE, 2005 [56] ; DARBRE, 2006 [55]). Etant donné leur activité oestrogénique (ROUTLEDGE et Coll., 1998 [213]; PUGAZHENDHI et Coll., 2005 [203]) et de leur pouvoir de s'accumuler au niveau des couches adipeuses à cause de leur forte lipophilie, il est préférable de limiter les doses d'application des PDC contenant les parabènes dans les zones proches des seins. Ceci dans le but de diminuer ce risque en attendant que les prochaines études prouvent l'innocuité ou non des parabènes comme cause de cancer de sein.

En mars 2007, et après une longue polémique sur la toxicité des parabènes, une étude réalisée par Prusakiewicz et Coll. [202] a ajouté un avantage de plus à l'utilisation des ces substances : les parabènes contribuent à une augmentation des œstrogènes dans la peau en inhibant l'œstrogène sulfotransferase (enzyme qui catalyse l'œstrogène). Il est bien connu qu'avec le temps, et surtout après la ménopause, le taux d'œstrogène baisse, ce qui réduit la synthèse du collagène dans la peau. Notons que Prusakiewicz et Coll. [202] ont montré que l'activité oestrogénique des parabènes peut être bénéfique et peut avoir un effet anti-âge sur la peau. Donc, une application fréquente des parabènes au niveau du visage par exemple, augmente le taux d'œstrogène dans la peau et aide à lutter contre le vieillissement cutané.

### 2.3.3. Conclusion générale

L'homme est régulièrement en contact avec les PDC. Il les applique plusieurs fois par jour et durant de longues périodes : shampooing, gel douche, crème hydratante, anti-perspirant et autres. **Normalement, un ingrédient dans un produit cosmétique ne nuit pas à la santé (D 76/768/EEC Art II in the EU)**, mais nous sommes exposés à différentes substances chimiques provenant des applications répétées des PDC. Des informations essentielles comme la quantité du produit cosmétique appliqué et la fréquence de son utilisation doivent être indiquées. Par conséquent, **il semble nécessaire que chaque molécule soit quantifiée dans les couches dermiques pour évaluer l'effet des applications multiples d'un PDC sur le long terme (EL HUSSEIN et Coll., 2007 [74]).**

Les tests *ex-vivo* et *in-vivo* d'absorption cutanée d'un PDC sont essentiels pour évaluer la perméation cutanée des ingrédients cosmétiques (JIANG et Coll., 1999 [118] ; LEVEQUE et Coll., 2004 [142]). Lors de ces épreuves, il est souhaitable de prendre en considération le type de la formulation galénique à tester et les conditions de l'étude, pour avoir l'évaluation la plus proche de la réalité. La quantification de ces ingrédients *in-vivo* dans le sang et l'urine après une période d'utilisation de PDC va aussi prouver l'accumulation et/ou l'élimination de ces substances.

L'industrie cosmétique doit être encouragée à **publier davantage ses études de toxicité et d'évaluation de sécurité de ses produits**. Ceci pourra aider à dissiper le doute des consommateurs concernant la sûreté des cosmétiques. D'autre part, les commissions et associations internationales des cosmétiques (par exemple CIR, COLIPA, SCCP...) ont besoin de vérifier les résultats des recherches qui accusent certaines molécules utilisées dans les PDC. C'est aussi le moment pour les législateurs de regarder de près ces résultats scientifiques.

**Dans un but d'intérêt public, chercheurs et législateurs doivent coopérer pour assurer la sécurité des consommateurs et indiquer où sont les risques et où ils ne sont pas. De plus, ces résultats doivent être publiés non seulement dans les journaux scientifiques, mais aussi dans la presse populaire pour le profit du plus grand nombre.**

# *Annexes*

---

# ANNEXES

---

## **Sommaire des Annexes**

Annexe 1 : Législations Internationales (USA et JAPON)	141
Annexe 2 : Effets secondaires des parabènes	150
Annexe 3 : Listes des tableaux d'étalonnages et chromatographes	155
Annexe 4 : Une campagne pour des cosmétiques plus sécurisés	162
Annexe 5 : Comment conserver sans parabènes	164
Annexe 6 : Publications	165

## **Annexe 1 : Législations Internationales**

### **USA Regulations**

#### **US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION**

##### **Centre for food safety and applied nutrition**

##### **Regulatory requirement for marketing cosmetics in the United States**

**(FDA, 2002[83]; FDA, 2005[84])**

#### Cosmetic definition:

The FD&C Act defines cosmetics as articles intended to be applied to the human body for cleansing, beautifying, promoting attractiveness, or altering the appearance without affecting the body's structure or functions. Included in this definition are products such as skin creams, lotions, perfumes, lipsticks, fingernail polishes, eye and facial make up preparations, shampoos, permanent waves, hair colours, toothpaste, deodorants and any material intended for use as a component of a cosmetic product. Soap products consisting primarily of an alkali salt of fatty acid and making no label claim other than cleansing of the human body are not considered cosmetics under the law.

#### Definition of Cosmetics that are also drugs:

Products that are cosmetics but are also intended to treat or prevent disease, or otherwise affect the structure or functions of the human body, are considered also drugs and must comply with both the drug and cosmetic provisions of the law. Examples of products which are drugs as well as cosmetics are anticaries toothpaste (eg. Fluoride toothpaste), hormone creams, sun tanning preparations intended to protect against sunburn, antiperspirants that are also deodorants, and antidandruff shampoos.

#### Is it a cosmetic, a drug, or both ?

The legal difference between a cosmetic and a drug is determined by a product's intended use. Different laws and regulations apply to each type of product. Firms sometimes violate the law by marketing a cosmetic, without adhering to requirement for drugs.

#### How does the law define a cosmetic?

The Food and Drug and Cosmetic Act (FD&C ACT) defines cosmetics by their intended use, as "articles intended to be rubbed, poured, sprinkled, or sprayed on, introduced into, or otherwise applied to the human body ..... For cleansing, beautifying, promoting attractiveness, or altering the appearance. "among the products included in this definition are skin moisturisers, perfumes, lipsticks, , fingernail polishes, eye and facial make up preparations, shampoos, permanent waves, hair colours, toothpaste, deodorants and any material intended for use as a component of a cosmetic product .

### How does the law define a drug?

The FD&C Act defines drugs by their intended use as “articles intended for use in the diagnosis, cure, mitigation, treatment, or prevention of disease; and intended to affect the structure or any function of the body of man or other animals.

### How can a product be both a cosmetic and a drug?

Some products meet the definition of both cosmetics and drugs. This may happen when a product has two intended uses. For example, a shampoo is a cosmetic because its intended use is to treat dandruff. Consequently, an antidandruff shampoo is both a cosmetic and a drug. Among other cosmetic / drug combinations are toothpastes that contain fluoride, deodorants, that are also antiperspirants, and moisturisers and makeup marketed with sun – protection claims. Such products must comply with the requirements for both cosmetics and drugs.

Products that intend to treat or prevent disease, or otherwise affect structure or function of the human body are considered as drugs. cosmetics that make therapeutic claims are regulated as drugs and cosmetics and must meet the labelling requirements for both ; a good way to tell if you are buying a cosmetic that is also regulated as a drug is to see if the first ingredient listed is an “ active ingredient “ . The active ingredient is the chemical that makes the product effective, and the manufacturer must have proof that it is safe for its intended use.

For products that are both drugs and cosmetics, the regulations require that active ingredients be listed first on these products, followed by the list of cosmetic ingredients in order of decreasing predominance. Before products with both a cosmetic and drug classification can be marketed, they must be scientifically proven safe and effective for their therapeutic claims. If they are not, FDA considers them to be misbranded and can take regulatory action.

Classifying as drug or as cosmetic or both, depend not on the product’s inherent properties, but rather on the product’s intended use. Under the ACT cosmetic are intended to be rubbed, sprinkled ..... While drugs are intended for use in the diagnosis, cure .....~ in distinguishing drugs from cosmetics , the FDA has focused on the latter part of the drug definition - i . e whether a product is intended to affect the structure of the body .

Because even water , when applied to the skin , temporarily changes the skin ‘ s structure ; the FDA and the courts have distinguished drugs from cosmetics by focusing on a product “ intended use “ which can be determined by examining the labeling , advertising , and other circumstances surrounding the manufacturer ‘ s representations about the product . This “intended use “doctrine means that a product utterly lacking of drug characteristics nevertheless will be classified as a drug if the manufacturer claims that the product acts like a drug. Conversely, cosmetic products that may behave like drugs will generally be classified as cosmetics provide that the manufacturer makes no drug claims about the product.

### What about “cosmeceuticals”?

The FD&C Act does not recognise any such category as cosmeceuticals. A product can be a drug or a combination of both but the term cosmeceutical has no meaning under the law. Cosmeceuticals are the result of innovation in both the cosmetic and pharmaceutical industries in a response to changing attitudes towards cosmetics. Cosmeceutical was generally accepted as meaning a product that offers both cosmetic and drug – like benefits. The current definition:

Cosmeceuticals are defined as hybrid products, derived from cosmetics and drugs that enhance aesthetic appearance and make therapeutic claims with respect to affecting structure or function of the body and / or mitigation, treating, or preventing disease?

This definition includes products such as depilatories, anti – dandruff, skin care, sun blocks and skin bleaching products. Prior to cosmeceuticals we had only two choices for looking more youthful makeup or surgery. Thanks to cosmeceuticals we have a third choice.

How FDA defines “soap”?

Not every product marketed as soap meets FDA’s definition of the term. FDA interprets the term “soap” to apply only when

- The bulk of the non volatile matter in the product consists of an alkali salt of fatty acids and the product’s detergent properties are due to the alkali – fatty acid compounds.
- The product is labelled, sold, and represented solely as soap.

If a product intended to cleanse the human body does not meet all the criteria for soap, as listed above, it is either a cosmetic or a drug. For example:

If a product

- consists of detergents or
- Primarily of alkali salts of fatty acids and
- Is intended not only for cleansing but also other cosmetic uses , such as beautifying or moisturising

It is regulated as a cosmetic.

If a product

- Consists of detergents or
- Primarily of alkali salts of fatty acids and
- Is intended not only for cleansing but also to cure , treat , or prevent disease or to affect the structure or any function of the human body

It is regulated as drug.

If a product

- Is intended solely for cleansing the human body and
- Has the characteristics consumers generally associate with soap
- Does not consist primarily of alkali salts of fatty acids

It may be defined in labelling as soap, but it is regulated as a cosmetic

**CFSAN/Office of Cosmetics and Colors**  
**Center for food safety and applied nutrition**  
**March 3, 2005**  
**FDA Authority Over Cosmetics.**

What does the law say about cosmetic safety and labeling?

The two most important laws pertaining to cosmetics marketed in the United States are the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act) and the Fair Packaging and Labeling Act (FPLA).

The FD&C Act prohibits the marketing of adulterated or misbranded cosmetics in interstate commerce. Violations of the Act involving product composition--whether they result from ingredients, contaminants, processing, packaging, or shipping and handling--cause cosmetics to be adulterated and subject to regulatory action. Under the FD&C Act, a cosmetic is adulterated if--

- "it bears or contains any poisonous or deleterious substance which may render it injurious to users under the conditions of use prescribed in the labeling thereof, or under conditions of use as are customary and usual" [with an exception made for hair dyes];
- "it consists in whole or in part of any filthy putrid, or decomposed substance";
- "it has been prepared, packed, or held under insanitary conditions whereby it may have become contaminated with filth, or whereby it may have been rendered injurious to health";
- "its container is composed, in whole or in part, of any poisonous or deleterious substance which may render the contents injurious to health"; or
- except for hair dyes, "it is, or it bears or contains, a color additive which is unsafe within the meaning of section 721(a)" of the FD&C Act. (FD&C Act, sec. 601)

Improperly labeled or deceptively packaged products are considered misbranded and subject to regulatory action. Under the FD&C Act, a cosmetic is considered misbranded if--

- "its labeling is false or misleading in any particular";
- its label does not include all required information;
- the required information is not adequately prominent and conspicuous;
- "its container is so made, formed, or filled as to be misleading";
- it is a color additive, other than a hair dye, that does not conform to applicable regulations issued under section 721 of the FD&C Act; and
- "its packaging or labeling is in violation of an applicable regulation issued pursuant to section 3 or 4 of the Poison Prevention Packaging Act of 1970." (FD&C Act, sec. 602)

In addition, under the authority of the FPLA, FDA requires an ingredient declaration to enable consumers to make informed purchasing decisions. Cosmetics that fail to comply with the FPLA are considered misbranded under the FD&C Act.

It is important to understand that Congress passes the laws that govern the United States. To put those laws into effect, Congress authorizes certain government agencies, including FDA, to create and enforce regulations, but only as authorized under the law. A change in FDA's statutory authority over cosmetics would require Congress to change the law.

Does FDA approve cosmetics before they go on the market?

FDA's legal authority over cosmetics is different from other products regulated by the agency, such as drugs, biologics, and medical devices. Cosmetic products and ingredients are not subject to FDA premarket approval authority, with the exception of color additives. However, FDA may pursue enforcement action against violative products, or against firms or individuals who violate the law.

Who is responsible for substantiating the safety of cosmetics?

Cosmetic firms are responsible for substantiating the safety of their products and ingredients before marketing. Failure to adequately substantiate the safety of a cosmetic product or its ingredients prior to marketing causes the product to be misbranded unless the following warning statement appears conspicuously on the principal display panel of the product's label:

"Warning--The safety of this product has not been determined." (21 CFR 740.10)

In addition, regulations prohibit or restrict the use of several ingredients in cosmetic products and require warning statements on the labels of certain types of cosmetics.

In general, except for color additives and those ingredients which are prohibited or restricted from use in cosmetics by regulation, a manufacturer may use any ingredient in the formulation of a cosmetic provided that the ingredient and the finished cosmetic are safe, the product is properly labeled, and the use of the ingredient does not otherwise cause the cosmetic to be adulterated or misbranded under the laws that FDA enforces.

Can FDA order the recall of a hazardous cosmetic from the market?

Recalls of cosmetics are voluntary actions taken by manufacturers or distributors to remove from the marketplace products that represent a hazard or gross deception, or that are somehow defective. FDA categorizes a firm's action as a recall (as opposed to a market withdrawal) when it determines that the product hazard or defect represents a violation of the FD&C Act.

FDA is not authorized to require recalls of cosmetics but does monitor companies that conduct a product recall and may request a product recall if the firm is not willing to remove dangerous products from the market without FDA's written request. Recalls are addressed in Title 21 of the Code of Federal Regulations (CFR), sections 7.40 through 7.59.

What actions can FDA take against firms that market adulterated or misbranded cosmetics?

FDA may take regulatory action if it has information to support that a cosmetic is adulterated or misbranded. The agency can pursue action through the Department of Justice in the federal court system to remove adulterated and misbranded cosmetics from the market. To prevent further shipment of an adulterated or misbranded product, the agency may request a federal district court to issue a restraining order against the manufacturer or distributor of the violative cosmetic. Violative cosmetics may be subject to seizure. FDA also may initiate criminal action against a person violating the law.

In addition, FDA works closely with the U.S. Customs Service to monitor imports. Under section 801(a) of the FD&C Act, imported cosmetics are subject to review by FDA at the time of

entry through U.S. Customs. Products that do not comply with FDA laws and regulations are subject to refusal of admission into the United States. Violative products must be brought into compliance (if feasible), destroyed, or re-exported.

FDA takes regulatory action based upon agency priorities, consistent with public health concerns and available resources.

Can FDA inspect cosmetic manufacturers ?

FDA can and does inspect cosmetic manufacturing facilities to assure cosmetic product safety and determine whether cosmetics are adulterated or misbranded under the FD&C Act or FPLA.

Does FDA test cosmetics ?

The FD&C Act does not subject cosmetics to FDA premarket approval in order to be marketed legally. However, FDA collects samples for examination and analysis as part of its plant inspections, import inspections, and follow-up to complaints of adverse reactions. FDA may also conduct research on cosmetic products and ingredients to address safety concerns.

The agency does not function as a private testing laboratory, and in order to avoid even the perception of conflict of interest, does not recommend private laboratories to consumers or manufacturers for sample analysis. Testing laboratories are listed in your telephone directory.

Must cosmetic manufacturers register with FDA ?

Manufacturers are not required to register their cosmetic establishments, file data on ingredients, or report cosmetic-related injuries to FDA. However, companies are encouraged to register their establishments and file Cosmetic Product Ingredient Statements with FDA's Voluntary Cosmetic Registration Program (VCRP).

## **Japanese Regulations**

([4]; Mitsui, 1997 [174]; RPA, 2004 [214])

In Japan an approvals system in force. There are many types of regulation governing the manufacture and sale of cosmetics and as cosmetics are used on the human body on a daily basis, stipulations regarding their quality, efficacy and safety are made in the Japan's Pharmaceutical Affairs Law (PAL) (Law No. 145, 1960).

This law , which concerns peoples health , sets forth regulations regarding the quality , efficacy , safety and proper use of drugs , quasi – drugs , cosmetics and medical devices , and plays a very important role in improving the health of the Japanese people and ensuring they can live healthy lives .

### **Definition of cosmetics:**

In article 2 of the PAL, cosmetics are defined as “items applied to the human body by means of rubbing , sprinkling and the like , for the purpose of cleaning , beautifying , adding the attractiveness , altering the appearance or keeping the skin or hair in good condition , which should be items with a mild action on the human body”.

Items having a mild action mean those which do not have a strong action on the human body even if misused, and which have high safety. More specifically this means the following:

- Items whose purpose is to cleanse the human body: soap, face cleansing cosmetics, shampoo, cleansing lotion, pack, etc.
- Items whose purpose is to beautify the human body : lipstick , fondation and other makeup cosmetics
- Items whose purpose is to enhance peoples' charm: perfume, eau de cologne, other fragrance products, lipstick, manicure preparations and other makeup cosmetics.
- Items whose purpose is to change the appearance: lipstick, mascara, eye shadow and other makeup cosmetics.
- Items whose purpose is to maintain the skin and hair in a health condition: creams, milky lotions, lotions, hair rinses, hair tonics, hair sprays, etc.

### **Definition of Quasi- drug products**

Quasi – drug products occupy a position mid – way between that of drugs and cosmetics, and the effects which they claim to have are within the scope permitted in the PAL

Their definition is given below. however , more specifically , preparations are defined individually on the basis of an overall assessment of such items as ingredients and their quantities , efficacy , method of use , dosage and product form .

In article 2 of the Japan's PAL, Quasi-drugs are described as items which have the purposes listed below, a mild action on the human body, and are not equipment or instruments; and items conforming to this and designated by the Ministry of health and Welfare:

- Prevention of nausea , other such discomfort , bad breath or body odor
- Prevention of prickly heat, festering and the like.
- Prevention of hair loss, hair growth promotion or depilatory action.
- Extermination and repulsion of rats, flies, mosquitoes, fleas, etc... To maintain human and animal health.
- Cotton products intended for sanitary purposes, items having a mild action on the human body: hair color and decolor, permanent waving lotion, items which, besides their cosmetic purpose, are used for the prevention of acne, chapping of skin, itchiness, rash, chilblains...etc. or those which have the additional purpose of disinfecting the skin or the oral cavity, bath preparations.

Some actual Quasi- drugs and their effects are listed in the following:

- Prevention of nausea, other such discomfort, bad breath : mouth freshener ( effect : prevention of nausea , motion sickness , bad breath , etc...)
- Prevention of body odor: deodorants (effect: prevention of armpit and other body odor)
- Prevention of prickly heat, festering and the like: talcum powder (effect prevention of prickly heat.
- Prevention of hair loss, hair growth promotion: hair growth promoter, hair tonic (effects: prevent hair loss, dandruff, itchiness, promote hair growth, nourish hair, etc...)
- Items with depilatory purpose: depilatory (effect: removal of unwanted hair on the arms and legs)
- Items with the purpose of exterminating or repelling rats, flies , mosquitoes , fleas and other insects ) ; insect repellent ( effect : repels mosquitoes , sandflies and the like )
- Cotton products intended for sanitary purposes: sanitary cotton products, cleansing cotton products, sanitary napkins.
- Hair colour (including decolorants and dye removers)
- Permanent waving lotions.
- Items which besides their cosmetic purpose , are used for the prevention of acne , chapping of skin , itchiness , rash , chilblains , etc... or those which have the additional purpose of disinfecting the skin or the oral cavity :
  - (a) Medicated cosmetics for: Prevention of acne, chapping of skin, chilblains and liver spots and freckles due to sun exposure etc... )
  - (b) Medicated dentifrice for prevention of dental caries, pyorrhea, etc...
- Bath preparations (effects: alleviation of prickly heat, stiff shoulders, neuralgia, hemorrhoids, etc...)

Cosmetic Classification:

Cosmetics (including quasi-drugs) can be classified according to their use and area of application. In addition they can be classified by composition and structure. The table is based on usage and classifies cosmetics into skin care cosmetics, makeup cosmetics, body cosmetics, hair care cosmetics and fragrances.

Classification	Usage	Main products
Skin care cosmetics	Cleanses	Face cleansing creams and foams
	Conditioners	Lotions , packs , massage creams
	Protectors	Milky lotions , moisture creams
Makeup cosmetics	Base makeup	Fondations , face powders
	Point makeup	Lipstick , blushers , eye shadow , eye liners
	Nail care	Nail enamels , nail polish removers
Body cosmetics	Bath	Soaps , liquid cleansers , bath preparations
	Sun cares and suntans	Sunscreen creams , sun oils
	Antiperspirants and deodorants	Deodorant sprays
	Bleaching ,depilatory	Bleaching creams , depilatory creams
	Insect repellents	Insect repellent lotions and sprays
Hair care cosmetics	Cleansing	Shampoos
	Treatments	Rinses, hair treatments
	Hair styling	Hair mousses , hair liquids, pomades
	Permanent waves	Permanent wave lotions
	Hair colors and bleaches	Hair colors, hair bleaches , color rinses
Scalp care cosmetics	Hair growth promoters	Hair growth promoters hair tonics
	Treatments	Scalp treatments
Oral care cosmetics	Toothpastes	Toothpastes
	Mouthwashes	Mouthwashes
Fragrances	Fragrances	Perfumes, eau de Cologne

## **Annexe 2 : Effets secondaires des Parabènes**

### **Episode 2:**

(ROUTLEDGE et Coll., 1998)

In an *in vitro* yeast-based estrogen assay, the four most widely used parabens (namely methyl-, ethyl-, propyl-, and butylparaben) were all found to be weakly estrogenic with the most potent (butylparaben) being 10,000-fold less potent than 17 $\beta$ -estradiol. When administered orally to immature rats, the parabens were inactive. However, subcutaneous administration of butylparaben produced a positive uterotrophic response *in vivo*, although it was approximately 10,000 times less potent than 17 $\beta$ -estradiol. Given their use in a wide range of commercially available topical preparations, it is suggested that the safety in use of these chemicals should be reassessed, with particular attention being paid to estimation of the actual levels of systemic exposure of humans exposed to these chemicals. The acquisition of such data is a prerequisite to the derivation of reliable estimates of the possible human risk of exposure to parabens

(PUGAZHENDHI et Coll., 2005)

This paper addresses the question of whether p-hydroxybenzoic acid, the common metabolite of parabens, possesses oestrogenic activity in human breast cancer cell lines. The alkyl esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) are used widely as preservatives in consumer products to which the human population is exposed and have been shown previously to possess oestrogenic activity and to be present in human breast tumour tissue, which is an oestrogen-responsive tissue. Recent work has shown p-hydroxybenzoic acid to give an oestrogenic response in the rodent uterotrophic assay. We report here that p-hydroxybenzoic acid possesses oestrogenic activity in a panel of assays in human breast cancer cell lines. p-Hydroxybenzoic acid was able to displace [(3)H]oestradiol from cytosolic oestrogen receptor of MCF7 human breast cancer cells by 54% at  $5 \times 10^{-6}$ -fold molar excess and by 99% at  $10^{-7}$ -fold molar excess. It was able to increase the expression of a stably integrated oestrogen responsive reporter gene (ERE-CAT) at a concentration of  $5 \times 10^{-4}$  M in MCF7 cells after 24 h and 7 days, which could be inhibited by the anti-oestrogen ICI 182 780 (Faslodex, fulvestrant). Proliferation of two human breast cancer cell lines (MCF7, ZR-75-1) could be increased by  $10^{-5}$  M p-hydroxybenzoic acid. Following on from previous studies showing a decrease in oestrogenic activity of parabens with shortening of the linear alkyl chain length, this study has compared the oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid where the alkyl grouping is no longer present with methylparaben, which has the shortest alkyl group. Intrinsic oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid was similar to that of methylparaben in terms of relative binding to the oestrogen receptor but its oestrogenic activity on gene expression and cell proliferation was lower than that of methylparaben. It can be concluded that removal of the ester group from parabens does not abrogate its oestrogenic activity and that p-hydroxybenzoic acid can give oestrogenic responses in human breast cancer cells.

### **Episode 3 :**

(OISHI, 2002)

Parabens are p-hydroxybenzoic acid ester compounds widely used as preservatives in foods, cosmetics, toiletries and pharmaceuticals. These compounds exert a weak estrogenic activity as determined by in vitro estrogen receptor assay and in vivo uterotrophic assay. In a previous study, it was demonstrated by the present author that exposure of post-weaning mammals to butyl paraben adversely affects the secretion of testosterone and the function of the male reproductive system. In the present study, it is shown that propyl paraben also adversely affects the hormonal secretion and the male reproductive functions. Propyl paraben was administered to 3-week-old rats which were divided into four groups of eight animals each, at doses of 0.00, 0.01, 0.10 and 1.00% with the AIN93G modified diet. At the end of 4 weeks, the rats were sacrificed by decapitation and the weights of testes, epididymides, prostates, seminal vesicles and preputial glands were determined. There were no treatment-related effects of propyl paraben on the organ weights in any of the study groups. The cauda epididymal sperm reserves and concentrations decreased in a dose-dependent manner and the difference was significant at dose of 0.10% and above. Daily sperm production and its efficiency in the testis of all groups receiving propyl paraben significantly decreased. The serum testosterone concentration decreased in a dose-dependent manner and the decrease was significant in the group that received the highest dose. The exposure level at which this effect was observed is the same as the upper-limit acceptable daily intake (10 mg/kg body weight/day) of parabens in the European Community and Japan.

### **Episode 4 :**

(HARVEY et DARBRE, 2004)

In the decade that has elapsed since the suggestion that exposure of the foetal/developing male to environmental oestrogens could be the cause of subsequent reproductive and developmental effects in men, there has been little definitive research to provide conclusions to the hypothesis. Issues of exposure and low potency of environmental oestrogens may have reduced concerns. However, the hypothesis that chemicals applied in body care cosmetics (including moisturizers, creams, sprays or lotions applied to axilla or chest or breast areas) may be affecting breast cancer incidence in women presents a different case scenario, not least in the consideration of the exposure issues. The specific cosmetic type is not relevant but the chemical ingredients in the formulations and the application to the skin is important. The most common group of body care cosmetic formulation excipients, namely p-hydroxybenzoic acid esters or parabens, have been shown recently to be oestrogenic in vitro and in vivo and now have been detected in human breast tumour tissue, indicating absorption (route and causal associations have yet to be confirmed). The hypothesis for a link between oestrogenic ingredients in underarm and body care cosmetics and breast cancer is forwarded and reviewed here in terms of: data on exposure to body care cosmetics and parabens, including dermal absorption; paraben oestrogenicity; the role of oestrogen in breast cancer; detection of parabens in breast tumours; recent epidemiology studies of underarm cosmetics use and breast cancer; the toxicology database; the current regulatory status of parabens and regulatory toxicology data uncertainties. Notwithstanding the major public health issue of the causes of the rising incidence of breast cancer in women, this call for further research may provide the first evidence that environmental factors may be adversely affecting human health by endocrine disruption, because exposure to oestrogenic chemicals through application of body care products (unlike diffuse environmental chemical exposures) should be amenable to evaluation, quantification

and control. The exposure issues are clear and the exposed population is large, and these factors should provide the necessary impetus to investigate this potential issue of public health.

### **Episode 5 :**

(HANDA et Coll., 2006)

For many years, methylparaben (MP) has been used as a preservative in cosmetics. In this study, we investigated the effects of ultraviolet-B (UVB) exposure on MP-treated human skin keratinocytes. HaCaT keratinocytes were cultured in MP-containing medium for 24 h, exposed to UVB (15 or 30 mJ/cm<sup>2</sup>) and further cultured for another 24 h. Subsequent cellular viability was quantified by MTT-based assay and cell death was qualified by fluorescent microscopy and flow cytometry. Oxidative stress, nitric oxide (NO) production and cellular lipid peroxidation were measured using fluorescent probes. In addition, activation of nuclear factor kappa B and activator protein-1 was assessed by electro-mobility gel-shift assay. Practical concentrations of MP (0.003%) had a little or no effect on cellular viability, oxidative stress, NO production, lipid peroxidation and activation of nuclear transcription factors in HaCaT keratinocytes. Low-dose UVB also had little or no effect on these parameters in HaCaT keratinocytes. However, UVB exposure significantly increased cell death, oxidative stress, NO production, lipid peroxidation and activation of transcription factors in MP-treated HaCaT keratinocytes. These results indicate that MP, which has been considered a safe preservative in cosmetics, may have harmful effects on human skin when exposed to sunlight.

### **Episode 6 :**

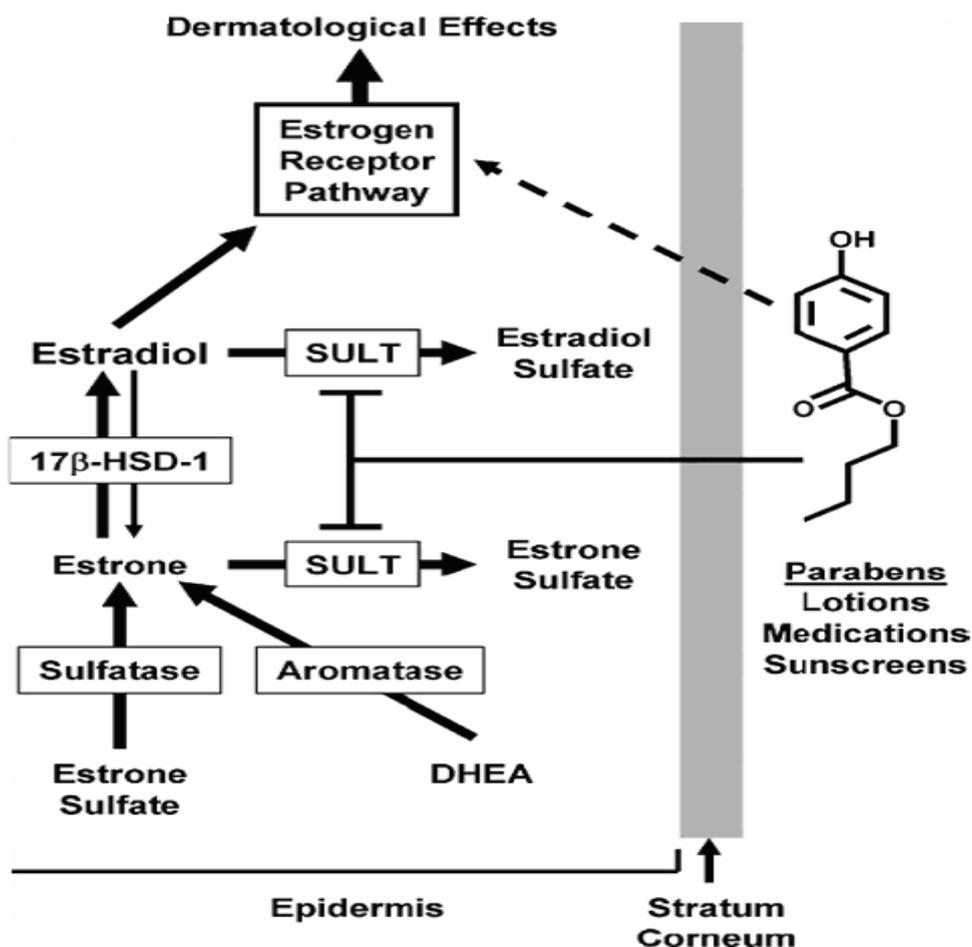
(ISHIWATARI et Coll., 2007)

The aim of this study was to clarify the effects of the daily use of methyl paraben (MP) on human skin. The concentrations of MP in the stratum corneum (SC) of the human forearm were measured using the cup method and GC-MS after daily applications of MP containing formulations. The study also investigated the effects of long-term exposure to MP on keratinocytes in vitro. Normal human keratinocytes and the skin equivalents were cultured in the medium containing MP. The following changes were analysed: proliferating ability, apoptotic cells, morphological changes, mRNA and protein expressions. After 1 month of daily applications of MP containing formulations, MP remained unmetabolized and persisted slightly in the SC. MP decreased the proliferating ability of keratinocytes and changed the cell morphology. MP also decreased the expressions of hyaluronan synthase 1 and 2 mRNAs and type IV collagen. In contrast, it increased the expressions of involucrin and HSP27. Furthermore, MP influenced the epidermal differentiation of the skin equivalent. These results suggest that MP exposure through application of dermatological formulations results in MP persistence and accumulation in the SC, and that MP might influence the aging and differentiation of keratinocytes.

**Episode 7 :**

(PRUSAKIEWICZ et Coll., 2007)

Parabens (p-hydroxybenzoate esters) are a group of widely used preservatives in topically applied cosmetic and pharmaceutical products. Parabens display weak associations with the estrogen receptors *in vitro* or in cell based models, but do exhibit estrogenic effects in animal models. It is our hypothesis that parabens exert their estrogenic effects, in part, by elevating levels of estrogens through inhibition of estrogen sulfotransferases (SULTs) in skin. We report here the results of a structure-activity-relationship of parabens as inhibitors of estrogen sulfation in human skin cytosolic fractions and normal human epidermal keratinocytes. Similar to reports of paraben estrogenicity and estrogen receptor affinity, the potency of SULT inhibition increased as the paraben ester chain length increased. Butylparaben was found to be the most potent of the parabens in skin cytosol, yielding an IC<sub>50</sub> value of 37±5  $\mu$ M. Butylparaben blocked the skin cytosol sulfation of estradiol and estrone, but not the androgen dehydroepiandrosterone. The parabens were also tested as inhibitors of SULT activity in a cellular system, with normal human epidermal keratinocytes. The potency of butylparaben increased three-fold in these cells relative to the IC<sub>50</sub> value from skin cytosol. Overall, these results suggest chronic topical application of parabens may lead to prolonged estrogenic effects in skin as a result of inhibition of estrogen sulfotransferase activity. Accordingly, the skin anti-aging benefits of many topical cosmetics and pharmaceuticals could be derived, in part, from the estrogenicity of parabens.



**Episode 8 :**

(SIVASEGARAN et Coll., 2007)

Pre-screening of cosmetic ingredients is vital for consumer safety. Previous in vivo techniques, such as the Draize test, have proved to be unreliable in predicting ocular irritancy and therefore there is a need for alternate testing methodologies. One such test is the scanning laser in vitro assay system which quantifies irritancy based on the focusing ability of the cultured bovine lens. In combination with confocal microscopy, a more thorough documentation of ocular irritancy can be achieved. This study investigates the response of cultured bovine lenses over time to butyl, methyl and propyl parabens, which are common antimicrobial agents found in cosmetic and ophthalmic products. The focusing ability of the lens was measured with an automated laser scanner over a period of 96 h. At 120 h post-treatment, the lenses were analysed by using a confocal laser scanning microscope to determine the characteristics of nuclei, and the morphology and distribution of mitochondria within the lenses. Irritancy to the three parabens was investigated at both an optical and cellular level. Each of the parabens was tested at 0.002% and 0.2%, where the 0.2% butyl paraben was found to be the most irritating.

### **Annexe 3 : Liste des tableaux d'étalonnages et chromatographes :**

Annexe 3.1. : Courbes d'étalonnage de solutions MP/ EP et PP / BP dans l'eau.

Annexe 3.2. : Courbes d'étalonnage des parabènes dans une solution méthanol / eau.

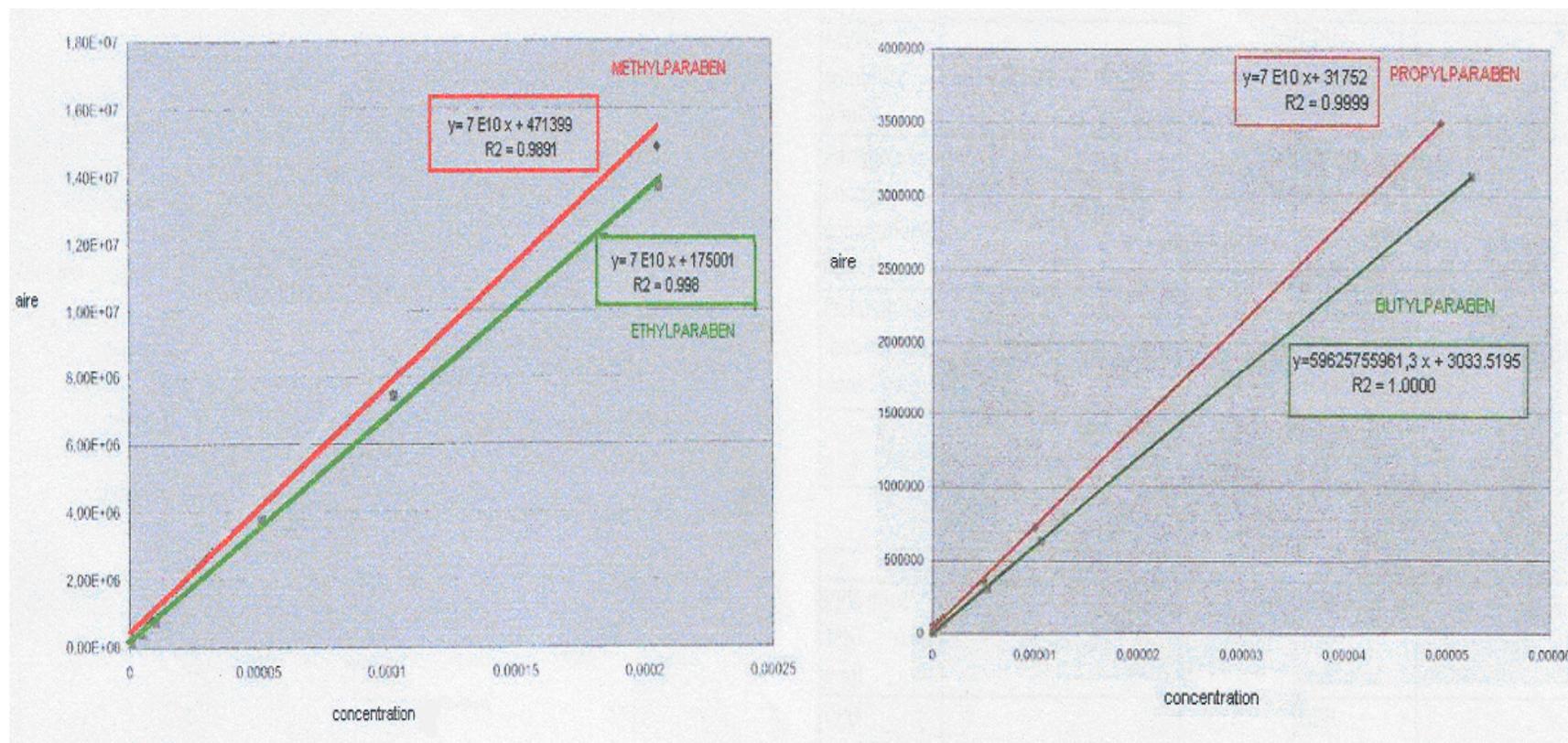
Annexe 3.3. : Courbes d'étalonnage des parabènes dans une solution saline d'albumine bovine 3 %.

Annexe 3.4. : Courbes d'étalonnage du rapport parabène / EI dans une solution saline HSA 1.4 %.

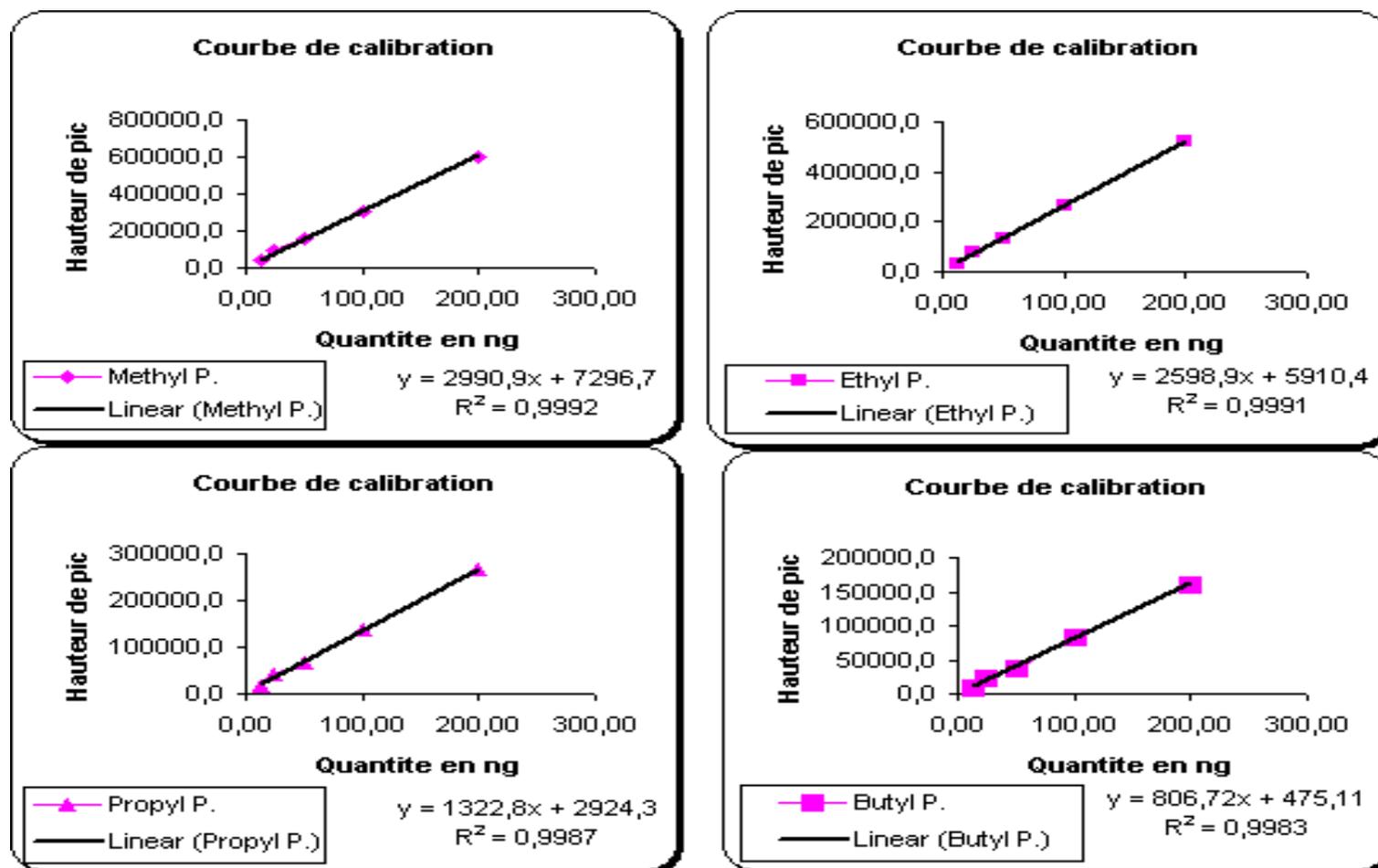
Annexe 3.5. : Chromatographe montrant les pics de parabènes avec l'étalon interne dans une solution méthanolique.

Annexe 3.6. : Chromatographe montrant les pics des parabènes après déprotéinisation (HSA 1.4 %).

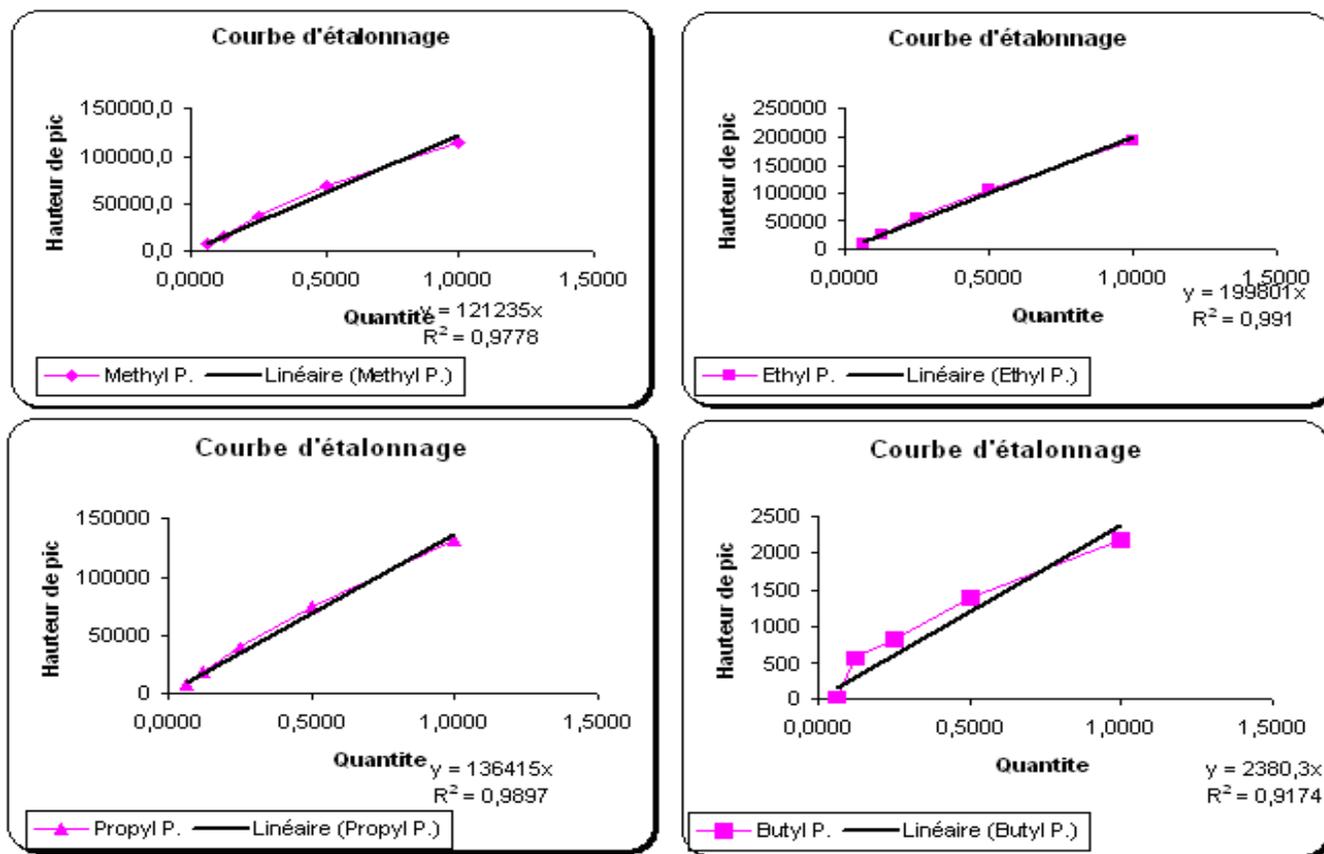
Annexe 3.7. : Chromatographe montrant les pics des parabènes dans le milieu récepteur (HSA 1.4 %).



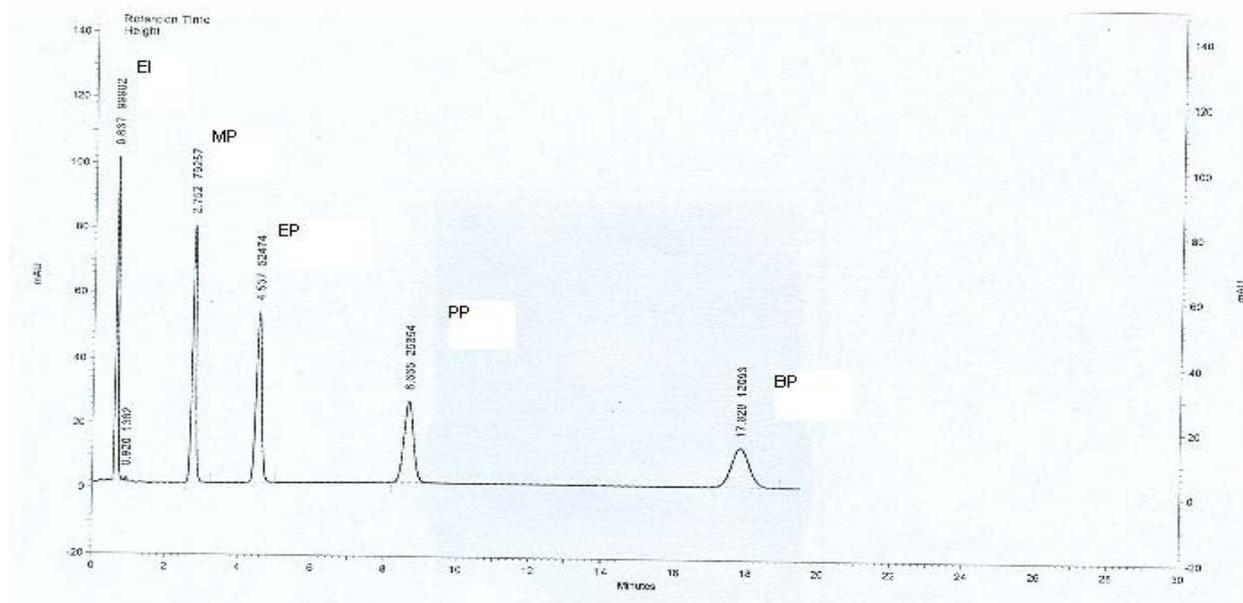
Annexe 3.1. Courbes d'étalonnage de solutions MP/ EP et PP / BP dans l'eau



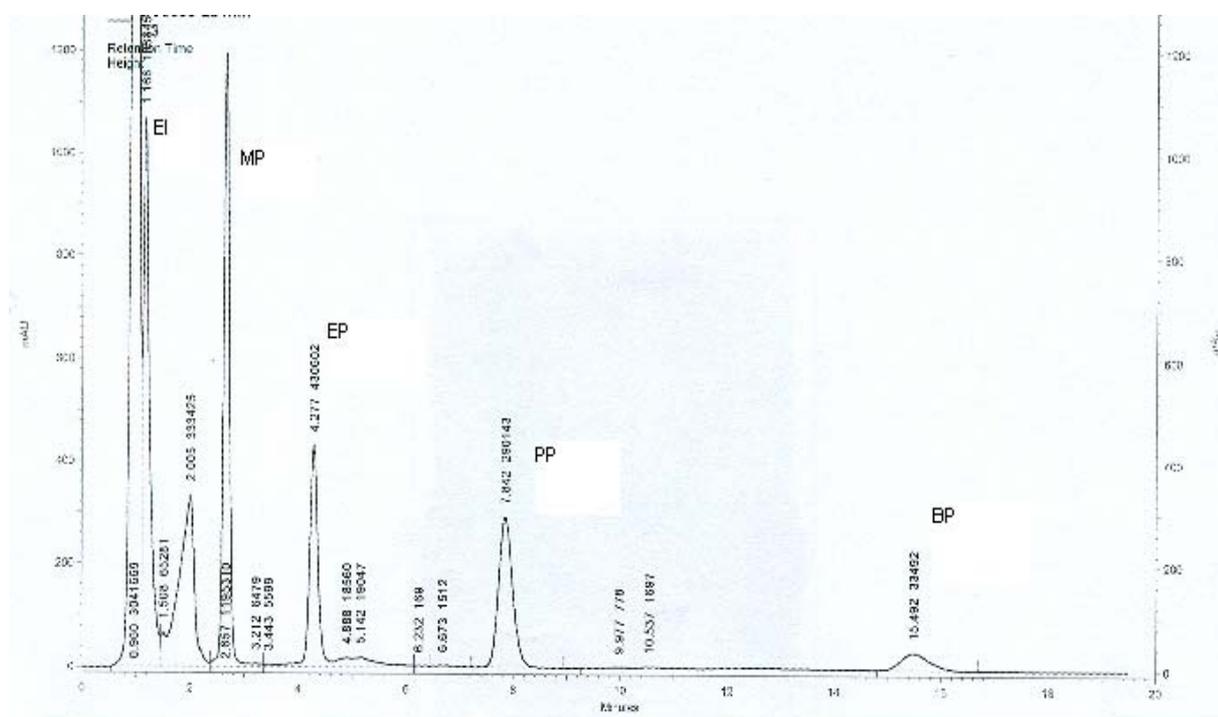
Annexe 3.2. Courbes d'étalonnage des parabènes dans une solution méthanol / eau



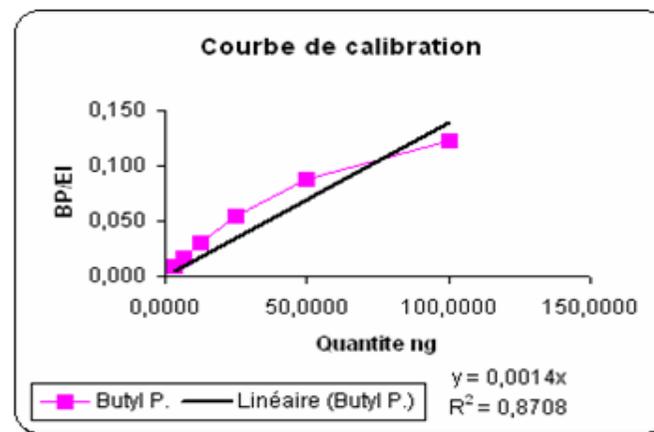
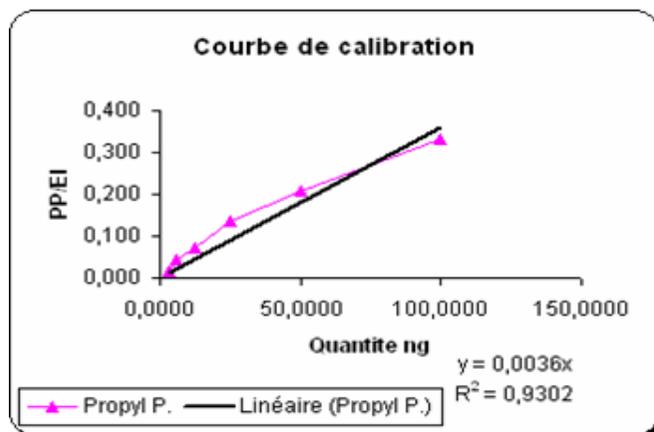
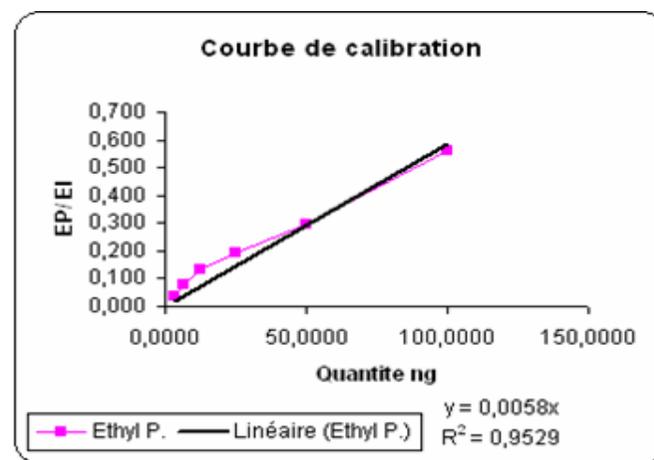
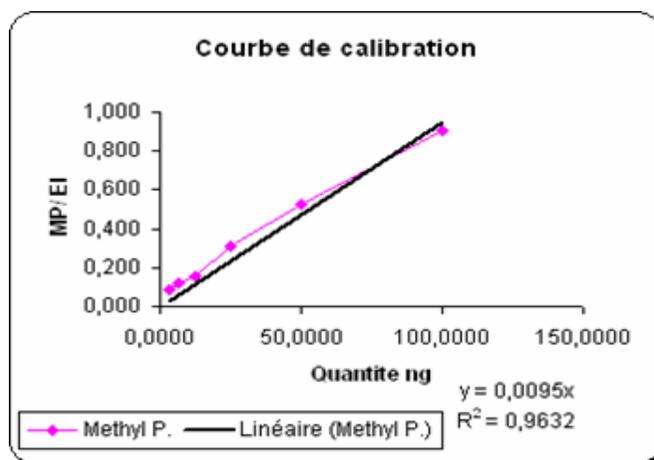
Annexes 3.3. Courbes d'étalonnage des parabènes dans une solution saline d'albumine bovine à 3%



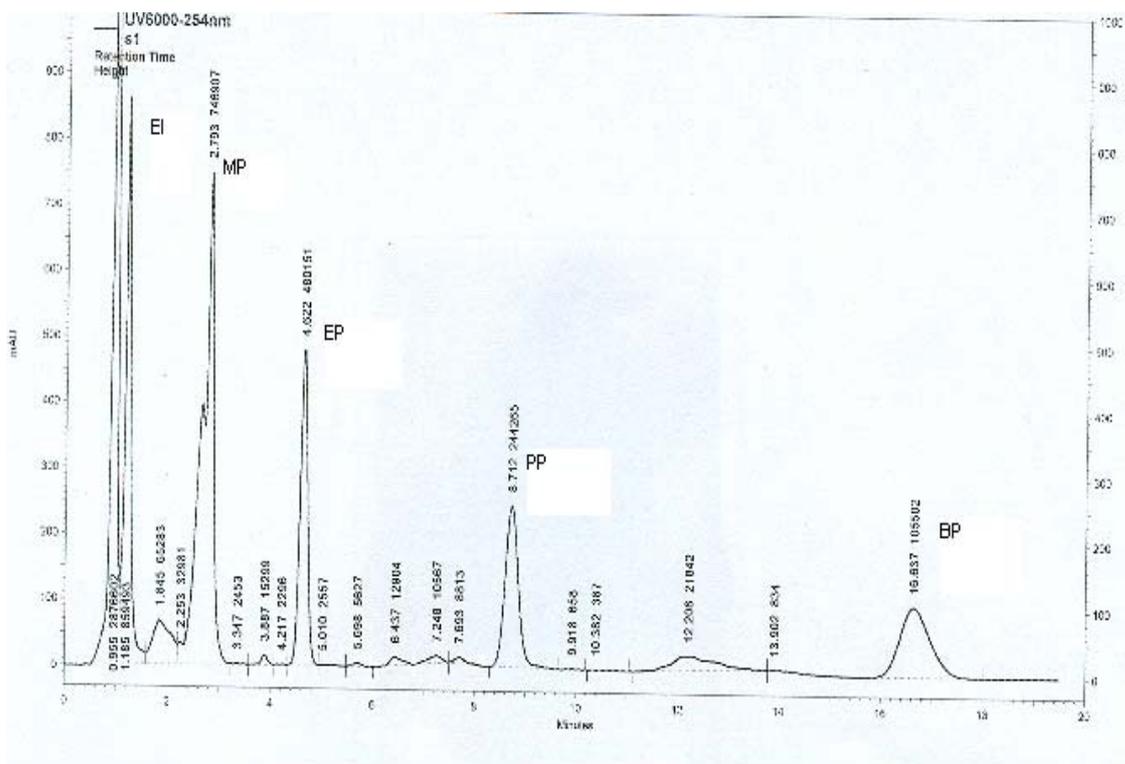
Annexes 3.4. Chromatogramme montrant les pics de parabènes avec l'étalon interne dans une solution méthanolique.



Annexes 3.5. Chromatogramme montrant les pics des parabènes après déprotéinisation (HSA 1.4 %)



Annexes 3.6. Courbes d'étalonnage du rapport parabène / EI dans une solution saline HSA 1.4 %



Annexes 3.7. Chromatographe montrant les pics des parabènes dans le milieu récepteur (HSA 1.4 %)

# Annexe 4 : Une campagne pour des cosmétiques sécurisés

## 12 Ugly Truths Behind the Myth of Cosmetics Safety



### 1. TOXIC CHEMICALS ARE WIDESPREAD IN BEAUTY PRODUCTS—AND IN OUR BODIES.

Every day we use multiple personal care products—from shampoo, to deodorant, toothpaste, lotion and make up—that contain chemical ingredients that are absorbed through the skin, inhaled or ingested. So it's not surprising that synthetic chemicals have gotten into our bodies, our breast milk and our children. Some of these chemicals are linked to cancer, birth defects, learning disabilities and other health problems that are epidemic in our society. Astonishingly, 1 in 2 men, and 1 in 3 women in the U.S. are expected to develop cancer during their lifetimes, according to the National Institute of Environmental Health Sciences.

### 2. THE GOVERNMENT SHOULD BE PROTECTING US, BUT IT'S NOT.

Major loopholes in federal law prevent the U.S. Food and Drug Administration (FDA) or any other government agency from approving the safety of cosmetics and body care products before they can be sold. The European Union now bans more than 1,100 chemicals from personal care products because they may cause cancer, birth defects or reproductive problems. In stark contrast, just nine chemicals are banned from cosmetics in the United States.

### 3. YOU CAN'T BELIEVE INDUSTRY SAFETY CLAIMS.

Manufacturers always say their products are safe. But what do those claims really mean? It may mean that the company has tested the ingredients it uses—but sometimes only to determine if the chemicals cause rashes, swelling or other acute reactions. Companies are not required to test whether the ingre-



dents in their products can cause long-term health effects, like cancer or the inability to have a healthy child. Since there is no government standard of safety, companies can say whatever they want about the safety of their products.

### 4. THE \$60-BILLION COSMETICS INDUSTRY ROUTINELY OPPOSES LAWS THAT WOULD PROTECT CONSUMERS AND THE ENVIRONMENT.

The Cosmetics, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) has lobbied against laws that would control pollution at cosmetics manufacturing plants, require recycled content in packaging, or add more consumer safety information on labels. The industry says it doesn't need laws because it can voluntarily regulate itself. An industry-funded panel called the Cosmetic Ingredient Review panel—not the FDA or any other government agency—is currently in charge of reviewing the safety of cosmetics.

### 5. WE HAVE TO PROTECT OURSELVES UNTIL WE CONVINCHE THE GOVERNMENT TO PROTECT US.

According to Skin Deep, campaign partner Environmental Working Group's interactive product safety database, the highest-concern product categories are:

- Hair color and bleach
- Hair relaxer
- Nail polish
- Skin lightener
- Nail treatment

But even in these highest-concern categories, there are safer product choices an individual can make.

### 6. TWO OF THE HIGHEST-CONCERN COSMETICS CATEGORIES ARE MARKETED ESPECIALLY TO AFRICAN AMERICAN WOMEN.

Products promising lighter skin and straighter hair are problematic because of their message about what is considered beautiful. But the Skin Deep report shows that some hair relaxers and skin lighteners share a second problem: they contain ingredients that are linked to cancer, sensitization of the skin and other health concerns.

### 7. MOST PRODUCT INGREDIENTS HAVE NEVER BEEN ASSESSED FOR LINKS TO LONG-TERM HEALTH PROBLEMS. HOWEVER, EVEN INGREDIENTS THAT ARE KNOWN TO CAUSE HARM CAN BE PUT INTO PERSONAL CARE PRODUCTS. EIGHT OF THE MOST PROBLEMATIC ARE:

#### MERCURY

Possible human carcinogen. Possible human reproductive or developmental toxin. Found in some eye drops and ointment.

#### LEAD ACETATE

Known human reproductive and developmental toxin. Prohibited for use in cosmetics in the European Union. Found in some hair dyes and cleanser.

#### FORMALDEHYDE

Known human carcinogen. Found in some nail treatments.

#### TOLUENE

Possible human reproductive or developmental toxin. May contain harmful impurities or breakdown products. Found in some nail polish.

#### PETROLEUM DISTILLATES

Possible human carcinogen. May contain harmful impurities or breakdown products. Prohibited for use in cosmetics in the European Union. Found in some mascara, perfume, foundation, lipstick and lip balm.

#### ETHYLACRYLATE

Unsafe according to International Fragrance Association. Possible human carcinogen. Found in some mascara.

#### COAL TAR

Known human carcinogen. Prohibited for use in cosmetics in the European Union. May contain harmful impurities or breakdown products. Found in dandruff shampoos, anti-itch creams and hair dyes.

#### DIBUTYL PHTHALATE

Prohibited for use in cosmetics in the European Union. Possible human reproductive or developmental toxin. Endocrine disruptor. Found in some nail polish, perfume, hair spray.

### 8. PAYING MORE DOESN'T BUY YOU SAFER PRODUCTS.

A review of the 15,000 products now in the Skin Deep database found that the more expensive products were no safer than the less expensive brands in each category. Sometimes, paying more means buying more potential harm. The five facial moisturizers of highest concern—made by Avon, Elizabeth Arden, Ultimea, Clarins and Estée Lauder—cost \$7.61 more per ounce than the five facial moisturizing products made of ingredients that pose the lowest concern. The five facial

moisturizers with lowest-concern ingredients are made by See the Dawn, Terressentials, Grateful Body, Keys Soap and Aubrey Organics.

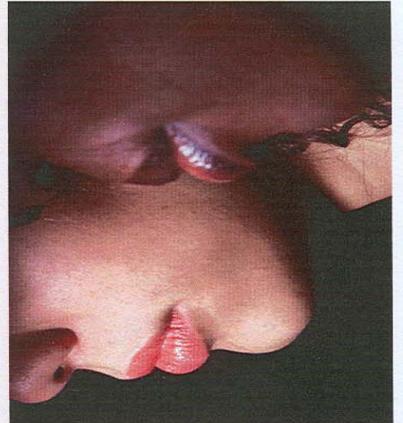
### 9. MEN HAVE PROBLEMS TOO.

Two products marketed to men to color gray hair (EBL GreyBan and Grecian Formula 16) contain lead acetate—which can harm fertility and impact the development of a child before birth. Just for Men Shampoo-in Hair Color ranks as the highest concern shampoo. Some after-shave lotions, anti-dandruff shampoos, teeth whiteners, sunless tanning products and colognes are also in the highest-concern category. Skin Deep lists many safer alternatives in each category.

### 10. THE WORD "NATURAL" ON A PRODUCT LABEL DOESN'T MEAN IT'S SAFE—OR NATURAL.

OPI Natural Nail Strengtheners has one of the highest hazard ratings of the 15,000 products in the Skin Deep database. What's so "natural" about a product with 11 different ingredients that raise health concerns? OPI nail polish and nail treatments contain toluene and formaldehyde. Two of the top ingredients of concern (see #7) because of scientific evidence linking them to cancer and birth defects.

OPI Update: OPI Products, the world's largest nail polish manufacturer, responded to mounting pressure from consumers by agreeing to remove dibutyl phthalate from its nail products, but continues to use toluene and formaldehyde, chemicals linked to cancer and birth defects.



**11. COSMETICS COMPANIES MAKE PRODUCTS AT BOTH ENDS OF THE SAFETY SCALE.**

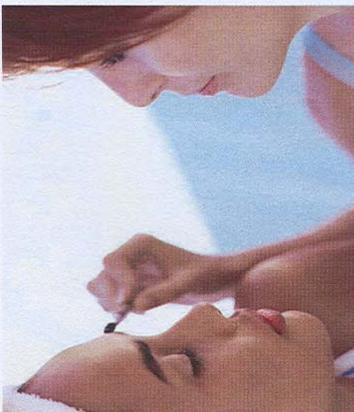
Of the more than 200 mascaras on the Skin Deep website, Maybelline Illegal Lengths Washable Mascara is ranked as the highest-concern mascara. Maybelline is owned by the French company L'Oréal, which also makes L'Oréal Waterproof Voluminous Volume Building Mascara, ranked as one of the safer mascara products. Another industry giant, Estee Lauder, makes the bubble baths of highest concern, Sea Plunge Lathering Soak and White Linen Bath and Shower Gel, but also makes the low-concern Aveda Energizing Composition bubble bath.

One large company often makes many brands, sometimes producing different brands in the same factory. Estee Lauder-branded products have an overall Skin Deep ranking of 4.1. But other Estee Lauder-owned brands in the Skin Deep database have different levels of concern:

Estee Lauder Brand	Skin Deep Score
Aveda	2.6
Bumble and Bumble	3.3
MAC	3.2
Clinique	3.6
Prescriptives	3.7
Origins	4
Estee Lauder	4.1

**12. SMALL EXPOSURES CAN ADD UP TO HARM.**

The cosmetics industry says it's safe to put chemicals that can cause cancer, infertility or other health problems into personal care products because the amount in each product is too small to matter. But count the products you use in a single day—toothpaste, soap, shampoo, hair conditioner, hair gel, deodorant, body lotion, sunscreen, shaving products and makeup—and think about how many products you use in a year, and over a lifetime. Chemicals linked to cancer and birth defects do not belong in personal care products, period.



**THE TRUTH CAN ALSO BE BEAUTIFUL.**

Some companies are making safer products today and striving to make even safer products tomorrow. More than 450 companies have signed the Compact for Safe Cosmetics, a pledge to remove hazardous chemicals and replace them with safe alternatives within three years.

Some of the largest companies in the natural products industry have signed the Compact. But none of the cosmetic industry giants have signed...yet.

The Campaign for Safe Cosmetics needs your help to convince Avon, Estee Lauder, L'Oréal, Procter & Gamble, Revlon, OPI and other cosmetics companies to sign the Compact.

For a full list of Compact signers, please visit [www.safe cosmetics.org](http://www.safe cosmetics.org). Please join us in our efforts to give the cosmetics industry a makeover!

**The Campaign for Safe Cosmetics**  
[www.SafeCosmetics.org](http://www.SafeCosmetics.org)  
 676-1388 Sutter St., Suite 400  
 San Francisco, CA 94109

The Campaign for Safe Cosmetics is a national coalition of health and environmental groups. The Campaign's goal is to protect the health of consumers and workers by requiring the health and beauty industry to phase out the use of chemicals linked to cancer, birth defects and other serious health concerns—and replace them with safe alternatives. Members of the Campaign include:

- Alliance for a Healthy Tomorrow, Breast Cancer Fund, Commonweal, Free the Planet!, Friends of the Earth, Women's Voices for the Earth, Environmental Working Group, Massachusetts Breast Cancer Coalition, National Black Environmental Justice Network and the National Environmental Trust.

**HERE'S WHAT YOU CAN DO.**

**1. LEARN MORE, TAKE ACTION: Visit [www.SafeCosmetics.org](http://www.SafeCosmetics.org)**

- Stay Informed and Take Action Locally! Get the latest news about the campaign, find out if your favorite company has pledged to make safer products, join the Safe Cosmetics Action Network, download an action kit and learn how you can hold a Healthy Cosmetics Spa Party and connect with other activists in your area.

- Choose Safer Products Now. Visit our partner Environmental Working Group's Skin Deep database, the world's largest searchable database of ingredients in cosmetics. Find out if your favorite products contain hazardous chemicals and find safer alternatives.

**2. TELL YOUR COSMETICS COMPANIES YOU WANT SAFE PRODUCTS.**

- Contact the companies that have not signed the Compact for Safe Cosmetics, a pledge to phase out toxic chemicals. Call them, write them, email them to let them know you want safe products now! Look on product packaging for a customer service hotline or website.

**Toll free customer support lines:**

- OPI: 1-800-341-9999
- L'Oréal: 1-800-322-2036
- Estee Lauder: 1-877-311-3883
- Procter & Gamble: 1-800-725-3296
- Revlon: 1-800-473-8366
- Avon: 1-800-445-AVON

**3. SPREAD THE WORD.**

- Tell your friends, coworkers, and family about toxic chemicals in cosmetics and tell them how they can learn more and take action. Make photocopies of this fact sheet or download more materials from our website:

[www.SafeCosmetics.org](http://www.SafeCosmetics.org)

\*Skin Deep, a report by the Environmental Working Group, is a review of ingredients found in 15,000 name-brand personal care products in 2006. Sources for information in this brochure can be found at [www.ewg.org/skindeep/](http://www.ewg.org/skindeep/).



Printed with vegetable oil-based ink on processed chlorine-free, 100% recycled, 50% post-consumer waste paper.



Because "USE DAILY" shouldn't be dangerous advice

**UNMASKED**

**12 Ugly Truths Behind the Myth of Cosmetic Safety**

The Campaign for Safe Cosmetics  
[www.SafeCosmetics.org](http://www.SafeCosmetics.org)

## **Annexe 5 : Comment conserver sans parabènes ?**

(REISCH, 2005)

- Optiphen : Il contient du Phenoxyethanol + Caprylyl glycol.  
Ce mélange est efficace dans les formulations de pH > 6 (Laboratoire Optiphen).
- Optiphen plus : Il contient du Phenoxyethanol + Caprylyl glycol + Acide Sorbic.  
Ce mélange est efficace dans les formulations de pH < 6 (Laboratoire Optiphen).
- Euxyl PE 9010 : Il contient du Phenoxyethanol + Ethylhexylglycerin.  
Ce mélange est fabriqué par un laboratoire allemand, le Schulke & Mayr's
- Arlasik Phospholipid PTM : c'est un dérivé Phospholipide de la noix de coco  
Cette substance développe dans la formulation cosmétique un système d'auto-conservation (Laboratoire Uniquema).
- Mikrokill PCC : Il contient du Phenoxyethanol + chloroxylenol + Caprylglycol.  
Ce mélange est compatible pour les produits de soin de la peau, les cheveux, les écrans solaires (Laboratoire Arch Personal Care Products).
- Cosmocil CG : Il contient du Polyaminopropyl Biguanide.  
C'est une substance bactéricide (Laboratoire Arch Personal Care Products).
- Biovert: Il contient du Glucose + Glucose oxidase + Lacto peroxidase.  
Activé en présence d'oxygène, ce mélange mène à une attaque sur des moisissures et des bactéries (Laboratoire Arch Personal Care Products).

## Annexe 6 : Publications

## Annexe 6.1.: Assessment of principal parabens used in cosmetics

DOI:10.1111/j.1600-0625.2007.00625.x  
www.blackwellpublishing.com/EXD

Original Article

## Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis–dermis layers (*ex-vivo* study)

Sawsan El Hussein<sup>1</sup>, Patrice Muret<sup>1,2</sup>, Michel Berard<sup>2</sup>, Safwat Makki<sup>1,3</sup> and Philippe Humbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cutaneous Engineering and Biology Laboratory (EA 3183, IFR 133), University of Franche-Comté, Besançon, France;

<sup>2</sup>Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, Jean Minjoz Hospital, Besançon, France;

<sup>3</sup>Laboratory of Galenic Pharmacy, Faculty of Medicine and Pharmacy, Franche Comte University, Place Saint Jacques, Besançon, France

Correspondence: Dr Safwat Makki, Cutaneous Engineering and Biology Laboratory (EA 3183, IFR 133), University of Franche-Comté, 25030 Besançon, France, Tel.: +33 381 665291, Fax: +33 381 665290, e-mail: Safwat.makki@univ-fcomte.fr

A part of this work was represented in the second international symposium on 'Skin and formulation', Versailles, (Paris) France, October 2006; and in 'The 8th Annual meeting of Skin Forum', Faculty of Pharmacy, (London) UK, April 2007.

Accepted for publication 11 July 2007

**Abstract:** Concern is continuously raised about the safety of parabens which are present in most of the cosmetic preparations. In this investigation, methyl-, ethyl-, propyl- and butyl paraben (MP, EP, PP, BP), in a commercial cosmetic lotion, were deposited on human skin fragments, collected after surgical operations. Permeated parabens were determined after their passage through human epidermis–dermis layers, fixed on Franz diffusion cells. Bovine serum albumin (3%) was employed as receptor fluid. Then, parabens were assessed by liquid chromatography. The objective of this research was to determine the permeation of these molecules through human epidermis–dermis layers, and their possible passage to body tissues and/or accumulation in skin layers. Two groups of experiments were performed. In the first experimental group (G1), unique doses of the cosmetic were deposited on skin fragments fixed on Franz cells ( $n = 6$ ), at time 0 h, followed with different withdrawn times

of the receptor fluid at 12, 24 and 36 h. G1 results demonstrated that parabens penetration was influenced by their lipophilicity: more lipophilic the parabens were (BP > PP > EP > MP), less they crossed the skin layers (BP < PP < EP < MP). The second experimental group (G2) was constituted of three equal deposits on each Franz cell ( $n = 6$ ) at different hour times 0, 12 and 24 h followed with three withdrawn times of the receptor fluid at 12, 24 and 36 h. The G2 results indicated that investigated parabens had significant increasing permeations in skin layers. This situation provokes the accumulation of these molecules which were considered by some authors as the cause of skin toxicities and carcinogenicity.

**Key words:** cosmetic preparations – Franz cell – human skin fragments – parabens – percutaneous penetration

Please cite this paper as: Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through human epidermis–dermis layers (*ex-vivo* study). *Experimental Dermatology* 2007; 16: 830–836.

### Introduction

Cosmetic preparations are used frequently by a great number of people without distinction of age, sex or race and, generally, during a long period of time. Skin care products are composed of various chemicals: active substances, surfactants, solubilizers, perfumes, penetration enhancers, colouring agents, preservatives, etc. These constituents come

in contact with human skin and they could have a local potential penetration, skin layers accumulation and, in specific conditions, an eventual passage to the general circulation.

To predict the risk of dermal absorption of these chemicals and to enable setting safety standards, data are necessary for determining the rate of percutaneous permeation of cosmetic substances (1–3).

As most cosmetic products contain water, preservatives are required to prevent growth of microorganisms. Parabens are antimicrobial substances, which are added to various cosmetic formulations such as lotions, deodorants, shampoo, etc and are frequently employed as preservatives in moisturisers (4). They have inhibitory effects on microbial membrane transport and on the mitochondrial

**Abbreviation:** BSA, bovine serum albumin; BP, butyl paraben; EP, ethyl paraben; G1, first group of experiments; G2, second group of experiments; HPLC, high performance liquid chromatography; MP, methyl paraben; MW, molecular weight; PHBA, *p*-hydroxybenzoic acid; PC, partition coefficient; Log<sub>10</sub> PC, polarity; PP, propyl paraben; WT, withdrawn time.

function processes (5). The first usage of parabens as antimicrobial preservatives in pharmaceutical products was in the middle of 1920 (5). Parabens are applied singly or in combinations with other chemicals in different formulations. The European Cosmetic Directive 76/768/EEC (Annex VI, part 1, reference 12), permits the parabens use with a maximum concentration for each of 0.4% (w/w) and total maximum concentration of 0.8% (w/w). *Ex-vivo* experimentation showed that methyl paraben (MP) potentialises UV-induced damage of skin keratinocytes (6). Moreover, different studies indicated that parabens generate allergic contact dermatitis (7–9), disruption of the spermatogenic system, provoking spermatotoxic effects (10–12) and oestrogenic-like activity (13) leading to breast cancer (14,15).

As concern is raised about the safety of parabens and as they are used nearly in most formulation types of skin-care products (16,17), dermal penetration knowledge is particularly important with respect to estimating doses and their potential effects (18). For these reasons, the assessment of parabens skin permeation is necessary to evaluate the permeated quantities of these molecules.

Cosmetics *ex-vivo* assessment of percutaneous penetration and dermal absorption are recommended for ethical reasons and easy feasibility. These two parameters are keys for the safety evaluation of cosmetic ingredients (19). Franz diffusion cells (20) are widely used as a technique which allows accurate quantification of the penetrated chemicals through the skin. This diffusion cells system is also employed because of its low cost and good reproducibility (21). It is considered as an essential first step to evaluate topical medicines skin penetration (22).

In our study, we assessed parabens permeation through human epidermis–dermis layers. Accurate doses of a commercial cosmetic body lotion were applied on skin fragments. This lotion contains the four most used parabens in cosmetic formulations [MP, ethyl paraben (EP), propyl paraben (PP) and butyl paraben (BP)]. The principal objective of this investigation was to determine the permeation of such molecules through the human epidermis–dermis layers and to predict their possible accumulation in the skin and/or their passage to human blood circulation and body tissues. Our experimental protocol was oriented by the current use of cosmetics in normal daily life: utilisation of skin-care products once or several times a day and/or during long periods.

## Materials and methods

### Chemicals

Parabens are homologous series of hydroxybenzoic acid, esterified at the C4 position. MP, EP, PP and BP powders (purity: 99%), were purchased from Sigma-Aldrich (Strasbourg, France). The cosmetic product employed in our

experiments was a commercial body lotion containing MP, EP, PP, BP purchased from a pharmaceutical shop.

### Skin preparation

Abdominal skins were excised from women ( $n = 8$ ), aged between 35–45 years, during surgical interventions (Jean Minjoz hospital, Besancon, France). The use of female skin, which has generally few hairs, generates reproducible results. The skin previously frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ , was placed at  $+4^{\circ}\text{C}$ , 1 day before the experiments. Subcutaneous fat was removed and the skin was cut into pieces. Each fragment surface was equal to  $16\text{ cm}^2$  ( $4 \times 4$ ).

### Franz cells and parabens epidermal-dermal passage

The study was carried out by using Franz<sup>®</sup> diffusion cell (Franz Cells, Sommerville, NJ, USA) (20). The receptor chambers were filled with an isotonic saline solution of 3% bovine serum albumin to mimic physiological fluid (23). The absorption surface area of each cell was  $3.14\text{ cm}^2$ . The cells were immersed in a constant temperature water bath at  $37^{\circ}\text{C}$  throughout the experiments, so that the skin surface temperature was maintained at  $32^{\circ}\text{C}$ . After equilibration of the skin temperature and a constant agitation of the receptor fluid, accurate doses of the commercial body lotion ( $100\ \mu\text{l} = 45\text{ mg}$ ) were deposited on the upper layer of the skin fragments and were spread with a round-ended glass rod.

Two groups of experiments were carried out as follows:

- The first set of experiments (G1) consisted of a single application ( $100\ \mu\text{l} = 45\text{ mg}$ ) on the skin surface, at time (T) 0 h. For each experiment, six skin pieces were fixed on six Franz cells. The investigation in this group was constituted of four experiments. The receptor fluid was withdrawn (WT) and renewed on three periods of times WT 12 h, WT 24 h and WT 36 h for each cell.
- The second set of experiments (G2) consisted of three repeated spaced equal applications (each deposit =  $100\ \mu\text{l}$ ) on the skin surface, at different times (T): T 0 h, T 12 h and T 24 h. Each experiment was composed of 6 Franz cells. The numbers of experiments of this investigation were four. The receptor fluid was withdrawn and renewed for each cell on three periods of times: WT 12 h before the second application at T 12 h, WT 24 h before the third application at T 24 h and WT 36 h. The objective of G2 experiments was to imitate the repeated usage of a cosmetic product, containing parabens, during a day (a limited period of time).

### High performance liquid chromatography conditions for the determination of parabens concentrations

Parabens were assessed by using high performance liquid chromatography (HPLC) (ThermoFinnigan<sup>®</sup> Thermo

Finnigan, Courtboeuf, France). The mobile phase was constituted of methanol/water (50/50; v/v) and the flow rate was 1.1 ml/min. The stationary phase used was C18 (OmniSpher Varian; 150 × 4.6 mm; 5 μm) (Merck Darmstadt, Germany). An UV detector (Spectra system UV 6000 LP, Courtboeuf, France) was employed at a wave length of 254 nm (24).

### Parabens quantification in the cosmetic lotion

**Calibration curves:** Six aliquots of parabens (MP, EP, PP, BP), in methanolic solutions in a range of 0.6–20 μg/ml, were prepared and injected in the HPLC system. A calibration curve was performed for each paraben.

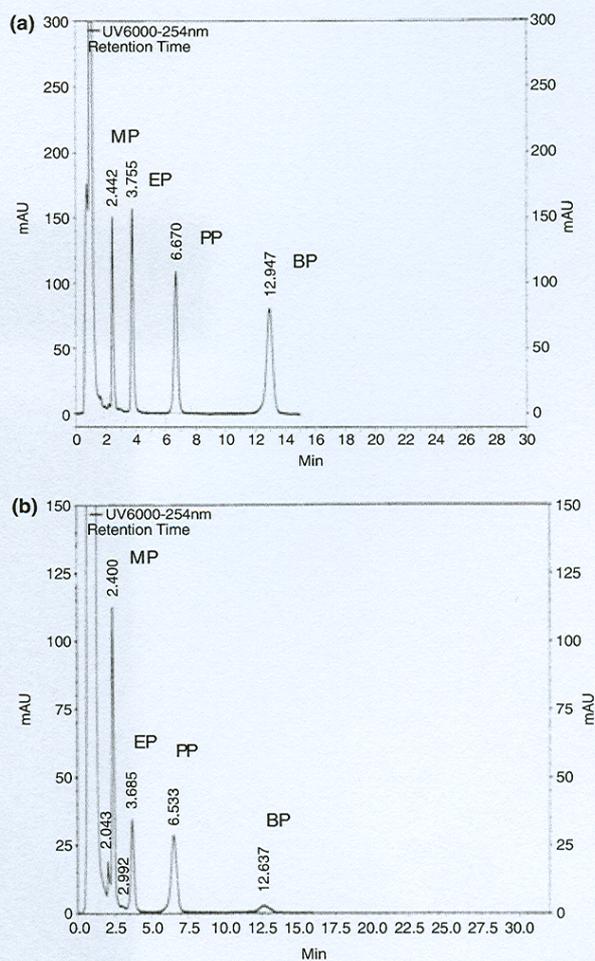
### Parabens concentrations in the cosmetic lotion

A stock solution was prepared by dissolving 1 g of the commercial lotion in 10 ml of methanol (25,26). The solution was centrifuged for 10 min at 1700 g. The supernatant phase was injected into HPLC. The mass of analyte was calculated from the calibration curve for each molecule. Concentration of each paraben in the body lotion is given in Table 1.

### Parabens assessments in the receptor fluid

**Calibration curves:** Seven different concentrations of parabens were prepared in a working range 0.15–10 μg/ml of bovine serum albumin (BSA) (3%). Parabens were extracted with acetonitril/methanol mixture (4/1; v/v), which was well shaken and centrifuged for 10 min (1700 g) (27,28). The supernatant organic solvents containing parabens were removed to clean tubes and completely evaporated under nitrogen at 50°C. To parabens residues, 200 μl of the mobile phase was added. The mixtures were vortexed and then 50 μl of each solution was injected into HPLC in triplicate.

**Parabens extraction from the receptor fluid:** One millilitre of the receptor fluid (from each withdrawn receptor fluid, in each experiment performed, in G1 and G2, containing parabens) was deproteinized with the same method mentioned above and injected into the HPLC apparatus. Chro-



**Figure 1.** (a) Typical chromatogram indicating the retention time of parabens in methanol/water solution. (b) Chromatogram showing parabens detection in the receptor fluid, after cutaneous permeation of the commercial cosmetic lotion.

matographic peak corresponding to each paraben was detected (Fig. 1), and the quantity of each paraben was calculated from calibration curve.

## Results

### The first experimental group

The assessment of the parabens in the receptor fluids indicated that the MP and EP were liberated, from the skin layers, in significant quantities compared with PP and BP. Table 2 indicates the permeated quantity of the four parabens in respect of their polarities. It also indicates their skin layers passage percentage after 36 h. Our data demonstrated that parabens penetration was influenced by their lipophilicity: more lipophilic the parabens were (BP > PP > EP > MP), less they crossed the skin layers (BP < PP < EP < MP).

**Table 1.** Concentrations of four parabens in the commercial body lotion used in the experiments G1 and G2

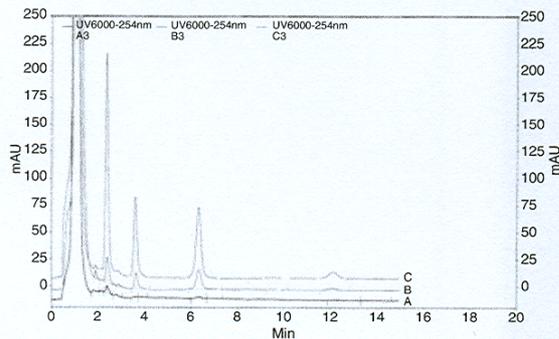
Paraben	Concentration
MP	0.1%
EP	0.08%
PP	0.2%
BP	0.15%

MP, methyl paraben; EP, ethyl paraben; PP, propyl paraben; BP, butyl paraben.

**Table 2.** Parabens assessed in the receptor fluid at three different WT, in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $M \pm \text{SD}$ , after one application of body lotion at T 0 h

Paraben	Log <sub>10</sub> PC (lipophilicity)	WT 12 h (M $\pm$ SD)	WT 24 h (M $\pm$ SD)	WT 36 h (M $\pm$ SD)	Percentage of total permeated parabens after 36 h (M $\pm$ SD)
MP	1.96	0.42 $\pm$ 0.1	1.91 $\pm$ 1.1	0.22 $\pm$ 0.1	0.057% $\pm$ 0.03
EP	2.41	0.33 $\pm$ 0.1	1.00 $\pm$ 0.4	0.24 $\pm$ 0.1	0.045% $\pm$ 0.01
PP	3.04	0.47 $\pm$ 0.1	1.41 $\pm$ 0.7	0.67 $\pm$ 0.3	0.028% $\pm$ 0.01
BP	3.57	0.03 $\pm$ 0.004	0.24 $\pm$ 0.1	0.21 $\pm$ 0.1	0.007% $\pm$ 0.003

MP, methyl paraben; EP, ethyl paraben; PP, propyl paraben; BP, butyl paraben; PC, partition coefficient; WT, withdrawn time. M, mean.



**Figure 2.** Parabens in a receptor fluid, using the same skin sample, at different withdrawn time (WT) after the lotion application at T 0 h, T 12 h and T 24 h. Chromatogram of the receptor fluid at (a) WT 12 h, (b) WT 24 h and at (c) WT 36 h.

### The second experimental group

The G2 result showed an increasing of the epidermis–dermis crossing quantity of each paraben after the three deposits (Fig. 2). The permeated quantities of parabens, in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , are indicated in Table 3. It could be noticed that, as we have seen in G1, the accumulation quantities of parabens, liberated from the skin in the receptor fluid, were more important for MP and EP than for PP and BP (Table 3).

**Table 3.** Parabens assessed in the receptor fluid at three different WT, in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ :  $M \pm \text{SD}$ , after three applications of body lotion at T 0 h, T 12 h, T 36 h

Paraben	Log <sub>10</sub> PC (lipophilicity)	WT 12 h (M $\pm$ SD)	WT 24 h (M $\pm$ SD)	WT 36 h (M $\pm$ SD)	Percentage of total permeated parabens after 36 h (M $\pm$ SD)
MP	1.96	0.6 $\pm$ 0.17	3.4 $\pm$ 0.7	5.6 $\pm$ 0.63	0.6% $\pm$ 0.1
EP	2.41	0.3 $\pm$ 0.07	1.3 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.96	0.3% $\pm$ 0.1
PP	3.04	0.5 $\pm$ 0.24	2.0 $\pm$ 0.49	3.2 $\pm$ 0.77	0.2% $\pm$ 0.05
BP	3.57	0.03 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.09	0.6 $\pm$ 0.17	0.04% $\pm$ 0.01

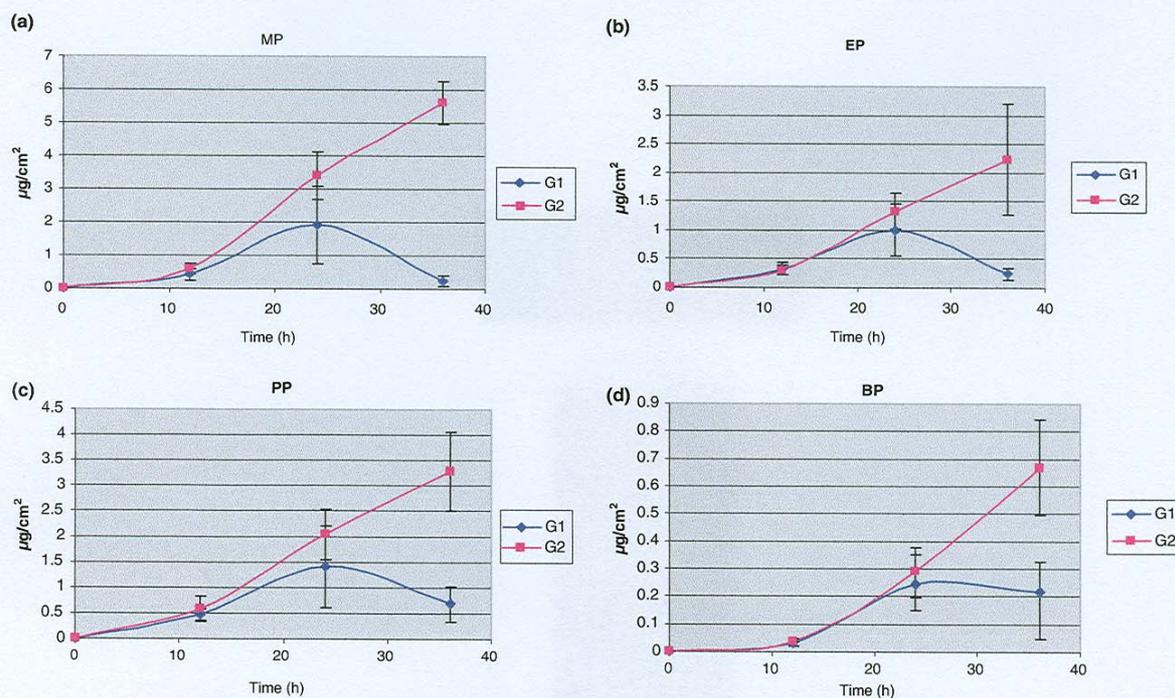
MP, methyl paraben; EP, ethyl paraben; PP, propyl paraben; BP, butyl paraben; PC, partition coefficient; WT, withdrawn time. M, mean.

It is noticeable that PP permeated quantities were higher than that of EP in the two experimental groups. The explanation of this result is that the basic concentration of PP in the commercial lotion was higher than that of EP (Table 1).

### Discussion

Parabens percutaneous passage was investigated by different authors (29–31). In these researches, skin fragments of different origins were used for performing the cutaneous passage: rat skin, pig skin and human skin. Different receptor fluids such as saline phosphate buffer, ethanol/water solution and serum albumin solution were employed. The solvents vehicles of parabens were also various: acetone, ethanol, deionised water, etc.

Our studies, in this work, were performed in a manner that it would be nearly as in normal human conditions of cosmetic usage; parabens passage was assessed through human epidermis–dermis layers by employing BSA as receptor fluid. The galenic form tested was a commercial cosmetic lotion containing the most used parabens in skin-care formulations. The objective of our experiments was to evaluate the effect of susceptible cosmetic molecules accumulation, in the receptor fluid, after multiple applications and during a limited period of time. We compared the



**Figure 3.** A comparison of each paraben quantities in the receptor fluid (in  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) after one deposit at T0 h (G1) and three deposits at T 0 h, T 12 h and T 36 h (G2). It is noticeable that their passage in the receptor fluid decreased when the paraben lipophilicity increased. Moreover, the permeation of the four parabens increased after each deposit (T 12 h and T 24 h in G2). In G1, for the four parabens, the maximum accumulation in the receptor fluid was after 24 h. In G2, the maximum accumulation in the receptor fluid was in inverse correlation to parabens lipophilicity.

parabens passage through human skin after one and three applications (G1, G2). Permeated quantities of parabens in each experimental group are shown in Fig. 3.

Concerning G1 experimental group, it is noticeable that the maximum parabens quantities crossing the skin were at T 24 h and then their liberation in the receptor fluid decreased. Among all parabens, the most lipophilic molecule was the less liberated (BP) (Fig. 3).

Considering G2 experimental group, the liberation of all molecules was also in a relation with their lipophilicity as in G1. The less liberated molecule, in the receptor fluid, was also the more lipophilic (BP). These results are in agreement with the literature (32–34). The high standard deviation (SD), as given in Tables 2 and 3, was generated by the variability of different skin donors, although we tried to study a limited group of age (35–45 years) of the same tissues origin (abdominal region). Moreover, G2 results showed a significant increase in permeated parabens after each application (T 24 h, T 36 h) (Fig. 3). Concerning the most lipophilic paraben (BP), its passage through the skin was weak, compared with other parabens. BP has the potential of bio-accumulation in the skin, especially after a number of applications (14). The total parabens-liberated

quantities in the receptor fluid were higher than that liberated during G1 experiments (Fig. 3). This could be explained by the saturation of the stratum corneum reservoir, followed by a release of these molecules to the receptor fluid in increasing quantities. These conditions can be generated, *in vivo*, by two situations: the usage of different cosmetics containing parabens during a day or, by applying one of these products a number of times daily. It is interesting to calculate in a period of 1 week or 1 month the quantities that would cross the epidermis–dermis layers and could be transported by the blood albumin to the body tissues.

Cosmetic products containing parabens are in contact with human skin, hair, scalp, lips, mucosa, axillae and nails. Different kinds of cosmetic products are applied on the skin surface, without limiting the quantity and the application surface area. At a long-term, parabens could be retained in human body tissues without hydrolysis and their potential harm to consumers could increase when used frequently (14,15).

Although liver esterases act on the metabolism of parabens following oral exposure with first-pass hepatic activity (5,35,36), the situation with respect to topical application

may not be the same (18,37,38). Skin contains enzymes which are able to catalyse the metabolism of both endogenous chemicals and foreign compounds (xenobiotics), including drugs and environmental chemicals. The function of skin xenobiotic metabolism is to convert lipophilic molecules into water soluble compounds, which are readily excreted into the bile and urine and so eliminated from the body (1). Carboxylesterases in skin and subcutaneous fatty tissues result in varying the hydrolysis of parabens into *p*-hydroxybenzoic acid (PHBA), which may influence their absorption (18). Parabens in cosmetic formulations can be absorbed rapidly through intact skin. This passage is influenced by the presence of penetration enhancers found in cosmetic preparations (23,29). Skin metabolism does not always result in detoxification and may activate some compounds, leading to enhance local and/or systemic toxicity (1).

In 1956, Mathews et al. (39) presented a study on the acute and chronic toxicity of PHBA and of the MP, EP, PP and BP in mice, rats and dogs. Routledge et al., in 1998 (13) were the first who reported the oestrogenic-like activity of parabens. It had been confirmed that these molecules could bind with oestrogen receptors of rodent uterus and human breast cancers cells (MCF-7 cells). Parabens regulate oestrogen-responsive reporter genes expression in human breast cancer. In their annual report of 2000–2001, the royal Danish school of pharmacy studied the oestrogenic potency of parabens in *in vitro* assays. The results of the Danish work indicated that the proliferation of MCF7 cells was increased with the dose of parabens (40). Considering the four parabens molecules MP, EP, PP, BP, butyl ester showed the strongest activity (13,41). Parabens with shorter or unbranched side chains have less oestrogenic-like activity than those with longer or branched side chains (10–12,18,42–44). In 2003, Darbre et al. (43) claimed that, at least, a portion of the parabens present in cosmetics, food and pharmaceutical products could be absorbed and retained in human body tissues without hydrolysis by esterase to PHBA. So, if any of these chemicals does enter the body intact, it may be able to accumulate in fatty components of body tissues in a similar manner to that of other lipophilic pollutants (14). As parabens are used in a wide range of cosmetics applied to the underarm and breast area, it had been suggested that regular application of such oestrogen-like chemicals could influence breast cancer development (14). Furthermore, the efficiency of sperm production was decreased with increasing doses of BP given to rats in the feed. BP decreases testosterone secretion (10). From the literature, it is possible to establish relationships among lipophilicity, penetration, metabolism and parabens toxicity.

Ishiwatari et al. (45) demonstrated that, after 1 month of daily applications of MP containing formulations, MP

remained unmetabolized and persisted slightly in the stratum corneum. MP decreased the proliferating ability of keratinocytes and changed the cell morphology. These results suggest that MP exposure through application of dermatological formulations results in MP persistence and accumulation in the SC, and that MP might influence the ageing and differentiation of keratinocytes. However, a study done by Prusakiewicz et al. (46) in 2007 showed that chronic topical application of parabens may lead to prolonged oestrogenic effects in skin as a result of inhibition of oestrogen sulfotransferase activity. Accordingly, the skin anti-ageing benefits of many topical cosmetics and pharmaceuticals could be derived, in part, from the oestrogenicity of parabens in the formulations.

In our study, we mimicked the normal usage of the cosmetics containing parabens as they are used on a daily basis and by most of the populations of different ages. Normally, a person employs various types of cosmetics during a day. These products such as toothpaste, shampoo, shower gel, body cream, anti-perspirant, etc are applied on the face and some parts of the body or on the whole body. Approximately 90%, at least, of these products contain one or more parabens (16). It is clear that some of these chemicals could accumulate in the skin, transported by the blood and enter the body tissues. Consequently, there is an absolute necessity to regulate repeated applied doses, and not only single deposit, of some hazardous cosmetic substances that are suspected (i.e., parabens) particularly, in a long-term usage. Perhaps, the solution for this problem would be to establish rules, which oblige the assessment of these chemicals (principal substances or additives) after their passage across the epidermis–dermis layers, in respect to the number of applications in a long period of time. It is suitable after using a cosmetic during a period of time, to replace this preparation with another one, assuring the same effect. This gives the possibility to eliminate the first one, if accumulated, and to direct the second one on another receptor. Perhaps, with this manner, we could avoid susceptible products accumulation and reduce their side effects and especially chronic toxicity.

## References

- 1 Sartorelli P, Aandersen HR, Angerer J *et al*. Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Env Toxicol Pharmacol* 2000; **8**: 133–152.
- 2 Di Giovanni C, Arcoraci V, Gambardella L, Sautebin L. Cosmetovigilance survey: are cosmetics considered safe by consumers? *Pharm Reas* 2006; **53**: 16–21.
- 3 Williams F. *In vitro* studies-how good are they at replacing *in vivo* studies for measurement of skin absorption? *Env Toxicol Pharm* 2006; **21**: 199–203.
- 4 Gruvberger B, Bruze M, Tammela M. Preservatives in moisturizers on the Swedish market. *Acta Derm Venereol* 1998; **78**: 52–56.

- 5 Soni MG., Carabin IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol* 2005; **43**: 985–1015.
- 6 Handa O, Kokura S, Aadachi S et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology* 2006; **227**: 62–72.
- 7 Angelini G, Vena GA, Foti C, Grandolfo M. Contact allergy to preservatives and perfumed compounds used in skin care products. *J App Cosmetol* 1997; **15**: 49–57.
- 8 Simpson JR. Dermatitis due to parabens in cosmetic creams. *Contact Dermatitis* 1998; **4**: 311–312.
- 9 Mowad CM. Allergic contact dermatitis caused by parabens: 2 case reports and a review. *Am J Contac Derm* 2000; **11**: 53–56.
- 10 Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health* 2001; **17**: 31–39.
- 11 Oishi S. Effects of propyl paraben on the male reproductive system. *Food Chem Toxicol* 2002; **40**: 1807–1813.
- 12 Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice. *Arch Toxicol* 2002; **76**: 423–429.
- 13 Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashby J, Sumpter JP. Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol Appl Pharm* 1998; **153**: 12–19.
- 14 Darbre P. Underarm cosmetics are a cause of breast cancer. *Europ J Cancer Prev* 2004; **13**: 153.
- 15 Darbre P, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumors. *J Appl Toxicol* 2004; **24**: 5–13.
- 16 Elder RL. Final report on the safety assessment of methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben and butyl paraben. *J Am Coll Toxicol* 1984; **3**: 147–209.
- 17 Rastogi SC, Schouten A, De Kruijf N, Weijland W. Contents of methyl, ethyl-, propyl-, butyl-and benzyl paraben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* 1995; **32**: 28–30.
- 18 Golden R, Gandy J, Vollmer G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Clin Rev Toxicol* 2005; **35**: 435–458.
- 19 Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F et al. Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. *Food Chem Toxicol* 1999; **37**: 191–205.
- 20 Franz TJ. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Inv Dermatol* 1975; **64**: 190–195.
- 21 Leveque N, Makki S, Hadgraft J, Humbert P. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *Int J Pharm* 2004; **269**: 323–328.
- 22 Makki S, Muret P, Said AM et al. Percutaneous absorption of three psoralens commonly used in therapy: effect of skin occlusion (in vitro study). *Int J Pharm* 1996; **133**: 245–252.
- 23 Dal Pozzo A, Pastori N. Percutaneous absorption of parabens from cosmetic formulations. *Int J Cosm Sc* 1996; **18**: 57–66.
- 24 Thomassin M, Cavalli E, Guillaume Y, Guinard C. Comparison of quantitative high performance thin layer chromatography and the high performance liquid chromatography of parabens. *J Pharm Biol Anal* 1997; **15**: 831–838.
- 25 Labat L, Kummer E, Dallet P, Dubost JP. Comparison of high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product. *J Pharm Biol Anal* 2000; **23**: 763–769.
- 26 Saad B, Fazlul Bari MD, Saleh MI, Aahmad K, Talib MKM. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben and propyl paraben) in foodstuffs using high performance liquid chromatography. *J Chromato A* 2005; **1073**: 393–397.
- 27 Dal Pozzo A, Liggeri E, Delucca C, Calabrese G. Prediction of skin permeation of highly lipophilic compounds: in vitro model with a modified receptor phase. *Int J Pharm* 1991; **70**: 219–223.
- 28 Jiang R, Hayden CGJ, Pranker RJ, Roberts MS, Benson HAE. High-performance liquid chromatographic assay for common sun screening agents in cosmetic products, bovine serum albumin solution and human plasma. *J Chromato B* 1996; **682**: 137–145.
- 29 Kitagawa S, Li H, Shinji S. Skin permeation of parabens in excised guinea pig dorsal skin, its modification by penetration enhancers and their relationship with n-octanol/water partition coefficients. *Chem Pharm Bult* 1997; **45**: 1354–1357.
- 30 Cross E, Roberts M. The effect of occlusion on epidermal penetration of parabens from a commercial allergy test ointment, acetone and ethanol vehicles. *J Inv Derm* 2000; **115**: 914–918.
- 31 Akomeah F, Nazir T, Martin GP, Brown MB. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *E J Pharm Sci* 2004; **21**: 337–345.
- 32 Jakasa I, Verberk MM, Bunge AL, Kruse J, Kezic S. Increased permeability for polyethylene glycols through skin compromised by sodium lauryl sulphate. *Ex Dermatol* 2006; **15**: 801–807.
- 33 Said A, Makki S, Muret P, Humbert P, Millet J. Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). *J Dermatol Sci* 1997; **14**: 136–144.
- 34 Makki S. Les psoralènes: la polarité moléculaire et ses implications en chimie analytique et en sciences médicales. Thesis of Franche Comté University, Physical-Chemical Specialization. 2000: Order No 816.
- 35 Soni MG, Burdock GA, Taylor SL, Greenburg NA. Safety assessment of propyl paraben. *Food Chem Toxicol* 2001; **39**: 513–532.
- 36 Soni MG, Taylor SL, Greenburg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben. *Food Chem Toxicol* 2002; **40**: 1335–1373.
- 37 Bando H, Morhi S, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *J Pharm Sci* 1997; **86**: 759–761.
- 38 Harvey PW. Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: a perspective on a hypothesis. *J App Toxicol* 2003; **23**: 89–95.
- 39 Mathews C, Davidson J, Bauer E, Morrison JL, Richardson AP. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (baltim)* 1956; **45**: 260–267.
- 40 Andersen HR, Morten M, Pedersen MM et al. Parabens, a group of compounds possessing estrogenic potency in in-vitro assays—what is the toxicological and ecotoxicological significance of these findings? In Royal Danish School of Pharmacy Annual Report, 2000–2001.
- 41 Pedersen KL, Pedersen SN, Christiansen LB, Korsgaard B, Bjereggaard DP. The preservatives ethyl-, propyl- and butyl paraben are oestrogenic in an in vivo fish assay. *Pharm Toxicol* 2000; **86**: 110–113.
- 42 Darbre P, Byford JR, Shaw LE, Horton RA, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *J Appl Toxicol* 2002; **22**: 219–226.
- 43 Darbre P, Byford JR, Shaw LE et al. Oestrogenic activity of benzylparaben. *J Appl Toxicol* 2003; **23**: 43–51.
- 44 Oishi S. Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats. *Food Chem Toxicol* 2004; **42**: 1845–1849.
- 45 Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshino T, Matsukuma S, Tsuji T. Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J Appl Toxicol* 2007; **27**: 1–9.
- 46 Prusakiewicz JJ, Harville HM, Zhang Y, Ackermann C, Voorman RL. Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: possible link to paraben estrogenic effects. *Toxicology* 2007; **3**: 248–256.

## **Annexe 6.2.: Do some chemicals in cosmetics generate toxicity!?**

(Submitted to Journal of Skin Pharmacology and Physiology)

Sawsan El Hussein <sup>(1)</sup>, Safwat Makki <sup>(1)(2)</sup>, Philippe Humbert <sup>(1)</sup>

(1) Cutaneous Engineering and Biology Laboratory (EA 3183). Franche-Comte University, Place Saint Jacques 25030, Besançon, France.

(2) Laboratory of Galenic Pharmacy, Faculty of Medicine and Pharmacy, Franche-Comte University, Place Saint Jacques 25030, Besançon, France.

Corresponding author:

Dr. Safwat MAKKI

Tel.: +33 381665291; Fax: +33 381665290

*E- mail address:* [Safwat.makki@univ-fcomte.fr](mailto:Safwat.makki@univ-fcomte.fr)

Keywords:

Cosmetics, Cosmetics safety, Cosmetics adverse effects, Cosmetic toxicity.

Abbreviation

Cosmetic Ingredient Review (CIR), European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA), Directive (D), European Union (EU), Food and Drug Administration (FDA), Food, drug and Cosmetic Act (FD&C Act), Scientific Committee on Consumer Products (SCCP).

## **Abstract:**

A cosmetic product is a formulation of different chemical substances that is meant to be applied on the face or the body. Most people today, primarily women, are active consumers of cosmetics and commonly use them on a daily basis - sometimes for a long period of time. Cosmetics are generally considered as safe: they are subject to regulatory controls worldwide to ensure that they are safe for use and will produce no adverse effect on users. Nevertheless, some severe and serious adverse reactions have been reported in the literature.

In this commentary, the authors establish a link between the actual daily use and safety of cosmetic products. This article briefly reviews the relation between cosmetic absorption and toxicity.

Despite stringent regulations, we are seeing more and more studies on the side effects of cosmetics. Results from published studies relate certain cosmetic substances to allergy, toxicity and even carcinogenicity. Official cosmetic committees have refuted some of these accusations in studies published in scientific journals.

In order to minimize potential side effects, suggestions are given to dispel the notion of risk and reassure the user for the safe use of cosmetic products.

## **Introduction**

Today people, from different ages, especially women, are active consumers of face and body care products. Cleaning, moisturizing, nourishing and regenerating the skin are considered to be essential. Cosmetics make us look better and give us confidence in ourselves.

Chemical substances are used in different types of cosmetic products applied on the skin, hair, nails etc. The capacity of a molecule to penetrate the skin depends principally on its ability to permeate the hydrophobic/ hydrophilic barrier structure of the stratum corneum. This potential penetration and retention may be influenced by different factors such as the physical-chemical properties of the active substance (1- 3), the occlusion effect (4), the cosmetic formulation type and

the penetration enhancers used (5-8). Even when applied on the skin in small doses, frequent and long-term use of cosmetics may provoke partial retention of some molecules in human body tissues without hydrolysis, as with parabens (9-12).

Although liver esterase acts on the metabolism of substances following oral administration with first-pass hepatic activity, the situation with respect to topical product application is not the same. Activity levels of metabolizing enzymes in the skin are low compared to the liver (13). Skin metabolism does not always result in detoxification and may activate some compounds, leading to enhance local and/or systemic toxicity (14-17). Cutaneous metabolism will determine the degree to which the skin and the systemic circulation are exposed to the compound and/or its metabolites (17).

### **Cosmetic security according to international regulations**

According to international regulations, cosmetic products are meant to act essentially in the epidermis tissues and not to be absorbed through the dermis. Regulations allow small doses of cosmetic substances to be absorbed through the skin, hair follicles, sebaceous and sweat glands. Consequently, the basic action of cosmetics is superficial: changing the appearance without affecting the body's structure or function (D 76/768/EEC Art I according to EU cosmetic legislation (18); FD&C Act, Sec.201 {i} according to USA cosmetic legislation (19)).

Cosmetics must be safe when applied under normal or reasonably foreseeable conditions of use (D 76/768/EEC Art II in the EU (18)). For the majority of cosmetic substances, no approval is required for the use of any new ingredient in a cosmetic formulation: In the USA and EU, the manufacturer and the distributor take responsibility for the safety of the final product. For a large range of cosmetic substances, there are no requirements for pre-market submission of safety data or pre-market product approval. However, the FDA and local authorities in the EU can inspect cosmetic manufacturing plants or offices at any time. The FDA collects samples for examination

and analysis and may also conduct research on cosmetic products and ingredients to address safety concerns (20, 21).

### **Cosmetic toxicity**

The number of known adverse reactions to cosmetics is very low, probably because they are impossible to diagnose, due to the absence of medical consultation and the widespread practice of self-medication (22). Fortunately, the adverse reactions that most often affect the skin are allergic reactions and contact dermatitis (23- 30). Nevertheless, some toxicities and even cancer has been related to the use of some cosmetics substances in the literature. A number of some risky substances used in cosmetic formulations are presented in Table 1.

Conversely, some research papers refuted the toxicity of certain suspected molecules, among which parabens (31, 32), diethyl phthalate (33) and polyethylene glycols (34). The American Cosmetic Ingredient Review (CIR) expert panel has published a number of studies concerning the safety assessment of different cosmetic substances. These studies are available on their web site: *www.cir-safety.org*.

The European “Scientific Committee on Cosmetic Product” (SCCP) has also published their opinion on suspected cosmetic ingredients via their web site:

*[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/sccp\\_opinions\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/sccp_opinions_en.htm)*.

### **Conclusion**

People, regularly in contact with cosmetics, apply a number of products, several times a day and over a long period: Shampoo, shower gel, face cream, body lotion, anti-perspirant and many others. One chemical in one cosmetic product is unlikely to be harmful. Unfortunately, repeated exposure to cosmetic chemicals does exist - and from a number of different sources. Consequently, it seems necessary that each molecule in the dermal tissues should be tested to ascertain the effect of repeated applications of a finished cosmetic product over a long period of time. Essential information including both the amount of cosmetic product applied and the frequency of its use

should be indicated. Molecule assessment in the dermis must take into consideration the normal, long-term use of cosmetics and the frequency of their application on the skin. To avoid high concentrations of a molecule in a finished product, either in the blood or in body tissues, it is important to evaluate the dermal diffusion of the molecule. Ex vivo and in vivo skin absorption tests for the finished product are helpful to evaluate skin penetration of cosmetic ingredients and should reflect, as nearly as possible, normal conditions of use (35, 36). In vivo assessment of cosmetic ingredients in blood and urine during and after a period of cosmetic product use will also attest the accumulation and /or elimination of the product.

The cosmetic industry should be encouraged to publish more of its toxicity studies and safety evaluations. This would help to dispel the uncertainty that some consumers have about cosmetic safety. Therefore, specific international cosmetic commissions and associations (i.e. CIR, COLIPA, SCCP...) need to verify research results that accuse certain molecules used in cosmetic. It is time for legislators to take a closer look at scientific researches in the field of cosmetics. With the public interest in mind, researchers and legislators should cooperate to use these researches to ensure consumer safety and indicate what the risks are and are not. To be of full benefit to the public, the results of these joint investigations should be published not only in scientific journals, but in the popular press as well.

**Table 1: Illustrative list of some risky molecules used in cosmetic formulations during the last decade**

Authors	Studies	Type
Niculescu et al. 2007 (37)	Diethanolamine alters proliferation of mouse neural precursor cells	In vitro
Handa et al. 2006 (38)	Methyl paraben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes	In vitro
Kunz and Fent 2006 (39)	Estrogenic activity of UV filter mixtures	In vitro
Murata et al. 2006 (40)	Oxidative DNA damage induced by hair dye	In vitro
Patel et al. 2006 (41)	The effect of chlorhexidine in mouthwash product on human osteoblast cells	In vitro
Darbre 2005 (42)	Aluminium, anti – perspirant and breast cancer	Ex vivo
Darbre et al. 2004 (10)	parabens in human breast cancer	In vivo
Sosted et al. 2004 (30)	Hair dye allergy	In vivo
Cho et al. 2003 (43)	hair dyeing and DNA damage in human lymphocytes	In vivo
Darbre et al. 2002 (44)	Oestrogenic activity of isobutylparaben	Ex and In vivo
Gago-Dominiguez et al. 2001 (45)	Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk	In vivo
Oishi 2001 (46)	Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats	In vivo
Marty et al. 1999 (47)	Toxicity of Diethanolamine in CD Rats and new Zealand white rabbits	In vivo
Angelini et al. 1997 (23)	Contact allergy to preservatives and perfumed compounds	In vivo
Nagata et al. 1997 (48)	Interstitial pneumonitis and fibrosis and hair spray.	In vivo
Pashe-koo et al. 1996 (29)	Contact urticaria caused by bovine collagen in a hair conditioner	In vivo

## **References**

- 1- Schafer H, Riedlmayer TE. Skin barrier: Principles of percutaneous absorption. In : Karger, Basel (Switzerland)1996, pp 118-128.
- 2- Said A, Makki S, Muret P, Humbert P, Millet J. Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). *J Dermatol Sci* 1997; 14: 136-144.
- 3- Lee CK, Uchida T, Kitagawa K, Yagi A, Kim N S, Goto S. Skin permeability of various drugs with different lipophilicity. *J Pharm Sci* 1994; 83: 562-565.
- 4- Makki S, Muret P, Said AM, Bassignot P, Humbert P, Agache P, Millet J. Percutaneous absorption of three psoralens commonly used in therapy: Effects of skin occlusion (In vitro study). *Int J Pharm* 1996; 133: 245-252.
- 5- Williams AC, Barry B. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 53: 603-618.
- 6- Borrás-blasco J, Lopez A, Morant M.J, Diez-sales O, Herraéz-domínguez M. 1997. Influence of sodium lauryl sulphate on the in vitro percutaneous absorption of compounds with different lipophilicity. *Europ J Pharm Sci* 1997 5: 15-22.
- 7- Dal Pozzo A, Pastori N. Percutaneous absorption of parabens from cosmetic formulations. *Int J Cosm Sci* 1996; 18: 57-66.
- 8- Kitagawa S, Li H, Shinji S. Skin permeation of parabens in excised guinea pig dorsal skin, its modification by penetration enhancers and their relationship with n-Octanol / water partition coefficients. *Chem Pharm Bult* 1997; 45: 1354-1357.
- 9- Darbre PD. Underarm cosmetics are a cause of breast cancer. *Europ J Cancer Prev* 2004; 13: 153.
- 10- Darbre PD, Aljarrah, A, Miller WR, Coldman NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of parabens in human breast tumors. *J Appl Toxicol* 2004; 24: 5-13.

- 11- Darbre PD Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006; 20: 121-143.
- 12- S. El Hussein, P. Muret, M Berard, S. Makki, P. Humbert. Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through epidermis-dermis layers (Ex-vivo study). *Exp Dermatol* 2007; 16: 830-836.
- 13- Williams FM Significance of metabolism occurring locally in the skin, for dermally absorbed chemicals. *Toxi Lett* 2006; 164 S1: S322-S323.
- 14- Bando H, Morhi S, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *J Pharm Sci* 1997; 86: 759-761.
- 15- Golden, R, Gandy YJ, Vollmer G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Clin Rev Toxicol* 2005; 35: 435-458.
- 16- Harvey P W Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer: a perspective on a hypothesis. *J Appl Toxicol* 2003; 23: 89-95.
- 17- Sartorelli P, Andersen HR, Angererm J, Corishi J, and al. Percutaneous penetration studies for risk assessment. *Env Toxicol Pharmacol* 2000; 8: 133-152.
- 18- 76/768/EEC—Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products. *Official J. L262*, 27 September 1976, pp. 169–200.
- 19- FD&C Act (Federal Food, Drug and Cosmetic Act), chapter II, definitions, sec.201 (i). Possible also on the link: <http://www.fda.gov/opacom/laws/fdcaact/fdcaact1.htm>.
- 20- RPA (Risk and Policy Analysts). Comparative study on cosmetics legislation in the EU and other principal markets with special attention to so-called borderline products, Final report, August 2004.

- 21- FDA (Food and Drug Administration).CFSAN Office of cosmetics and colors. FDA authority over cosmetics. What does the law say about cosmetic safety and labelling? March 3, 2005. Information available at <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-206.html>
- 22- Di Giovanni C, Arcoraci V, Gambardella L, Sautebin L. Cosmetovigilance survey: Are cosmetics considered safe by consumers? *Pharm Reas* 2006; 53: 16-21.
- 23- Angelini G, Vena GA, Foti C, Grandolfo M. Contact allergy to preservatives and perfumed compounds used in skin care products. *J. App.Cosmetol* 1997; 15: 49-57.
- 24- Berne B, Bostrom A, Grahnm AF, Tammela M. Adverse effects of cosmetics and toiletries reported to the Swedish medical products agency 1989- 1994. *Contact dermatitis* 1996; 34: 359- 362.
- 25- Bondeel A. Intolerance reactions to cosmetics. *J Pharm Belg* 1993; 48: 308-312.
- 26- Kiec-Swierzynska M, Krecisz B, Swierzynska machura D. Allergy to cosmetics I. Fragrances. *Med Pr* 2004; 55: 203-206.
- 27- Kiec-Swierzynska M, Krecisz B, Swierzynska-machura D. Allergy to cosmetics II. Preservatives. *Med Pr* 2004; 55: 289- 292.
- 28- Lindberg M, Tammela M, Bostrom A, Fischer T, Inerot A, Sundberg K. Are adverse skin reactions to cosmetics underestimated in the clinical assessment of contact dermatitis? A prospective study among 1075 patients attending Swedish patch test clinics. *Acta Derm Venereol* 2004; 84: 291-295.
- 29- Pasche-koo,F, Claeys M, Hauser C. Contact urticaria with systemic symptoms caused by bovine collagen in a hair conditioner. *Am. J. Contact Dermatitis* 1996; 7: 56-57.
- 30- Sosted H, Rastogi SC, Aandersen KE, Johansen JD, Menne E T. Hair dye contact allergy: quantitative exposure assessment of selected products and clinical cases. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 344-348.

- 31- SCCP (Scientific Committee on Consumer Product), 2006. SCCO/ 1017/06. Opinion on parabens. COLIPA N° P82.
- 32- Soni MG, Carabier IG, Burdock GA. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 985- 1015.
- 33- Api A M. Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 97-108.
- 34- Fruijtjer-Polloth C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology* 2005; 214: 1-38.
- 35- Jiang R, Roberts MS, Collins DM, Bnson HAE. Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. *Clin Pharmacol* 1999; 48: 635-637.
- 36- Leveque N, Makki S, Hadgraft J, Humbert P. Comparison of Franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin. *Int J Pharm* 2004; 269: 323-328.
- 37- Niculescu MD, Wu R, Guo Z, Da costa, K, Zeisel SH. Diethanolamine alters proliferation and choline metabolism in mouse neural precursor cells. *Toxicol Sci* 2007; 96:321-326.
- 38- Handa,O, Kokura S, Adachi S, Takagi T, Naito Y, Tanigawa T, Yoshida N, Yoshikawa T. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. *Toxicology* 2006; 227: 62-72.
- 39- Kunz PY, Fent K. Estrogenic activity of UV filters mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 217: 86-99.
- 40- Murata M, Nishimura T, Chen F, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by hair dye components ortho-phenylenediamines and the enhancement by superoxide dismutase. *Mutat Res* 2006; 607: 184-191.

- 41- Patel P, Ide M, Coward DP, Di silvio L. The effect of a commercially available chlohexidine mouthwash product on human osteoblast cells. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2006; 14: 67-72.
- 42- Darbre PD. Aluminium, anti perispirants and breast cancer. *J Inorg Biochem* 2005; 99: 1912-1919.
- 43- Cho J, Oh E, Lee E, Sul D. Effects of hair dyeing on DNA damage in human lymphocytes. *J. Occup.Health* 2003; 45: 376- 381.
- 44- Darbre PD, Byford ,JR, Shaw LE , Hoeton RA, Pope GS, Sauer MJ. Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *J Appl Toxicol* 2002; 22: 219-226.
- 45- Gago-dominguez M, Castelao JE, Yuan JM, Yu MC, Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk. *Int J Cancer* 2001; 91: 575-579.
- 46- Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in rats. *Toxicol Ind Health* 2001; 17: 31-39.
- 47- Marty MS, Neeper-bradley TL, Neptun DA, Carney EW. Development toxicity of DEA applied cutaneously to CD Rats and new Zealand white rabbits. *Regul Toxcol Pharmacol* 1999; 30: 169-181.
- 48- Nagata N, Kawajiri T, Hayashi T, Nakanishi K, Nikaido Y, Kido M. Interstitial pneumonitis and fibrosis associated with the inhalation of hair spray. *Respiration* 1997 ; 64: 310-312.

## **Annexe 6.3.: Is it a Cosmetic or a Cosmeceutical?**

(Submitted to Journal of Dermatological Science)

Sawsan El Hussein<sup>(1)</sup>, Safwat Makki<sup>(1)(2)</sup>, Philippe Humbert<sup>(1)</sup>

(1) Cutaneous Engineering and Biology Laboratory (EA 3183), Franche-Comte University, Place Saint Jacques, 25030 Besançon cedex, France.

(2) Laboratory of Galenic Pharmacy, Faculty of Medicine and Pharmacy, Franche-Comte University, Place Saint Jacques, 25030 Besançon cedex, France.

Correspondence: Dr. S. Makki

e-mail : [safwat.makki@univ-fcomte.fr](mailto:safwat.makki@univ-fcomte.fr)

### **Keywords**

Borderline product, Cosmeceutical, Cosmetic, Cosmetic Legislations.

## 1. Introduction

Few years ago, a new breed of skin care products have emerge under the name of “Cosmeceutical”. The term was first used in 1946 by someone from the FDA but lay dormant until about 1981 when Albert M Kligman, popularized this word. He used it to describe a range of products between cosmetics (such as lipsticks and eye shadows) and “pure” drugs (such as antibiotics and corticosteroids) [1, 2]. This type of product is characterized by cosmetic aspect and has pharmaceutical or drug-like effect. These products would have properties of both cosmetics (promoting attractiveness) and drugs (affecting the structure and function of the skin) [1,2,3].

Cosmeceutically active ingredients are constantly being developed by big and small corporations engaged in pharmaceuticals, biotechnology, natural products and cosmetics. Advances in the field and knowledge of skin biology and pharmacology have facilitated the cosmetic industry’s development of novel active compounds rapidly [3] Although there is no legal class called cosmeceutical, this term has found application and recognition to designate products which are at the borderline between cosmetics and medicinal products [4, 5].

## 2. International frameworks definitions of “cosmetic products”

To determine whether a product is a cosmetic or a drug, the pharmaceutical activity of the product must be considered, independent of the condition it is intended to modify (normal versus diseased skin). Moreover, manufacturer’s claims may also influence product classification [6].

According to the Federal Food Drug and Cosmetic Act (FD&C Act), a cosmetic is defined as “an article intended to be applied to the human body...for cleansing, beautifying, promoting attractiveness, or altering the appearance without affecting the body’s structure and function” [7] The definition as used by the European Directive in the European Union (EU) is similar, but the phrase ‘without affecting the body’s structure and function’ is not included [8]. Japanese regulations (The Pharmaceutical Affair Law [PAL]) have also a similar cosmetic definition to that of USA, but they added: “Cosmetics should be with mild action on human body” [9]. Than, three elements constitute the legal definition of cosmetics: *external application*, *defined effects* and *no alteration of the structure or function of the skin* [10].

### **3. International frameworks definitions of “borderline products”**

#### **3.1. The EU definition**

It is known that European directive does not consider officially Cosmetic-Drug borderline product as an intermediate section between cosmetic and drug. A product must be regulated either drug or cosmetic [8] Nevertheless, there are some official EU Commission guidance documents on borderline products, i.e.:

- The Risk Policy Analyst (RPA) report in 2004, prepared for the European Commission Directorate-General (DG) Enterprise [11].

- Doc-Biocides-2002/3 in 2004, which is a guidance document, agreed between the Commission Services and the competent authorities of Member States, for the biocidal products directive 98/8/EEC and for the cosmetic products Directive 76/768/EEC [12].

For deciding whether a product is considered a cosmetic or a drug, account is taken for the product’s claims, its composition and the purpose for which it is likely to be used by the consumer.

#### **3.2. The USA definition**

According to the Food and Drug Administration (FDA), the legal difference between cosmetic and drug is determined by the product's intended use. Products that are cosmetics but are also intended to treat or prevent diseases, or otherwise affect the structure or functions of the human body, are considered also drugs and must comply with both the drug and cosmetic provisions of the law. Examples of products that are drugs, as well as cosmetics: anti-caries toothpaste (Fluoride toothpaste), sun-tanning preparations intended to protect against sunburn, antiperspirants that are also deodorants, and antidandruff shampoos [13]

#### **3.3. The Japanese definition**

Borderline products are considered in Japan as ‘Quasi drugs’. They occupy a position midway between that of drugs and cosmetics. Preparations are defined as quasi drugs after assessment of their ingredients and their quantities, efficacy, method of use, dosage and product form. The effects, which they claim to have, are within the scope permitted in the PAL. In article 2 of Japan’s PAL, quasi drugs are described as items which have the purpose listed below. These products are

not equipments or instruments and they are designated by the Ministry of Health and Welfare [14] for:

- The prevention of nausea, bad breath or body odour.
- The prevention of prickly heat festering.
- The prevention of hair loss, hair growth promotion or depilatory action.
- Items for exterminating or repelling rats, flies, mosquitoes etc. to maintain human and animal health.
- Cotton products intended for sanitary purposes, items having a mild action on the human body: hair colour and decolour, permanent waving lotion, items which, besides their cosmetic purpose, are used for the prevention of acne, chapping of skin, itchiness, rash, chilblains...etc. or those which have the additional purpose of disinfecting the skin or the oral cavity, bath preparations.

#### **4. Discussion and Conclusion**

In almost international frameworks, skin products are classified as either drugs or cosmetics. A drug can alter the structure and functions of the skin while a cosmetic just changes the appearance. The term cosmeceutical describes products that use ingredients having some biological effect on the skin but are not classified as drugs. Nowadays, several skin conditions, such as dandruff, wrinkles, baldness and others are treated with cosmetics containing “active substances” which have several biological mechanism of action in the skin [15]. These products are currently regulated in different ways across the globe, which result in different requirements. For example, the same sunscreen product could be a cosmetic in some countries, an OTC drug in others and a quasi- drug in yet others [16]. The Table 1 demonstrates the classification of some products under different regulations.

Considering borderline products, the (FD&C Act) and EU Directive do not recognize any such category. In general, such products are classified, in those markets, either cosmetic or drug. Japan, on the other hand, has legally defined middle category for cosmetics that produce minor alterations of the skin function and/or structure and they term this category Quasi-drugs [10].

The use of cosmeceuticals has drastically risen in recent years. They are the continuing intellectual challenge for research dermatologists [15] and for cosmetic industry. Active cosmeceutical ingredients are in increase evolution and they replace sometimes surgical interventions, especially in the field of skin aging. They are an intermediate between drugs and

cosmetics in their safety profile for consumers, but have an acceptable risk for normal and near-normal skin. They differ from cosmetics in having a defined, well-documented and beneficial effect on the skin or its appendages [6]. In the USA, most of these products such as anti-dandruff shampoos, anti-caries toothpaste, sunscreens and anti perspirants are considered as OTC drugs. In the EU, the situation is completely different; some of these products are regulated as cosmetics and are soled in supermarkets and pharmacies without prescription.

In the field of cosmetics, new pharmacologically active compounds are in a continuous improvement and the distinction between drugs and cosmetics is more blurred [7]. For this raison, it is well appreciated the proposition calling for a new group of products, [6, 7] which are neither drugs nor simple cosmetics, as in the Japanese model. This category could be named Cosmeceuticals; as this term already exists. This new group will be beneficial for the consumer as it will require companies to prove the efficacy and safety of such active cosmetics.

**Table1 :** Illustrative examples of product categorisation in different Markets (RPA, 2004)

Product type	Market		
	EU	USA	Japan
Soap for hands	Cosmetic	Cosmetic	cosmetic
Lipstick*	Cosmetic	Cosmetic	Cosmetic
Sunscreen	Cosmetic	OTC drug	Cosmetic
Anti – acne lotion	Medicinal product	OTC drug	Quasi- drug
Anti- caries toothpaste	Cosmetic	OTC drug	Quasi- drug
Anti-perspirant	Cosmetic	OTC drug	Quasi- drug
Hair dye	Cosmetic	Cosmetic	Quasi- drug

\* Without Sun Protection Function (SPF) factor.

OTC: Over The Counter.

### **References:**

- [1] Kligman AM. Why cosmeceuticals. *Cosmet Toiletries* 1993; 108: 37-8.
- [2] Steinberg D, Steinberg & Associates. Regulatory review – Cosmeceutical regulations- A global overview. *Cosmet Toiletries* 2005 ; 120 : 32.

- [3] Dureja H, Kaushik D, Gupta M, Lather V. Cosmeceuticals: An emerging concept. *Indian J Pharmacol* 2005; 37: 155-9.
- [5] Hammes C. Cosmeceuticals: the cosmetic-drug borderline. In: *Drug discovery approaches for developing cosmeceuticals: advanced skin care and cosmetic products* (Hori W, ed). Southborough: IBC Library series, 1997.
- [6] Lewis C. Clearing up cosmetic confusion. *FDA Cons Mag*, May-June 1998. Possible also on the link : [http://www.fda.gov/fdac/features/1998/398\\_cosm.html](http://www.fda.gov/fdac/features/1998/398_cosm.html).
- [7] Vermeer BJ, Glichrest BA. Cosmeceuticals: A proposal for rational definition, evaluation, and regulation. *Arch Dermatol* 1996; 132: 337-40.
- [8] Federal Food, Drug and Cosmetic act. Chapter II, Cosmetic definition. Sec 201 (i), 2004. Cosmetic Directive CD 76/768/EEC, article 1.
- [9] Mitsui T. New cosmetic science. In: *Regulations on cosmetics*. Amsterdam: Elsevier, 1997: 292- 6.
- [10] Jackson EM. Lawyers, regulations, and cosmetic claims. *Am J Contact Dermatitis* 1997; 8: 243-6.
- [11] RPA (Risk Policy Analyst). Comparative study on cosmetics legislation in the EU and other principal markets with special attention to so-called borderline products, Final report, August 2004. Possible also on the link:  
[http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/doc/j457\\_-\\_final\\_report\\_-\\_cosmetics.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/doc/j457_-_final_report_-_cosmetics.pdf)
- [12] Doc-Biocides-2002/03-rev1. Guidance document agreed between the commission services and the competent authorities of Member states for the biocidal products Directive 98/8/EC and for the cosmetic products Directive 76/768/EEC. Possible also on the link:  
[http://ec.europa.eu/environment/biocides/pdf/cosmetic\\_products.pdf](http://ec.europa.eu/environment/biocides/pdf/cosmetic_products.pdf)
- [13] FDA (Food and Drug Administration). Is it a cosmetic, a drug or both ? Or is it soap ? Centre for food safety and applied nutrition, office of cosmetics and colors, July 8, 2002. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-218.html>
- [14] Japan's Pharmaceutical Affairs Law (PAL), Law No. 145, 1960, chapter 1, article 2.
- [15] Draelos ZD. The cosmeceutical conundrum. *J Cosmet Dermatol* 2005; 4: 149-50.
- [16] Lindenschmit RC, Anastasia FB, Dorta M, Bansil L. Global cosmetic regulatory harmonization. *Toxicology* 2001; 160: 237-41.

# *Références*

---

## REFERENCES

---

- [1] FD&C Act (Federal Food, Drug and Cosmetic Act)  
Chapter II, definitions, sec.201 (i). [Consulté le 20/ 09/ 2007] Disponible sur :  
<http://www.fda.gov/opacom/laws/fdcaact/fdcaact1.htm>
- [2] CD 76/768/EEC, article 1 (Cosmetic Directive)
- [3] 76/768/EEC-Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products.  
Official J. L262,27 September 1976, p.169-200.
- [4] PAL (Japan's Pharmaceutical Affairs Law)  
Law No. 145, chapter 1, article 2.
- [5] AGACHE P, BLANC D, LAURENT R, LARDANS L  
Epiderme, poil, glandes sébacées et sudoripares.  
In :Punieras, Précis de cosmétologie dermatologique. Chap 1  
Paris : Edition Masson ; 1981. p 1-35.
- [6] AGACHE P  
La surface cutanée et son écosystème.  
In : Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées  
Cachan : Edition Médicales Internationales ; 2000. p 22.
- [7] AKOMEAH F, NAZIR T, MARTIN GP, BROWN MB  
Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants.  
E J Pharm Sc 2004 ; 21: 337-345.
- [8] ALI Z, AHMAD VU, ZAHID M, TAREEN RB  
Benzoic acid derivatives from *Strophanthus brahuica*.  
Phytochem 1998; 48: 1271- 1273.

- [9] ANDERSEN HR, MORTEN M, PEDERSEN MM et Coll  
Parabens, a group of compounds possessing estrogenic potency in in-vitro assays- what is the toxicological and ecotoxicological significance of these findings?  
In royal Danish school of pharmacy annual report 2000- 2001.
- [10] ANGELINI G, VENA GA, FOTI C, GRANDOLFO M  
Contact allergy to preservatives and perfumed compounds used in skin care products.  
J App Cosmetol 1997; 15: 49-57.
- [11] API AM  
Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients.  
Food Chem.Toxicol 2001; 39: 97-108.
- [12] ASSOUL M  
Analyse de la topographie des surfaces quelconques.  
Th : Sci : Besancon ;1991.215.
- [13] BANDO H, MOHRI S, YAMASHITA F, TAKAKURA Y, HASHIDA M.  
Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs.  
J Pharm Sci 1997; 86: 759-61.
- [14] BARTNIK FG, REDDY AK, KLECAK G, ZIMMERMAN V, HOSTYNEK JJ,  
KUNSTLER K  
Percutaneous absorption ,metabolism and hemolytic activity of n-butoxyethanol.  
Fundam.Appl.Toxicol 1987; 8: 59-70.
- [15] BARRY BW  
Percutaneous absorption.  
In : Dermatological formulations.  
New York: Dekker M; 1983.

- [16] BENFELDT E, SERUP J, MENNE T  
Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin : in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier perturbation.  
Br J Dermatol 1999; 140: 739- 748.
- [17] BENSALAH H, BELGNAOUI F Z , DOUIRA L, BERBICHE L, SENOUCI K ,  
HASSAM B  
Skin and menopause.  
Ann.Endocrino 2006; 67: 575-580.
- [18] BEN YTSHAK L  
Petite histoire du maquillage.  
Paris: Stock; 2000.
- [19] BERGFELD W, BELSITO DV, MARKS JG, ANDERSEN FA  
Safety in ingredients used in cosmetics.  
J A Acad Dermatol 2005; 52: 125-132.
- [20] BERNE B, BOSTROM A, GRAHNEM AF, TAMMELA M  
Adverse effects of cosmetics and toiletries reported to the Swedish medical products agency 1989- 1994.  
Contact dermatitis 1996; 34: 359- 362.
- [21] BERNARD P et BEDANE C  
Jonction dermo-épidermique : données actuelles.  
In : Shmitt D. : Biologie de la peau humaine.  
Paris : INSERM ; 1997.
- [22] BEURY J, WEBER M, EICH D  
Film cutané de surface.  
In : Meynadier J : Précis de physiologie cutanée.  
Paris : La porte verte ; 1980. p 215 – 222.

- [23] BISAILLON S  
Absorption cutanée.  
In : Robert : Dermopharmacologie clinique. Chap. 2  
Paris : Maloine S.A. ; 1985.
- [24] BLASHKO A  
Beitrrage zur anatomie der oberhaut.  
Arch Mikr Anat 1887 ; 30 : 495.
- [25] BLUHM EC, ZAHM SH, FINE HA, BLACK PM, LOEFFLER JS, SHAPIRO WR,  
SELKER RG ,INSKIP PD  
Personal hair dye use and risks of glioma, meningioma, and acoustic neuroma among adults.  
Am J Epidemiol 2007; 165: 63-71.
- [26] BOLOGNIA JL  
Aging skin.  
Am J Med 1995; 98: 1 A 99 S - 1 A 103 S.
- [27] BONDEEL A  
Intolerance reactions to cosmetics.  
J Pharm Belg 1993; 48: 308-312.
- [28] BONNEAU I  
La chromatographie en phase liquide.  
Analisis 1987; 15 :151 – 158.
- [29] BORRAS-BLASCO J, LOPEZ ., MORANT M.J, DIEZ-SALES O,HERRAEZ-  
DOMINGUEZ M  
Influence of sodium lauryl sulphate on the in vitro percutaneous absorption of compounds  
With different lipophilicity.  
E J Pharm Sc 1997; 5: 15-22.

- [30] BRAIN KR, WALTERS KA, GREEN DM, BRAIN S, LORETZ LJ, SHARMA RKK, DRESSLER WE  
Percutaneous penetration of diethanolamine through human skin in vitro: Application from cosmetic vehicles.  
F Chem Toxicol 2005; 43:681-690.
- [31] BRINON L, GEIGER S, ALARD V, DOUCET J, TRANCHANT JF, COUARRAZE G  
Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases.  
J Control Release 1999; 60 :67-76.
- [32] BRONAUGH RL et STEWART RF  
Methods for in vitro percutaneous absorption studies.  
J Pharm Sci 1985 ; 74 :64- 67.
- [33] BUTTLER T, NILSSON C, GORTON L, MARKO- VARGA G, LAURELL T  
Membrane caractérisation and performane of microdialysis probes intended for use as bioprocess sampling units.  
J Chromatogr A 1996 ; 725 : 41- 56.
- [34] CAL K, SZNITOWSKA M  
Cutaneous absorption and elimination of three acyclic terpenes. In vitro studies.  
J Control Release 2003 ; 93: 369-376.
- [35] CASTIEL- HIGOUNEC I. , GALL Y  
Intérêt de la pharmacocinétique en dermocosmétique.  
Bedec 1996 ; 4 :17 – 25.
- [36] CESARINI JP  
La peau.  
Paris : PUF ; 1990.
- [37] CATALA I.  
Dermatologie et nutrition.  
Bedec 1999 ; 7 : 210-212.

- [38] CHANG ML , CHANG CM  
Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products.  
J Pharm.Biomed Anal 2003 ; 33 :617 – 626.
- [39] CHESSELS M, HAWKER DW, CONNELL DW  
Critical evaluation of measurement of the 1-octanol/water partition coefficient of hydrophobic compounds.  
Chemosphere 1991; 22: 1175- 7790.
- [40] CHISVERT A, PASCUAL-MARTI M.C0, SALVADOR A  
Determination of the UV filters worldwide authorised in sunscreens by high performance liquid chromatography. Use of cyclodextrins as mobile phase modifier.  
J Chromatogr A 2001; 921:207-215.
- [41] CHO J, OH E, LEE E, SUL D  
Effects of hair dyeing on DNA damage in human lymphocytes.  
J Occup Health 2003 ; 45:376- 381.
- [42] COOK TH  
Profilometry of skin – A useful tool for the substantiation of cosmetic efficacy.  
J Soc Cos Chem 1980; 31: 339 – 359.
- [43] COLLINS KJ, SARGENT F, WEINER J  
Excitation and depression of eccrine sweat glands by acetylcholine, acetyl B methylcholine and adrenalin.  
J Physio 1959 ; 148 : 592 – 614.
- [44] CONSEIL DE L'EUROPE  
Produits cosmétiques-Situations frontières.  
Strasbourg : Editions du conseil de l'Europe ; 2004 .

- [45] COQUETTE A, BERNA N, POUMAY Y, PITTELKOW M R  
The keratinocytes in cutaneous irritation and sensitation. In: biomedical modulations of skin reactions in dermal and transdermal drug delivery. Chap.8.  
Boca Raton: CRC Press; 2000. p 125- 143.
- [46] CORCUFF P, DE RIGAL J, LEVEQUE JL  
Image analysis of the cutaneous microrelief.  
Bioeng Skin- news 1982 ; 4 :16 – 31.
- [47] CORCUFF P, CHATENAY F, LEVEQUE JL (1984)  
A fully automated system to study skin surface pattern.  
Int J Cosmet Sci 1984 ; 6:167-176.
- [48] CORCUFF P , DE REGAL J , LEVEQUE JL , MAKKI S ,AGACHE P  
Skin relief and aging.  
J Soc Cosmet Chem 1984; 35: 311 – 325.
- [49] COSMETLEX  
Cosmetics legislation, Vol 1, annex VI, part 1, reference 12 1999.
- [50] CROSS SE, ROBERTS M  
The effect of occlusion on epidermal penetration of parabens from a commercial allergy test ointment, acetone and ethanol vehicles.  
J Inv Derm 2000; 115: 914- 918.
- [51] CTFA  
Microbial content subcommittee of the CTFA Microbiology Committee  
Microbiological limit guidelines for cosmetics and toiletries.  
Washington : CTFA ; 1973.
- [52] DAHINGER-BROOMER A  
Réglementation : Amérique versus Europe.  
Cosmétologie 1996; 11:47-49.

- [53] DAL POZZO A, LIGGERI E, DELUCCA C, CALABRESE G  
Prediction of skin permeation of highly lipophilic compounds: in vitro model with a modified receptor phase.  
Int J Pharm 1991 ; 70:219-223.
- [54] DAL POZZO A , PASTORI N  
Percutaneous absorption of parabens from cosmetic formulations.  
Int J Cosm Sci 1996; 18:57-66.
- [55] DARBRE PD  
Enviromental oestrogens,cosmetics and breast cancer.  
Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2006; 20:121-143.
- [56] DARBRE PD  
Aluminium, anti perispirants and breast cancer.  
J Inorg Biochem 2005; 99:1912- 1919.
- [57] DARBRE P D  
Underarm cosmetics are a cause of breast cancer  
Euro J Cancer Prev 2004; 13:153.
- [58] DARBRE PD, ALJARRAH A, MILLER WR, COLDMAN NG, SAUER MJ, POPE GS  
Concentrations of parabens in human breast tumors.  
J Appl Toxicol 2004 ; 24 :5-13.
- [59] DARBRE P D, BYFORD J R , SHAW L E , HALL S , COLDHAM NG, POPE G S ,  
SAUER M J  
Oestrogenic activity of benzylparaben.  
J Appl Toxicol 2003; 23: 43-51.
- [60] DARBRE P D , BYFORD J R , SHAW L E , HORTON R A, POPE G S ,SAUER J  
Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo.  
J Appl Toxicol 2002 ; 22: 219-226.

- [61] DEARDEN JC  
The QSAR prediction of melting point, a property of environmental relevance  
Sci Total Env 1991; 109/110: 59-68.
- [62] DEARDEN JC, BRESNEN GM  
The measurement of partition coefficients.  
Quant Struct-Act Relat 1988; 7: 133- 144.
- [63] DE SANJOSE, BENAVENTE Y, NIETERS A, FORETOVA L, MAYNADOE M, COCCO PL, STAINES A, VORNANEN M, BOFFETTA P, BECKER N, ALVARO T, BRENNAN P.  
Association between personal use of hair dyes and lymphoid neoplasms in Europe.  
Am J Epidemiol 2006 ; 164 :47-55.
- [64] DIEMBECK W et Coll.  
Test guidelines for in vitro assessment of dermal absorption and percutaneous penetration of cosmetic ingredients. European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association.  
F Chem Toxicol 1999; 37 :191 – 205.
- [65] DIGITAL SURF  
documentation interne, 2005.  
16 rue Lavoisier, Besançon.
- [66] DI GIOVANNI C, ARCORACI V, GAMBARDELLA L, SAUTEBIN L  
Cosmetovigilance survey: Are cosmetics considered safe by consumers?  
Pharm Reas 2006 ; 53: 16-21.
- [67] DOC-BIOCIDES  
Doc-Biocides-2002/03-rev1  
Guidance document agreed between the commission services and the competent authorities of Member states for the biocidal products Directive 98/8/EC and for the cosmetic products Directive 76/768/EEC 2003. [Consulté le 20/ 09/ 2007] Disponible sur :  
[http://ec.europa.eu/environment/biocides/pdf/cosmetic\\_products.pdf](http://ec.europa.eu/environment/biocides/pdf/cosmetic_products.pdf).

- [68] DONALD S  
Use of parabens as cosmetic preservatives.  
Int J Dermatol 1980 ;19 : 504 -505.
- [69] EC ( European Commission)  
Guidance Document on Dermal Absorption  
Health and Consumer Protection Directorate-General Sanco/ 222/ 2000 rev.7  
19 March 2004. [Consulté le20/ 09/ 2007] Disponible sur :  
[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc20\\_rev\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc20_rev_en.pdf)
- [70] EFSA (European food Safety Authority)  
Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavouring, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to para hydroxybenzoates (E 214- 219). Question number EFSA-Q-2004-063.  
The EFSA Journal 2004 ; 83 : 1-26.  
[Consulté le 20/ 09/ 2007 ] Disponible sur :  
[http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific\\_Opinion/opinion\\_afc16\\_ej83\\_parabens\\_v2\\_en1,1.pdf](http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Opinion/opinion_afc16_ej83_parabens_v2_en1,1.pdf)
- [71] EFSEN J, HAUSEN HN, CHRISTIANSEN S, KEIDING J  
Laser Profilometry.  
In : Serup J, Jemec GBE: Handbook of non invasive methods and the skin.  
Boca Raton, FL: CRC Press; 1995.
- [72] ELDER R  
Final report on the safety assessment of methyl paraben, ethyl paraben, propyl paraben and butylparaben.  
J Am College Toxicol 1984; 3:147-209.
- [73] ELDER R , BUSCH J T  
In: The cosmetic industry: Scientific and regulatory foundations.  
New York: Dekker; 1984. p 203 – 213.

- [74] EL HUSSEIN S, MURET P, BERARD M, MAKKI S, HUMBERT P  
Assessment of principal parabens used in cosmetics after their passage through epidermis-dermis layers (Ex-vivo study).  
Exp Dermatol 2007; 16: 830-836.
- [75] ELIAS P M  
Epidermal lipids, membrane and keratinization.  
J Dermatol 1981 ; 20: 1 – 19.
- [76] ELIAS P M  
Epidermal lipids, barrier function and desquamation.  
J Invest Dermatol 1983; 80:44S-49S.
- [77] ELMQUIST W F et SAWCHUK R J  
Application of microdialysis in pharmacokinetic studies  
Pharm Res 1997; 14:267-288.
- [78] ENGEL CE  
Photography of the skin  
J Photogr Sci 1956; 4: 40-43.
- [79] ESPOSITO E , BORTOLOTTI F , NASTRUZZI C, MENEGATTI E , CORTESI R  
Diffusion of preservatives from topical dosage forms: a comparative study.  
J Cosmt Sci 2003; 54:239-250.
- [80] EXLEY C  
Does antiperspirant use increase the risk of aluminium-related disease, including Alzheimer's disease?  
Mol Med Today 1998; 4:107-109.
- [81] FARMER E  
Why a biopsy?  
Arch Dermatol 2000; 136: 779-780.

- [82] FCC (Food and Chemical Codex)  
National Academy of Sciences.  
Washington, DC; 1996. p 255-256.
- [83] FDA (Food and Drug Administration)  
Is it a cosmetic, a drug or both? Or is it soap?  
Centre for food safety and applied nutrition, office of cosmetics and colors, 2002, July 8.  
[Consulté le 20/ 09/ 2007 ] Disponible sur : <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-218.html>.
- [84] FDA (Food and Drug Administration)  
CFSAN Office of cosmetics and colors. FDA authority over cosmetics.  
What does the law say about cosmetic safety and labelling? March 3 2005  
[Consulté le 20/ 09/ 2007] Disponible sur : <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/cos-206.html>
- [85] FERGUSON J  
A methode to facilitate the isolation and handling of stratum corneum.  
Br J Dermatol 1977 ; 96:21-23.
- [86] FERGUSON J , BARBENEL J C  
Skin surface patterns and the directional mechanical properties of the dermis.  
In: Marks R, Payne PA: Bioengineering and the skin.  
London: London Press; 1981. p 83 – 92.
- [87] FRANZ, TJ  
Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data.  
J Invest Dermatol 1975 ; 64:190–195.
- [88] FRUIJTIER-POLLOTH C  
Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products.  
Toxicology 2005; 214: 1-38.

- [89] FUJITA J, TOKUNAGA J, INOUE H  
Scanning electron microscopy of the skin using celluloid impressions.  
Arch Histol Jpm 1969 ; 30: 321- 326.
- [90] GAGO-DOMINGUEZ M, CASTELAO JE, YUAN JM, YU MC, ROSS RK  
Use of permanent hair dyes and bladder cancer risk.  
Int J Cancer 2001; 91 : 575-579.
- [91] GERAS AJ.  
Dermatology: A Medical Artist's Interpretation .  
Switzerland: Sandoz Medical Publications; 1990.
- [92] GOLDEN R, GANDY J, VOLLMER G  
A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health.  
Clin Rev Toxicol 2005; 35: 435-458.
- [93] GORECKI CH, TRIBILLON G, MIGNOT J  
Profilomètre optique en lumière blanche.  
J Optique 1983 ; 14: 18-23.
- [94] GRAHAM J A , JOUHAR A J  
L'importance des cosmétiques dans les psychologies de l'apparence.  
Int J Derm 1983; 22: 153.
- [95] GRAHAM J A , KLIGMAN R M  
The physiological benefits of cosmetics in health care: dermatological perspectives.  
J Appl Cosmetol 1984; 2 :7-8.
- [96] GROSA G, DEL GROSSO E, RUSSO R, ALLEGRONE G  
Simultaneous, stability indicating, HPLC-DAD determination of guaifenesin and methyl and propyl-parabens in cough syrup.  
J Pharm Biomed Anal 2006 ; 41:798-803.

- [97] GRUVBERGER B , BRUZE M., TAMMELA M  
Preservatives in moisturizers on the Swedish market.  
Acta Derm Venereol 1998; 78: 52-56.
- [98] GUY R H , HADGRAFT J  
Structure activity correlation in percutaneous absorption.  
In: Bronaugh RL, Maibach: Percutaneous absorption: mechanisms, methodology, drug delivery. 2<sup>ème</sup> edition.  
New York: Decker; 1989.
- [99] HADGEDORN-LEWEKE V , LIPPOLD B C  
Absorption of sunscreen and other compounds through human skin in vivo: derivation of a method to predict maximum fluxes.  
Pharm Res 1995; 12: 1354- 1360.
- [100] HANDA O , KOKURO S , ADACHI S , TAKAGI T , NAITO Y , TANIGAWA T ,  
YOSHIDA N , YOSHIKAWA T  
Methyl paraben potentiates UV- induced damage of skin keratinocytes.  
Toxicology 2006; 227:62- 72.
- [101] HANSCH C , LEO A  
Exploring QSAR, fundamentals and applications in chemistry and biology.  
Washington: ACS Professional Reference Book; 1995.
- [102] HARRISON JE, WATKINSON AC, GREEN DM, HADGRAFT J, BRAIN K  
The relative effect of Azone® and Transcutol ® on permeant diffusivity and solubility in human stratum corneum.  
Pharm Res 1996; 13 : 542- 546.
- [103] HARVEY P W  
Parabens, oestrogenicity, underarm cosmetics and breast cancer:ca perspective on a hypothesis.  
J Appl Toxicol 2003; 23: 89-95.

- [104] HARVEY PW, DARBRE P D  
Endocrine disrupters and human health: could oestrogenic chemicals in body care cosmetics adversely affect breast cancer incidence in women?  
J Appl Toxicol 2004; 24: 167-76.
- [105] HASHIMOTO K  
New methods for surface ultrastructure. Comparative studies of scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and replica method.  
Int J Dermatol 1974 ; 13 : 357-381.
- [106] HASHIMOTO K , KANAZAKI T  
Surface ultrastructure of human skin.  
Acta Derm Venereol (Stock) 1975; 55: 413 – 436.
- [107] HELLER M, PROST C  
L'épiderme: les kératinocytes.  
Cosmétologies 1994 ; 1 :26 – 30.
- [108] HERNANDEZ M, MERCIER – FRENZEL M M  
Précis d'esthétique cosmétique.  
Paris : Maloine ; 1994. p 116 – 118.
- [109] HEWITH J  
Histologie et histochimie de la peau normale.  
In : Encyclopédie médico- chirurgicale.  
Dermatologie  
Paris : Laffont, A et F Durieux ; 1969.
- [110] IDSON B  
Percutaneous absorption.  
J Pharm Sci 1975 ; 64:901-924.

- [111] IDSON B  
Vehicule effects in percutaneous absorption.  
Drug Metab Rv 1983 ; 14: 207.
- [112] ILLEL B, SCHAFFER H  
Transfollicular percutaneous absorption. Skin model for quantitative studies.  
Acta Dermatol Venereol 1988; 68: 427-457.
- [113] ILLEL B, SCHAFFER H , WEPIERRE J DOUCET O  
Follicules play an important role in percutaneous absorption.  
J Pharm Sci 1991; 80: 424 – 427.
- [114] ISHIWATARI S ,SUZUKI T ,HITOMI T ,YOSHINO T ,MATSUKUMA S,TSUJI T  
Effects of methyl paraben on skin keratinocytes.  
J Appl Toxicol 2007; 27:1-9.
- [115] JACKSON JA, DILIBERTO JJ, BIRNBAUM LS  
Estimation of octanol-water partition coefficients and correlation with dermal absorption for several polyhalogenated aromatic hydrocarbons.  
Fund Appl Toxicol 1993; 21:334- 344.
- [116] JACOB U, CHEN M, FRANKOWSKI G, SINKGRAVEN R, HUND M, RZANY B,  
STERRY W, LADEMANN J  
In vivo determination of skin surface topography using an optical 3D device.  
Skin Res Tech 2004; 10: 207-211.
- [117] JIANG R, HAYDEN C G J , PRANKERD R J , ROBERTS M S , BENSON H A E  
High-performance liquid chromatographic assay for common sun screening agents in cosmetic products, bovine serum albumin solution and human plasma.  
J ChromatoB 1996; 682 : 137-145.

- [118] JIANG R , ROBERTS M S , COLLINS D M , BNSON H A E  
Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for  
Children and adults.  
Clin Pharmacol 1999; 48: 635-637.
- [119] JOHNSON C , RODNEY D , SHUSTER S  
Surface appearance of the eccrine sweat duct by scanning electron microscopy.  
Br J Dermatol 1970; 83:655-660.
- [120] KIEC-SWIERYZYNSKA M, KRECISZ B, SWIERYZYNSKA-MACHURA D  
Allergy to cosmetics I. Fragrances.  
Med Pr 2004a ; 55: 203-206.
- [121] KIEC-SWIERYZYNSKA M, KRECISZ B, SWIERYZYNSKA-MACHURA D  
Allergy to cosmetics II. Preservatives.  
Med Pr 2004b; 55:289- 292.
- [122] KIISTALA U  
Dermal-epidermal separation: External factors in suction blister formation with special  
reference to the effect of temperature.  
Ann Clin Res 1972; 4: 236-246.
- [123] KIISTALA U et MUSTAKALLIO KK  
Dermal-epidermal separation with suction: electron microscopic and histochemical study of  
initial events of blistering on human skin.  
J Inv Dermatol 1967; 48: 466-477.
- [124] KITAGAWA S , LI H , SHINJI S  
Skin permeation of parabens in excised guinea pig dorsal skin, its modification by  
penetration enhancers and their relationship with n-octanol / water partion coefficients.  
Chem Pharm Bull 1997 ; 45:1354 – 1357.

- [125] KLIGMAN A M  
A biological brief on percutaneous absorption.  
Drug Develop Ind Pharm 1983; 9: 521.
- [126] KOLBE H  
Ann ChemPharm 1860; 113: 125.
- [127] KOMATSU H, SUZUKI M  
Percutaneous absorption of butyl paraben through guinea pig skin in vitro.  
J Pharm Sci 1979; 68: 596-598.
- [128] KRAELING M E K , YOURICK J J, BRONAUGH R L  
In vitro human skin penetration of diethanolamine.  
F Chem Toxicol 2004; 42:153-1561.
- [129] KREILGAARD M  
Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis.  
Adv Drug Del Rev 2002 ; 54: S99 – S121.
- [130] KREJCI C B , BIASSADA N F , FARAH C , GREENWELL H  
Clinical evaluation of porous and nonporous hydroxyapatite in the treatment of human periodontal bony defects.  
J Peridontol 1987; 58: 521-528.
- [131] KUBINYI H  
QSAR: Hansch analysis and related approaches.  
In : Mannhold R, Krogsgaard-Larsen P, Timmerman H:Methods and principles in medicinal Chemistry  
New York, Basel, Cambridge, Tokyo VCH Weinheim ; 1993. p 21- 55.
- [132] KUNZ PY, FENT K  
Estrogenic activity of UV filters mixtures.  
Toxicol Appl Pharmacol 2006; 217: 86-99.

- [133] LABAT L , KUMMER E , DALLET P , DUBOST J P  
Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product.  
J Pharm Biomed Anal 2000; 23:763-769.
- [134] LACK A et FUCHS G  
Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of anaerobic phenol metabolism.  
J Bacteriol 1992 ; 174: 3629- 3636.
- [135] LAGARDE J M, ROUVRAIS C, BLACK D  
Topography and anisotropy of the skin surface with ageing.  
Skin ResTech 2005; 11:110-119.
- [136] LAGARDE JM, ROUVRAIS C, BLACK D, DIRIDOLLOU, GALL Y  
Skin topography measurement by interference fringe projection : a technical validation.  
Skin Res Tech 2001; 7 :112-121.
- [137] LARREGUE M, BRESSIEUR J M , LAIDET B  
Tissu adipeux.  
In :Meynadier : Précis de physiologie cutanée.  
Paris : Editions de la Porte verte ; 1980.
- [138] LATOUR J F  
La chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP).  
Lyon Medical 1982; 33: 333-351.
- [139] LEE CK, UCHIDA T, KITAGAWA K, YAGI A, KIM N S, GOTO S  
Skin permeability of various drugs with different lipophilicity.  
J Pharm Sci 1994; 83: 562-565.
- [140] LEO A HANSCH C , ELKINS D  
Partition coefficients and their uses.  
Chem Rev 1971; 71: 525 – 554.

- [141] LEVEQUE JL  
EEMCO guidance for the assessment of skin topography.  
J Eu Aca Derm Venereol 1999; 12: 103-114.
- [142] LEVEQUE N, MAKKI S, HADGRAFT J, HUMBERT P  
Comparison of franz cells and microdialysis for assessing salicylic acid penetration through human skin .  
Int J Pharm 2004; 269: 323 – 328.
- [143] LEVEQUE J L, QUERLEUX B  
SkinChip<sup>®</sup>, a new tool for investigating the skin surface in vivo.  
Skin Res Technol 2003 ; 9: 343-347.
- [144] LIEN EJ et GAO H  
QSAR analysis of skin permeability of various drugs in man as compared to in vivo and in vitro studies in rodents.  
Pharm Res 1995; 12: 583-587.
- [145] LINDBERG M, TAMMELA M, BOSTROM A, FISCHER T, INEROT A, SUNDBERG K  
Are adverse skin reactions to cosmetics underestimated in the clinical assessment of contact dermatitis? A prospective study among 1075 patients attending Swedish patch test clinics.  
Acta Derm Venereol 2004; 84: 291-295.
- [146] LINDSEY AS et JESKEY H  
Chem Rev 1957; 57: 583- 620.
- [147] LOBEMEIER C., TSCHOETSCHL C., WESTIE S., HEYMANN E  
Hydrolysis of parabens by extracts from differing layers of human skin.  
Biol Chem 1996 ; 377: 647-651.
- [148] LORETTE G, LARREGUE M  
In : Pratique de Dermatologie Pédiatrique.  
Paris: Edition Doin; 1989.

- [149] LORETZ LJ, API AM, BARRAJ L.M  
Exposure data for cosmetic products: Lipstick, body lotion, and face cream .  
F Chem Toxicol 2004 ; 43: 279-291.
- [150] LOWE LB, VANDER LEUN JC  
Suction blisters and dermal-epidermal adherence.  
J Invest Dermatol 1968 ; 50: 308- 314.
- [151] MAC-MARY S , MAKKI S , AGACHE P  
Perméabilité cutanée en fonction de l'âge.  
Cosmétologie 1996 ; 12 : 34 – 37.
- [152] MAIBACH HI, FELDMANN RJ, MILDY TH, SERAT WF  
Regional variation in percutaneous penetration in man.  
Arch Environ Health 1971; 23: 208- 211.
- [153] MAKKI S  
A quantitative method for evaluating the microtopography of the surface of Human skin.  
PhD Bioengineering  
Glasgow: University of Strathclyde (Bioengineering Unit ); June 1980.
- [154] MAKKI S  
Méthodes d'étude quantitative de la microtopographie de la peau humaine : évaluation de  
l'efficacité des produits dermocosmétiques.  
Th : Sci. Pharma : Besançon; 1987. 1 E.
- [155] MAKKI S , AGACH P , BARBENEL J C  
A quantitative method for the assessment of the microtopography of human skin.  
Act Derm Venereol 1979 ; 59 : 285 – 291.
- [156] MAKKI S, MASOUY P, ZAHOUANI H, AGACHE P  
Méthodes d'étude quantitative de la microtopographie de la peau humaine (Apport des  
techniques à la dermo-cosmétologie).  
Laboratoires Pierre Fabre, Conférence Carla Tome V 1984 :125-134.

- [157] MAKKI S, MURET P, SAID AM, BASSIGNOT P, HUMBERT P, AGACHE P, MILLET J  
Percutaneous absorption of three psoralens commonly used in therapy: effect of skin occlusion (in-vitro study).  
Int J Pharm 1996 ; 133: 245-252.
- [158] MALKINSON F D , FERGUSON E H  
Percutaneous absorption of hydrocortisone 4C14 in two human subjects.  
J Invest Dermatol 1955 ; 9: 561.
- [159] MARKS R , PEARSE AD  
Surfometry : A method of evaluating the internal structure of the stratum corneum..  
Br J Dermatol 1975 ; 92 : 651- 657.
- [160] MARSAUT D  
Ingénierie optique et microsystème s silicium : développement d'une instrumentation dédiée à la biologie cutanée.  
Th : Sci Ingé : Besancon ; 2004.
- [161] MARTINI M C  
Les gels, acteurs majeurs en galénique.  
Cosmétologie 1996 ; 12 : 45 -46.
- [162] MARTINI M C  
In : Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie.  
Paris : Editions Tec & Doc, Lavoisier ; 2003. p 31-40.
- [163] MARTY JP  
Fixation des substances chimiques dans les structures superficielles de la peau: importance dans les problèmes de décontamination et de biodisponibilité.  
Th : pha : Paris ; 1976.40.

- [164] MARTY S , NEEPER – BRADLY T , NEPTUN D , CARNEY E  
Developmental toxicity of Diethanolamine applied cutaneously to CD Rats and New Zealand white Rabbits.  
Regul Toxicol Pharmacol 1999 ; 30 : 169-181.
- [165] MASOUY P  
Quantification profilométrique de la structure de la surface cutanée. Variation en fonction du site, de l'âge, et du sexe.  
Th : med :Besançon; 1983. 069.
- [166] MATTHEWS C , DAVIDSON J , BAUER E , MORRISON J L , RICHARDSON A P  
p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats and mice.  
J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (baltim) 1956 ; 45: 260-267.
- [167] MAYNADIER J, PEYRON J L  
Absorption cutanée.  
In : Mayandier J. : Précis de physiologie cutanée.  
Paris : Editions de la Porte verts ; 1980.
- [168] MC GRATH KG  
An earlier age of breast cancer diagnosis related to more frequent use of antiperspirants/deodorants and underarm shaving.  
Eur J Cancer Prev 2003 ; 12 : 479-485.
- [169] MELISSOPOULOS A, LEVACHER C  
In : La peau : structure et physiologie.  
Paris : Tec & doc Lavoisier 1998.
- [170] MELSKI J W  
In: The anatomy and physiology of the skin.  
Paris: ELSEVIER 1996.

- [171] MERK INDEX (2007)  
Whitehouse Station, N J , USA; 2007.
- [172] MIGNOT C , MIGNOT J , JACQUET A  
Profilométrie et cosmétologie.  
Parfums cosmétiques actualités 1996 ; 128 : 38 -51.
- [173] MILIGI L et Coll.  
Personal use of hair dyes and hematolymphopoietic malignancies.  
Arch Env Occup Health 2005; 60:249-56.
- [174] MITSUI  
New cosmetic science. In: Regulations on cosmetics.  
Amsterdam: Elsevier; 1997. p 292- 296.
- [175] MORAND J J , KOEPEL C M , SAYAG J  
Guide illustré de diagnostique en dermatologie et vénéréologie.  
Tome 1 : Architecture et structure de la peau.  
Paris : Marketing S A; 1996. p 21-34.
- [176] MORMITO Y., HATANAKA T., SUGIBAYASHI K., OMIYA H. (1992)  
Prediction of skin permeability of drugs. Comparison of human and hairless rat skin.  
J Phar, Pharmacol 1992 ; 44 : 634- 639.
- [177] MOWAD C M  
Allergic contact dermatitis caused by parabens: 2 case reports and a review.  
Ameri J Contac Derm 2000; 11: 53-56.
- [178] MURATA M, NISHIMURA T, CHEN F, KAWANISHI S  
Oxidative DNA damage induced by hair dye components ortho-phenylenediamines and the enhancement by superoxide dismutase.  
Mutat Res 2006 ; 607: 184-191.

- [179] MURET P et MARY S  
Techniques de bulles de succion et microdialyse.  
Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées.  
Paris : Editions médicales internationales ; 2000. p 601.
- [180] NAGATA N, KAWAJIRI T, HAYASHI T, NAKANISHI K, NIKAIDO Y, KIDO M  
Interstitial pneumonitis and fibrosis associated with the inhalation of hair spray.  
Respiration 1997; 64:310-312.
- [181] NAGELS L  
The driving forces behind the new wave of miniaturisation in HPLC.  
Trends in Analytical Chemistry 1997; 16: 7-8.
- [182] NEW KC, PETROL WM, BOYDE A, MARTIN L, CORCUFF P, LEVEQUE JL, LEMP  
MA, CAVANAGH HD JESTER JV  
In vivo imaging of human teeth and skin using a real time confocal microscopy .  
Scanning 1991; 13: 369-372.
- [183] NEWBERNE P M  
Toxicological highlight .Choline deficiency associated with Diethanolamine  
carcinogenicity.  
Toxicol Sci 2002; 67: 1-3 .
- [184] NICULESCU MD, WU R, GUO Z, DA COSTA K, ZEISEL SH  
Diethanolamine alters proliferation and choline metabolism in mouse neural precursor cells.  
Toxicol Sci 2007; 96: 321-326.
- [185] NITA D , MIGNOT J , CHUARD M , SOFA M  
3-D profilometry using a CCD linear image sensor: application to skin surface topography  
measurement.  
Skin Res Tech 1998; 4:121-129.

- [186] NOHYNEK G, SCHAFER H  
Benefit and risk of organic Ultraviolet filters.  
Regul Toxicol Pharmacol 2001; 33: 285-299.
- [187] NOLY V et SCHMITT D  
Le soleil et la peau  
In: L'homme et le soleil.  
Arppam édition 2004.
- [188] ODLAND A  
Structure of the skin .  
In : Goldsmith LA: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of the skin.  
New York : Oxford University press; 1984. p 3-5.
- [189] OISHI S  
Effects of butyl paraben on the male reproductive system in rats.  
Toxicol Ind Health 2001; 17: 31-39.
- [190] OISHI S  
Effects of propyl paraben on the male reproductive system.  
F Chem Toxicol 2002; 40: 1807-1813.
- [191] OISHI S  
Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice.  
ArchToxicol 2002;76: 423-429.
- [192] OISHI S  
Lack of spermatotoxic effects of methyl and ethyl esters of p-hydroxybenzoic acid in rats.  
F Chem Toxicol 2004;42: 1845-1849.
- [193] PASCHE-KOO F, CLAEYS M , HAUSER C  
Contact urticaria with systemic symptoms caused by bovine collagen in a hair conditioner.  
Am J Contact Dermatitis 1996; 7: 56-57.

- [194] PATEL P, IDE M, COWARD D P , DI SILVIO L  
The effect of a commercially available chlohexidine mouthwash product on human osteoblast cells.  
Eur J Prosthodont Restor Dent 2006 ; 14 : 67-72.
- [195] PATIL S., SINGH P., SARASOUR K., MAIBACH H.  
Quantification of sodium lauryl sulphate penetration into the skin and underlying tissues after topical application.  
J Pharm Sci 1995 ; 84 :1240-1244.
- [196] PEDERSEN K L , PEDERSEN S N, CHRISTIANSEN L B, KORSGAARD B,  
BJERREGAARD P  
The preservatives ethyl-, propyl- and butyl paraben are oestrogenic in an in vivo fish assay.  
PharmToxicol 2000 ; 86:110-113.
- [197] PHILIPPSON  
Uber die herstellung von flachenbilden der oderhaut und der lerderhaut  
Mschr Prakt Derm 1889 ; 8 : 389.
- [198] PINKUS F  
Die normale anatomie der haut.  
In: Jadassohn : Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten. Vol. Pt1.  
Berlin: Springer; 1927 . p73-76.
- [199] POTARD G ,LAUGEL C BAILLET A ,SCHEAFER H ,MARTY J P  
Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies.  
Int J Pharmaceutics 1999 ; 189: 249 -260.
- [200] POTORAC A D , TOMA I , MIGNOT J  
In vivo measurement using a new optical profilomètre.  
Skin Research and Technology 1996; 2: 64-69.

- [201] PRUNIERAS M  
Précis de cosmétologie dermatologique.  
Paris : Masson ; 1981.. p 10 -11.
- [202] PRUSAKIEWICZ J J ,HARVILLE H M , ZHANG Y , ACKERMANN C ,  
VOORMAN R L  
Parabens inhibit human skin estrogen sulfotransferase activity: Possible link to paraben  
estrogenic effects.  
Toxicology 2007 ; 232: 248- 256.
- [203] PUGAZHENDHI D, POPE G S, DARBRE P D  
Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and  
methylparaben in human breast cancer cell lines.  
J Appl Toxicol 2005 ; 25: 301-309.
- [204] RASTOGI S C , A SCHOUTIEN, N KRUIJF, J W WEIJLAND  
Contents of methyl - , ethyl -, propyl-, butyl-, and benzylparaben in cosmetic products.  
Contact Dermatitis 1995 ; 32 : 28 – 30.
- [205] RAVENZWAAY B V and LEIBOLD E  
The significance of in vitro rat skin absorption studies to human risk assessment.  
Toxicol in vitro 2004 ; 18:219- 225.
- [206] READER'S DIGEST  
Les inventions qui ont changé le monde.  
Édition Sélection du reader's digest 1982.
- [207] REISCH MS  
Keeping well-preserved. Cosmetic preservatives makers offer alternatives as widely used  
parabens come under scrutiny.  
Chem.Eng.News 2005 ; 83: 25- 26.

- [208] RIBAUD C, GARSON J L, DOUCET J, LEVEQUE J L  
Organisation of stratum corneum lipids in relation to permeability : influence of sodium lauryl sulfate and preheating.  
Pharm Res 1994 ; 11: 1414-1418.
- [209] ROBERT P, BISAILO S  
Dermatologies clinique.  
Paris : Maloinés S.A. ; 1985. p 44 - 48.
- [210] ROQUILLY C  
Le droit des produits cosmétiques.  
collection droit civil.  
Paris: Economica; 1991. p 154 -161.
- [211] ROSS J H , DONG M H , KRIEGER M I  
Conservatism in pesticide exposure assessment.  
Regul Toxicol Pharmacol 2000 ; 31: 53- 58.
- [212] ROUSSELLE C  
Evaluation du risque lié à l'utilisation des parabens dans les produits cosmétiques.  
(Lettre de l'Afssaps).  
Vigilances 2005; 30: 3.
- [213] ROUTLEDGE E J , PARKER J ODUM J ASHBY J SUMPTER J P  
Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic.  
Toxicol Appl Pharm 1998 ; 153: 12-19.
- [214] RPA (Risk and Policy Analysts)  
Comparative study on cosmetics legislation in the EU and other principal markets with special attention to so-called borderline products.  
Final report, August 2004. [Consulté le 20/ 09/ 2007 ] Disponible sur :  
[http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/doc/j457\\_-\\_final\\_report\\_-\\_cosmetics.pdf](http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/doc/j457_-_final_report_-_cosmetics.pdf)

- [215] SAAD B , FAZLUL BARI M D , SALEH M I , AHMAD K , TALIB M K M  
Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methyl paraben and propyl paraben) in foodstuffs using high performance liquid chromatography.  
J Chromato A 2005; 1073: 393-397.
- [216] SABALITSCHKA T  
Application of ethyl p-hydroxybenzoate in maintenance of sterility, in sterilization and in disinfection.  
Arch Pharmacy 1930 ; 268 : 653-673.
- [217] SAID A, MAKKI S, MURET P, HUMBERT P, MILLET J  
Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study).  
J Dermatol Sci 1997 ; 14 :136-144.
- [218] SAMPSON J  
A method of replicating dry or moist surfaces for examination by light microscopy  
Nature 1961 ; 191 : 932 -933.
- [219] SANDOZ P, MARSAUT D, AMBRUSTER V, HUMBERT P, GHARBI T  
Towards objective evaluation of the skin aspect: principles and instrumentation  
Skin Res Technol2004; 10: 263-270.
- [220] SANTHANAM A MILLER M A , KASTING G B  
Absorption and evaporation of N, N-diethyl-m-Toluamide from human skin in vitro.  
Toxicol App Pharmacol 2004 ; 204: 81- 90.
- [221] SARKANY I  
Method for studying the microtopography of the skin.  
Br J Dermatol 1962 ; 74: 254 – 259.

- [222] SARKANY I., CARON G A  
Microtopography of the human skin. Studies with metal shadowed replicas from plastic impressions.  
J Anat 1965 ; 99 : 359 -364.
- [223] SARRET Y , NICOLAS J F , VERRANDO P SCHMITTD  
Dermo – epidermal junction : current update.  
Ann Dermatol Venereol 1994 ; 121 : 419 - 428 .
- [224] SARTORELLI P , ANDERSEN H R , ANGERER J , CORISH J et Coll  
Percutaneous penetration studies for risk assessment.  
Env Toxicol Pharmacol 2000; 8 : 133-152.
- [225] SARVEIYA V , RISK S , BENSON H.A E  
Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: application to in vivo assessment of skin penetration and systemic absorption in human.  
J Chromatography B 2004; 803 : 225- 231.
- [226] SAYLES RS, WAYTE RC, TWEE DALE PJ, BAISSOC BJ.  
The design construction and commissioning of an extensive prototype laser optical profilomètre.  
4<sup>th</sup> Int. Conf. On the Metrology and properties of engineering surfaces, Washington 1988.
- [227] SCALIA S RENDA A ,RUBERTO G ,BONINA F ,MANEGATTI E  
Assay of vitamin A Palmitate and vitamin E Acetate in cosmetic creams and lotions by supercritical fluid extraction and HPLC.  
J Pharmaceut Biomed Anal 1995 ; 13: 273 -277.
- [228] SCCP (Scientific committee on consumer products)  
Extended opinion on the safety evaluation of parabens.  
European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General 2005  
SCCP/0873/05. [Consulté le 20/ 09/ 2007] Disponible sur :  
[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_019.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_019.pdf)

- [229] SCCP (Scientific committee on consumer products).  
Opinion on basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, March 2006  
SCCP/0970/06. [Consulté le 20/ 09/ 2007] Disponible sur :  
[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_s\\_03.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_s_03.pdf)
- [230] SCCP (Scientific committee on consumer products)  
Opinion on parabens.  
Colipa N°P82; SCCP/1017/06 2006 b.  
[Consulté le 20/ 09/ 2007] Disponible sur :  
[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_sccp/docs/sccp\\_o\\_074.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_074.pdf)
- [231] SCHAEFER H , REDELMIER T E  
Skin barrier: Principles of percutaneous absorption.  
Basel: Karger; 1996. p 118-128.
- [232] SCHAEFER H , REDELMIER T E , BENECH – KIEFFER F  
Evalutaion de l'absorption transcutanée des ingrédients cosmétiques.  
Cosmétologie 1998 ; 18 : 35 – 39.
- [233] SCHAEFER H, ZESCH A, STUTTGENG G  
In: Skin permeability.  
Berlin : Springer –Verlag; 1982. p 896.
- [234] SCHEUPLEIN  
Mechanism of percutaneous absorption. Route of the penetration and the influence of solubility.  
J Invest Dermatol 1965 ; 45 : 334 -346.
- [235] SHAH M G , MAIBACH H I  
Estrogen and skin. An overview.  
Am J Clin Dermatol 2001; 2: 143-150.

- [236] SHAKIROV L G , ZOBOV P M , BIKKULOV A Z  
Synthèse de l'acide methyl-5-hydroxy-2benzoïque selon la réaction de Kolbe-Smitt.  
Z Prikl him 1983 ; 56 : 2644- 2647.
- [237] SHMITT R  
J Prakt Chem 1883; 31: 397.
- [238] SIMPSON J R  
Dermatitis due to parabens in cosmetic creams.  
Contact Dermatitis 1998; 4: 311-312.
- [239] SIRI MSDS (MATERIAL SAFETY DATA SHEET) INDEX (2007)  
[Consulté le 20/ 09/ 2007 ] Disponible sur :  
<http://www2.hazard.com/msds/index.php>
- [240] SIVASEGARAN K , HO L , MORAN K L , BANTSEEV V , SIVAK J G  
Dose-response of the cultured bovine lens to butyl, methyl and propyl parabens.  
Int J Cosmet Sc 2007; 29: 103-110.
- [241] SONI MG, BURDOCK GA, TAYLOR SL, GREENBERG NA  
Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature.  
F Chem Toxicol 2001; 39:513-32 .
- [242] SONI MG, CARABIN IG, BURDOCK GA  
Safety assesement of ester of p-hydroxybenzoic acid (paraben)  
F Chem Toxicol 2005; 43: 985-1015.
- [243] SONI M.G , TAYLOR S L , GREENBURG N A , BURDOCK G A  
Evaluation of the health aspects of methyl paraben.  
F Chem Toxicol 2002; 40: 1335-1373.

- [244] SOSTED H , RASTOGI S C , AANDERSEN K E , JOHANSEN J D, MENNE E T  
Hair dye contact allergy: quantitative exposure assessment of selected products and clinical cases.  
Contact Dermatitis 2004 ; 50: 344-348.
- [245] STEILING W , KREUTZ J , HAFFER H  
Percutaneous penetration/dermal absorption of hair dyes in vitro.  
Toxicology in vitro 2003 ; 15 : 565-570.
- [246] STIENS R  
La vérité sur les cosmétiques.  
Paris : Presses du Management ; 2001.
- [247] STOUGHTON R B  
Some bioassay methods for measuring percutaneous absorption.  
Advances in biology of skin 1972 : 12.
- [248] SULKOWSKA A  
Interaction of drugs with bovine and human serum albumin.  
J Molecul Struct 2002; 614: 227-232.
- [249] THOMSON ML, SUTARMAN A.  
The identification and enumeration of active sweat glands in man from plastic impressions of the skin.  
Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1953 ; 47 : 412.
- [250] TREGGAR R T  
Physical functions of skin.  
London: Academic press; 1966. p 185.
- [251] TUPKER R A, PINNAGODA J , COENRAADS P J NATER J P  
Influence of repeated exposure to surfactants on the human skin as determined by transepidermal water loss and visual scoring.  
Contact Dermatitis 1989 ; 20 :108-114.

- [252] VALVANI S C , YALKOWSKY S H , ROSEMANT T J  
Solubility and partitioning: Aqueous solubility and octanol- water partion coefficients of liquid nonelectrolytes.  
J Pharm Sci 1981; 70 : 502- 507.
- [253] VANAKISKI J et SEPPALAT  
Heat exposure and drugs.  
Clin Pharmacokinet 1998; 34: 311-322.
- [254] VAN DE SANDT JJ MEULING WJA , ELLIOTT G R , CNUBBEN N H P,  
HAKKERT BC.  
Comparative in vitro- in vivo percutaneous absorption of the pesticide exposure.  
Toxicol Sci 2000; 58:15- 22.
- [255] VAN DE SANDT JJ, et Coll.  
In vitro predications of skin absorption of caffeine, testosterone and benzoic acid: a multi-center comparaisn study.  
Regul Toxicol Pharmacol 2004 ; 39: 271- 281.
- [256] VENIER M, ADAMI G , LARESE F , MAINA G, RENZI N  
Percutaneous absorption of 5 glycol ethers through human skin in vitro.  
Toxicol In vitro 2004; 18: 665- 671.
- [257] VERMEER B J , REMAN F C , VAN GENT C M  
The determination of lipids and proteins in suction blister fluid.  
J Invest Dermatol 1975; 64: 190- 195.
- [258] VIATOUR M , HENRY F , PIERARD G E  
A computerized analysis of intrinsic forces in the skin.  
Clin Exp Dermatol 1995 ; 20: 308 -312.

- [259] VICKERS C F H  
Existence of reservoir in the stratum corneum.  
Arch Dermatol 1963 ; 88:21.
- [260] VIGAN M  
European regulatory guidelines for cosmetics.  
EMC- Dermatologie cosmetologie 2004 ; 1: 154- 163.
- [261] WAGNER G , GOLTZ RW  
Human cutaneous topography . A new photographic technique : Observations on normal skin).  
Cutis 1979 ; 23: 830 -842.
- [262] WAGNER H ,KOSTAKA K H , LEHR M ,ULRICH F ,SHAEFER H  
PH profiles in human skin: influence of two in vitro test systems for drug delivery testing.  
E J Pharm Biopharm 2003 ; 55: 57-56.
- [263] WAHLBERG J E  
Transepidermal or transfollicular absorption.  
Act Derm Venereol 1968 ; 48 :336 – 344.
- [264] WANG JJ, SANDERSON BJ, WANG H  
Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells.  
Mutat Res 2007 ; 628 : 99-106.
- [265] WESTER R C , MAIBACH H I  
Cutaneous pharmacokinetics: 10 steps to percutaneous absorption.  
Drug Metab Rev 1983; 14 : 169- 205.
- [266] WESTER R C , MELENDERS J , LONGAN F , MAIBACH HI  
Triple therapy: Multiple dosing enhances hydrocortisone percutaneous absorption in vivo in humans.  
In: SMITH E.W., MAIBACH H.I. Eds: Percutaneous penetration enhancers.  
Boca Raton : CRS Press; 1995. p 334- 349.

- [267] WESTER R C , NOONAN P K , MAIBACH H I  
Percutaneous absorption of hydrocortisone increases in long term administration. In-vivo study in Rhesus monkey.  
Arch Dermatol 1980; 116:186 – 188.
- [268] WILKINSON S C, WILLIAMS F M  
Effects of experimental conditions on absorption of glycol ethers through human skin in vitro.  
Int Arch Occup Environ Health 2002; 75: 519- 527.
- [269] WILLIAMS AC et BARRY BW  
Penetration enhancers.  
Adv Drug Deliv Rev 2003; 53: 603-618.
- [270] WILLIAMS FM  
In vitro studies- how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption?  
Env Toxicol Pharm 2006 ; 21:199- 203.
- [271] Williams FM  
Significance of metabolism occurring locally in the skin, for dermally absorbed chemicals.  
Toxi Lett 2006 ;164 S1 : S322-S323.
- [272] WOLF  
Das oderflächenrelief der menschlichen haut.  
Z Mikrosk Anat Frosch 1940 ; 47: 351.
- [273] ZATZ J L  
Factors in percutaneous absorption.  
CTFA Cosmet J 1983 ; 15 : 6.

- [274] ZATZ J L  
Fundamentals of transdermal controlled drug administration: physiochemical considerations.  
Drug Develop Ind Pharm 1983 ; 9: 561.

**Références Supplémentaires :**

- [ I ] MAKKI S, MURET P, RENAUD A, AACHE P, MAGNIN P  
Simple equilibrium dialysis- high – performance liquid chromatographic method for the in vitro assessment of 5-methoxypsoralen bound to human albumin.  
J Chrom 1991; 539: 443- 448.
- [II ] MARY S, MURET P, MAKKI S, JOURDANT M, BELON J P,KANTELIP J P,HENRY JC, HUMBERT P  
Assessment of the recovery of three lipophilic Psoralens by microdialysis: an in vitro study  
I J Pharm 1998; 161: 7-13.
- [III] LNP  
Les Nouvelles Pharmaceutiques : la lettre : bulletin de l'Ordre des pharmaciens  
Loi «paquet médicament» publiée.  
LNP 2007 ; 335 : Jeudi 15 mars 2007.

---

## LISTE DE FIGURES

---

Figure 1 : Schéma de la peau présentant ses constituants essentiels .....	32
Figure 2 : Structure de l'épiderme .....	33
Figure 3 : Photographie montrant les sillons primaires .....	35
Figure 4 : Le follicule pileux et la glande sébacée forme l'appareil pilo-sébacé.....	38
Figure 5 : La structure du microrelief cutané .....	45
Figure 6 : Réalisation d'une empreinte négative (a) puis d'une empreinte positive (b).....	49
Figure 7 : Schéma représentant le principe du système de mesure par triangulation.....	53
Figure 8 : Schéma représentant le principe de l'analyse d'une surface .....	54
Figure 9 : Schéma de la microscopie à refocalisation .....	54
Figure 10 : Principe de la microscopie laser à refocalisation.....	55
Figure 11 : Schéma de la microscopie confocal représentant .....	56
Figure 12 : Schéma représentant le principe de l'aberration chromatique.....	57
Figure 13 : Schéma représentant la microscopie confocal à aberration chromatique.....	58
Figure 14 : Principe du balayage.....	59
Figure 15 : Acquisition d'une image du microrelief cutané.....	59
Figure 16 : Illustration de la méthode des ombrages.....	60
Figure 17 : Schéma du principe de mesure du microrelief par un profilométrie de transmission....	60
Figure 18 : Schéma de la méthode par projection de Franges .....	61
Figure 19 : Représentation de la diffusion intracellulaire et intercellulaire à travers le SC. ....	64
Figure 20 : Les voies de passages des substances à travers la peau humaine.....	65
Figure 21 : Schéma représentatif de la Cellule de Franz.....	74
Figure 22 : Schéma de l' HPLC.....	78
Figure 24 : Synthèse de l'acide 2-hydroxybenzoïque .....	82
Figure 25 : Confection d'une réplique négative à l'aide de Silflo® .....	100
Figure 26 : Réplique négative de l'avant bras d'une femme de 25 ans. ....	101
Figure 27 : Réplique positive de l'avant bras d'une femme de 25 ans.....	102
Figure 28 : Image d'une réplique positive de l'avant bras d'une femme de 25 ans par MEB.....	102
Figure 29 : Le système de Profilomètre mécanique .....	103
Figure 30 : Le capteur de rugosité, palpeur à pointe de diamant.....	104
Figure 31 : Profil obtenu par profilométrie mécanique .....	105
Figure 32 : Image en 3D représentant la surface de la peau (Succession de profil).....	105
Figure 33 : Réalisation de mesure in vivo par projection de franges .....	106
Figure 34 : Les cellules de Franz durant les expériences .....	119
Figure 35 : Chromatographe d' HPLC des parabènes dans une solution méthanol/ eau.....	120
Figure 36 : Chromatogramme de l'analyse des parabènes dans le fluide récepteur (G1).....	122
Figure 37 : Pourcentage de passage des parabènes (G1) après 36 heures .....	123
Figure 38 : Superposition des chromatogrammes après 3 dépôts .....	123
Figure 39 : Pourcentage de passage des parabènes (G2) après 36 heures. ....	124
Figure 41 : Une comparaison des quantités des parabènes dans le fluide récepteur.....	126
Figure 42 : Passage des quatre parabènes durant 36 heures en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .....	130

---

## LISTE DE TABLEAUX

---

<i>Tableau 1 : Taux en pourcentage de la sécurité des substances utilisées dans les cosmétiques .....</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 2 : Les effets indésirables de certaines molécules cosmétiques.....</i>	<i>17</i>
<i>Tableau 3 : Epaisseur du stratum corneum en fonction du site anatomique.....</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 4 : L'utilisation des cellules de diffusion dans les études de pénétration cutanée. ....</i>	<i>74</i>
<i>Tableau 5 : L'utilisation de l'HPLC dans la quantification des substances.....</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 6 : Résultats de l'analyse par profilométrie mécanique .....</i>	<i>105</i>
<i>Tableau 7 : Moyenne des paramètres durant les quantifications pour les mesures in vivo.....</i>	<i>107</i>
<i>Tableau 8 : Moyenne des paramètres durant les quantifications pour les mesures in vitro (RP) ..</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 9 : Comparaison des mesures obtenues in vivo et réplique négative (RN) .....</i>	<i>109</i>
<i>Tableau 10 : Comparaison entre les mesures réalisées par profilométrie mécanique (RP) et Projection de Franges (RN et in-vivo).....</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 11 : Solubilités des parabènes dans l'eau en mg / ml.....</i>	<i>115</i>
<i>Tableau 12 : Polarité des parabènes.....</i>	<i>116</i>
<i>Tableau 13 : Pourcentage de chaque parabène dans la lotion corporelle.....</i>	<i>121</i>
<i>Tableau 14 : Résultats de passage des parabènes durant .....</i>	<i>122</i>
<i>Tableau 15 : Résultat du passage cutané des parabènes .....</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 16 : Quantité de parabènes récupérée dans le fluide récepteur.....</i>	<i>129</i>
<i>Tableau 17 : Pourcentage de quantité des parabènes sur la surface et celles de leur passage à travers les couches derme-épidermiques dans une solution saline de HSA).....</i>	<i>129</i>
<i>Tableau 18 : Tableau de comparaison de la quantité de parabènes cumulées dans le.....</i>	<i>132</i>
<i>Tableau 19 : Comparaison des mesures obtenues par Profilométrie et la littérature . ....</i>	<i>137</i>
<i>Tableau 20 : Différentes études de toxicité de quelques molécules utilisées en cosmétologie.....</i>	<i>141</i>
<i>Tableau 21 : Comparaison des valeurs de polarité des parabènes.....</i>	<i>143</i>
<i>Tableau 22 : Tableau de comparaison entre les différentes études de passage de parabènes à travers différentes membranes.....</i>	<i>145</i>

# *Table de matières*

---

# TABLE DE MATIERES

---

SOMMAIRE.....	13
LISTE DES ABREVIATIONS .....	14
Preface .....	16
Objectif de la these .....	18
1.1. Historique et legislation des produits cosmétiques.....	22
1.1.1. Historique des produits cosmétiques .....	23
1.1.2. La Législation des Produits cosmétiques.....	24
1.1.2.1. Définition d'un produit cosmétique.....	24
1.1.2.2. Innocuité des cosmétiques .....	24
1.1.2.3. Liste des produits considérés comme produits cosmétiques.....	25
1.1.2.4. Réglementations des médicaments et des produits barrières.....	26
1.1.2.4.1. Les médicaments.....	26
1.1.2.4.2. Les produits barrières.....	27
1.1.2.5. Efficacité et législation .....	29
1.2. La peau humaine.....	31
1.2.1. Structure de la peau humaine.....	32
1.2.1.1. L'épiderme.....	33
1.2.1.1. Microrelief cutané.....	35
1.2.1.3. La Jonction Dermo-Epidermique.....	36
1.2.1.4. Le derme .....	36
1.2.1.5. Hypoderme ou tissu sous-cutané .....	37
1.2.1.6. Les annexes de la peau humaine.....	37
1.2.1.6.1. Système pilo-sébacé.....	37
1.2.1.6.2. Glandes sudorales .....	39
1.2.2. Quelques fonctions essentielles de la peau humaine .....	40
1.3. Techniques de quantification du microrelief cutané.....	43
1.3.1. Le Microrelief Cutané de la peau humaine.....	44
1.3.2. Méthodes qualitatives .....	46
1.3.2.1. L'observation .....	46
1.3.2.2. Le microscope optique (MO).....	47
1.3.2.3. Microscope électronique à balayage (MEB).....	47
1.3.3. Méthodes quantitatives .....	48
1.3.3.1. Technique des empreintes cutanées.....	48
1.3.3.1.1. L'empreinte négative .....	49
1.3.3.1.2. L'empreinte positive .....	49
1.3.3.2. Méthodes mécaniques.....	50
1.3.3.2.1. Profilométrie .....	50
1.3.3.2.2. Surfométrie .....	51
1.3.3.2.3. SkinChip® .....	51
1.3.3.3. Les Méthodes optiques .....	52

1.3.3.3.1. La Microscopie Triangulaire.....	52
1.3.3.3.2. La Microscopie à Défocalisation .....	53
1.3.3.3.3. La Microscopie Laser à Refocalisation.....	54
1.3.3.3.4. La Microscopie Confocale en Lumière Blanche et à Balayage Laser .....	55
1.3.3.3.5. La Microscopie Confocale à Abération Chromatique .....	57
1.3.3.3.6. La Méthode d’Ombrage (Shadow Casting) .....	59
1.3.3.3.7. Profilométrie de Transmission.....	60
1.3.3.3.8. La Méthode par Projection de Franges .....	60
1.4. l’absorption cutanée .....	63
- Transcellulaire ou transcornéocytaire .....	64
- Intercellulaire .....	64
1.4.1. Mécanisme de l’absorption cutanée.....	66
1.4.2. Facteurs influençant la pénétration cutanée.....	67
1.4.2.1. La peau.....	67
La région .....	67
La race.....	67
Le sexe .....	67
L’âge.....	67
L’intégrité de la peau .....	68
L’hydratation et occlusion .....	68
Le pH .....	69
La Température.....	69
1.4.2.2. La formulation .....	69
La forme galénique .....	69
La fonction réservoir du S.C.....	70
Les accélérateurs d'absorption .....	70
1.4.2.3. Nature du principe actif .....	71
1.4.3. Méthodes d’évaluation cutanée des produits topiques.....	72
1.4.3.1. Les méthodes ex-vivo .....	72
1.4.3.1.1. Les cellules de Franz.....	72
1.4.3.1.2. La dialyse d’équilibre .....	72
1.4.3.2. Les méthodes in-vivo.....	73
1.4.3.2.1. Les bulles de succion .....	73
1.4.3. 2.2. Les biopsies.....	73
1.4.3. 2.3. La méthode de stripping.....	73
1.4.3. 2.4. La méthode des différences .....	73
1.4.3. 2. 5. La microdialyse.....	73
1.4.4. Les Cellules de Franz.....	74
1.4.4.1. Principe des Cellules de Franz .....	75
a) La membrane .....	75
b) La phase réceptrice .....	75
c) Expérimentations .....	76
1.4.5. Quantification des molécules après passage cutané.....	77

1.5. les parabènes .....	80
1.5.1. Propriétés physicochimiques des parabènes .....	82
1.5.1.1. Synthèse des parabènes .....	82
1.5.1.2. Méthyl parabène (MP) .....	83
1.5.1.3. Ethyl parabène (EP) .....	83
1.5.1.4. Propyl parabène (PP) .....	84
1.5.1.5. Butyl parabène (BP).....	84
1.5.2. Utilisation des parabènes .....	84
1.5.3. Pharmacocinétique des parabènes.....	86
1.5.4. Réglementation de l'utilisation des Parabènes .....	87
1.5.5. Les effets secondaires des parabènes.....	89
1.5.5.1. Les parabènes sont allergisants.....	89
1.5.5.2. Les parabènes ont une activité oestrogénique (estrogen-like activity) .....	89
1.5.5.3. Les parabènes ont un effet spermato-toxique .....	90
1.5.5.4. Les parabènes sont-ils cancérigènes ?.....	90
1.5.5.5. Le méthyl parabène et le soleil .....	90
1.5.5.6. L'effet du méthyl parabène sur les kératinocytes du Stratum Corneum.....	91
1.5.5.7. Les parabens inhibent l'activité cutanée humaine de l'estrogène sulfortransferase .....	91
1.5.5.8. Les méthyl-, propyl- et butyl-parabène peuvent provoquer une irritation oculaire.....	91

## **Partie 2: Travaux personnels**

INTRODUCTION .....	95
2.1. Comparaison de techniques de quantification du relief cutané .....	98
2.1.1. Confection des répliques.....	100
2.1.1.1. Les Répliques Négatives (RN).....	100
2.1.1.2. Les Répliques Positives (RP).....	101
2.1.2. Etudes qualitatives .....	102
2.1.3. Etudes quantitatives .....	103
2.1.3.1. Profilométrie mécanique.....	103
2.1.3.1.1. Analyse et résultats par Profilomètre.....	104
2.1.3.2. Projection de Franges.....	106
2.1.3.2.1. Les mesures in vivo .....	107
2.1.3.2.1.1. Résultats des mesures in vivo .....	107
2.1.3.2.2. Les mesures in vitro .....	108
2.1.3.2.2.1. Résultats pour les mesures in vitro: .....	108
2.1.4. Conclusion .....	109
2.1.4.1. Résultats du Profilomètre.....	109
2.1.4.2. Comparaison des deux méthodes de la technique de Franges .....	109
2.1.4.2. Comparaison des résultats des différentes techniques .....	110

2.2. Contrôle du passage cutané des parabènes utilisés en PDC .....	112
2.2.1. L'influence de la polarité des parabènes sur leur passage cutané.....	113
2.2.1.1. Détermination de la polarité des parabènes .....	115
2.2.1.1.1. La technique HPLC.....	115
2.2.1.1.2 Solubilité des parabènes.....	115
2.2.1.1.3. Polarité des parabènes.....	115
2.2.1.2. Conclusion .....	116
2.2.2. Evaluation du passage cutané des principaux parabènes utilisés dans les PDC .....	117
2.2.2.1. Matériels .....	118
2.2.2.1.1. Substances chimiques .....	118
2.2.2.1.2. La peau.....	118
2.2.2.1.3. Cellules de Franz.....	118
2.2.2.2. Méthodes.....	119
2.2.2.2.1. Quantification par HPLC .....	120
2.2.2.2.2. Quantification des parabènes dans le produit cosmétique .....	120
2.2.2.2.3. Quantification des parabènes du milieu récepteur (BSA).....	121
2.2.2.3. Résultats.....	122
2.2.2.3.1. Groupe expérimental 1 (G1).....	122
2.2.2.3.2. Groupe expérimental 2 (G2).....	123
2.2.2.4. Conclusion .....	125
2.2.3. Conditions optimales pour une meilleure évaluation du passage cutané des PDC.....	127
2.2.3.1. Matériels .....	128
2.2.3.1.1. Substances chimiques .....	128
2.2.3.1.2. Peau Humaine .....	128
2.2.3.1.3. Cellules de Franz.....	128
2.2.3.2. Méthodes.....	128
2.2.3.2.1. Passage cutané avec cellules de Franz .....	128
2.2.3.2.2. Lavage de la surface de la peau .....	128
2.2.3.2.3. Quantification par HPLC .....	129
2.2.3.3. Résultats.....	129
2.2.3.4. Conclusion .....	130

2.3. Discussion générale .....	135
2.3. L'utilisation courante des PDC et les législations Européennes et Internationales .....	136
2.3.1. Une efficacité à confirmer pour les PDC .....	136
2.3.1.1. Perspectives.....	138
2.3.2. La sécurité est indispensable pour les PDC .....	139
2.3.2.1. Notre point de vue sur les parabènes .....	142
2.3.2.1.1. Etudes de solubilité et de polarité des Parabènes.....	142
2.3.2.1.2. Etudes du passage cutané des Parabènes après une et plusieurs applications d'un PDC .....	143
2.3.2.1.3. Conditions optimales pour une meilleure évaluation du passage cutané des Parabènes .....	144
2.3.2.1.4. Propositions pour diminuer le passage dermique des Parabènes.....	146
2.3.3. Conclusion générale.....	149
 Annexes .....	 151
Annexe 1 : Législations Internationales.....	152
Annexe 2 : Effets secondaires des Parabènes .....	161
Annexe 3 : Liste des tableaux d'étalonnages et chromatographes .....	166
Annexe 4 : Une campagne pour des cosmétiques sécurisés .....	173
Annexe 5 : Comment conserver sans parabènes ? .....	175
Annexe 6 : Publications .....	176
Annexe 6.1.: Assessment of principal parabens .....	176
Annexe 6.2.: Do some chemicals in cosmetics generate toxicity!?	183
Annexe 6.3.: Is it a Cosmetic or a Cosmeceutical?.....	183
 Références.....	 190
 Liste de Figures.....	 228
 Liste de Tableaux.....	 229
 Table de matières .....	 231