UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE « Santé, Sciences Biologiques et Chimie du vivant »

EA6295 « NanoMédicaments et NanoSondes »

THÈSE présentée par :

Hichem KICHOU

Soutenue le : **29 septembre 2023**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Chimie Analytique

Approches chromatographiques et spectroscopiques appliquées à l'étude de la pénétration d'actifs dans la peau

THÈSE dirigée par :

Mme MUNNIER Emilie	Professeur des universités, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme BOLZINGER Marie-Alexandrine	Professeur des universités, Université de Lyon 1
M PIOT Olivier	Professeur des universités, Université de Reims

---

JURY :

Président : Mme BOUDESOCQUE-DELAYE Leslie	Professeur des universités, Université de Tours
Mme MICHAEL-JUBELI Rime	Maitre de conférences, Université Paris-Saclay
Mme MUNNIER Emilie	Professeur des universités, Université de Tours
M CHOURPA Igor	Professeur des universités, Université de Tours

MEMBRES INVITES :

M BONNIER Franck	Docteur HDR, LVMH Recherche
M GILLET Guillaume	Docteur, Génialis

TABLES DES MATIÈRS

REMERCIMENTS……7

RESUME……....9

ABSTRACT……...10

LISTE DES FIGURES……11

LISTE DES TABLEAUX……12

LISTE DES ACRONYMES……13

INTRODUCTION GENERALE……15

LISTE DES PUBLICATIONS……19

I. La diffusion cutanée : méthodes bio-analytiques (in vitro & in vivo) et considérations réglementaires 23

I.1 La peau et sa fonction barrière : 23

I.1.1 Le Stratum Corneum (SC) : la barrière principale de la peau : 24

I.1.1.1 La Composition du SC : 24

I.1.1.2 Facteur d'hydratation naturel (NMF) : 25

I.1.1.3 Le film hydrolipidique : 26

I.1.1.4 Dysfonctionnement de la fonction barrière : 26

I.1.1.5 Les principales voies de diffusion cutanée : 26

I.1.2 L'Épiderme Viable : 27

I.1.3 Derme et hypoderme : 28

I.1.4 Follicules pileux : 29

I.1.5 Glandes sudoripares et sébacées : 29

I.2 La diffusion cutanée : 30

I.2.1 Lignes directrices et considérations législatives des tests de diffusion cutanée 30

I.2.1.1 L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) : 30

I.2.1.2 L'Agence Européenne des Médicaments (EMA) : 32

I.2.1.3 La Food and Drug Administration (FDA)..... 32

I.2.2 Facteurs influençant la diffusion cutanée : 33

I.2.3 Mesure de la perméation et de la pénétration cutanée..... 33

I.2.3.1 Mesures in vivo 33
I.2.3.2 Mesures de la perméation in vitro 35
I.2.3.3 Mesures de la pénétration in vitro 37
I.2.4 Les modèles de peaux utilisés pour les tests de perméation et de pénétration : Avantages et limites 38
I.2.4.1 Les explants de peau 38
I.2.4.2 Les modèles équivalents à la peau humaine (HSE) : 39
I.2.4.3 Les modèles de peaux synthétiques : 41
I.2.5 Modélisation et représentation mathématique de la diffusion cutanée 43
I.3 Techniques analytiques pour la quantification de la perméation et de la pénétration cutanée 47
I.3.1 La chromatographie en phase liquide 47
I.3.1.1 Principe de la Chromatographie Liquide 47
I.3.1.2 La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) : 48
I.3.1.3 Les différents types de chromatographie en phase liquide 48
I.3.1.4 Les différentes phases stationnaires : 49
I.3.1.5 Appareillages et fonctionnement : 50
I.3.1.6 Grandeurs caractéristiques en chromatographie : 53
I.3.2 La Spectroscopie Raman 54
I.3.2.1 Principe 55
I.3.2.2 Appareillage et fonctionnement 56
I.3.3 Avantages de la Micro-spectroscopie Raman Confocale (CRM) 59
I.3.3.1 La micro-spectroscopie Raman pour la caractérisation biochimique de la peau 60
I.3.3.2 La micro-spectroscopie Raman appliquée à la pénétration et la perméation cutanée 63
I.3.4 Traitement de données : prétraitement et analyse multivariée : 66
I.3.4.1 Les méthodes de prétraitement : 67
II. Mise au point au laboratoire d'une approche bio-analytique pour l'objectivation de produits cosmétiques 73
II.1 Contexte : 73
II.1.1 Les objectifs scientifiques du projet sont les suivants : 74
II.2 Introduction : 74
II.3 Objectifs : 75
II.4 Développements méthodologiques : 76

II.4.1 Développements liés à la méthode CLHP 76
II.4.2 Développements liés à la méthode du Tape stripping 77
II.5 Résultats : 78
II.6 Conclusion 79
II.7 #Article N°1: Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin 80
II.8 #Article N°2: Efficiency of emulsifier-free emulsions in delivering caffeine and α-tocopherol to human skin 90
III. Approche analytique multi-techniques sur modèles de peau : influence de la formule et du modèle utilisé sur la perméation cutanée 107
III.1 Contexte : 107
III.2 Introduction 108
III.3 Objectifs : 109
III.4 Développements méthodologiques : 110
III.4.1 Développements liés à la quantification de la résorcine par HPLC/DAD 110
III.4.2 Développements liés à l'analyse des lipides par HPLC/MS^n 111
III.4.3 Développements liés à l'analyse par CRM 111
III.5 Matériels et méthodes : 112
III.6 Résultats : 113
III.7 Conclusion 114
III.8 #Article 3: Strat-M® positioning for skin permeation studies: A Comparative Study including EpiSkin® RHE, and Human Skin 116
IV. Stockage des modèles de peau reconstruits : limitations, conséquences et solution 150
IV.1 Etude 1 : Impact de la congélation sur la fonction barrière de l'épiderme humain reconstruit Episkin® 151
IV.1.1 Objectif : 151
IV.1.2 Développements méthodologiques : 151
IV.1.3 Matériels et méthodes : 151
IV.1.4 Résultats : 152
IV.1.5 Conclusion 153

IV.1.6 #Article 4: Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation 153
IV.2 Etude 2 : Impact de la fixation à la formaline sur des modèles d'épidermes humains reconstruits pour les études de perméation : Une preuve de concept 173
IV.2.1 Contexte : 173
IV.2.2 Introduction 173
IV.2.3 Objectif : 174
IV.2.4 Développements méthodologiques : 174
IV.2.5 Développements liés au protocole de fixation 174
IV.2.6 Développements liés à l'analyse par CRM 175
IV.2.7 Matériels et méthodes : 176
IV.2.8 Résultats : 176
IV.2.9 Conclusion : 177
IV.2.10 #Article 5:Formalin fixation of reconstructed human epidermis skin models prior to in vitro permeability studies: A proof of concept using caffeine 179
V. Apport de la micro-spectroscopie Confocale Raman pour l'objectivation sur peau humaine 206
V.1 Etude 1 : Estimation des performances analytiques de la spectroscopie Raman pour la quantification de la résorcine dans le Stratum Corneum humain 208
V.1.1 Objectif : 208
V.1.2 Développements méthodologiques : 208
V.1.3 Matériels et méthodes : 209
V.1.4 Équations mathématiques utilisées pour le calcules des performances analytiques : 210
V.1.5 Résultats : 213
V.1.5.1 Validation du protocole de préparation des échantillons : 213
V.1.5.2 Caractérisation spectrale du stratum corneum humain et de la résorcine par microscopie Raman confocale (CRM) : 213
V.1.5.3 Analyse des données par ACP : 213
V.1.5.4 L'analyse des données par les AUC (aires sous la courbe) 214
V.1.5.5 L'analyse des données par PLSR 215
V.1.6 Conclusion 216
V.1.7 #Article 6: Estimating the Analytical Performance of Raman Spectroscopy for Quantification of Active Ingredients in Human Stratum Corneum 217
V.2 Etude 2 : Impact de l'analyse par Micro-spectroscopie Confocale Raman sur la fonction barrière de la peau humaine 238

V.2.1 Contexte et motivation 238
V.2.2 Introduction 238
V.2.3 Matériels et Méthodes 241
V.2.3.1 Réactifs : 241
V.2.3.2 Les biopsies de peau humaine : 241
V.2.3.3 Expériences de perméation : 242
V.2.3.4 Expériences de perméation de la caféine : 242
V.2.3.5 Préparation de la peau pour l'analyse CRM : 243
V.2.3.6 Bilans de masse : 243
V.2.3.7 Analyse par HPLC-DAD : 243
V.2.3.8 Microscopie Confocale Raman (CRM) : 244
V.2.3.9 Analyse des données de perméation : 245
V.2.4 Résultats et Discussion 246
V.2.4.1 Mesures de la perte insensible en eau transépidermique 246
V.2.4.2 Expériences de perméation de la caféine 249
V.2.5 Conclusion 258
V.2.6 Références 259
VI.CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES 263
VI.1 Les axes de recherche 263
VI.2 Résultats et perspectives de l'axe 1 : 264
VI.3 Résultats et perspectives de l'axe 2 : 266
VI.4 Résultats et perspectives de l'axe 3 : 267
VI.5 Résultats et perspectives de l'axe 4 : 268
REFERENCES.....271

REMERCIMENTS

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude envers la Pr. Marie-Alexandrine Bolzinger et le Pr. Olivier Piot pour avoir accepté de jouer le rôle de rapporteurs dans ma thèse et d'avoir fait partie du jury. Je tiens également à remercier sincèrement tous les membres du jury, le Pr. Leslie Boudesocque-Delaye, le Dr. Rime Michael-Jubeli, le Pr. Emilie Munnier, le Pr. Igor Chourpa, ainsi que les membres invités Dr. Franck Bonnier et le Dr. Guillaume Gillet, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je voudrais également exprimer ma reconnaissance envers le Pr. Igor Chourpa pour m'avoir chaleureusement accueilli au sein du laboratoire EA 6295 NanoMédicaments et NanoSondes (NMNS), dont il est le directeur d'équipe. Sa vision scientifique, son expertise et ses conseils précieux ont été d'une grande valeur pour moi tout au long de cette aventure de recherche.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers ma directrice de thèse, la Pr. Emilie Munnier, pour son encadrement attentif, son enseignement de qualité et ses conseils éclairés qui ont joué un rôle essentiel dans l'élaboration de ma thèse. Son soutien constant et sa disponibilité ont été des atouts précieux qui m'ont permis de progresser dans mes travaux et d'atteindre mes objectifs.

Je souhaite également remercier le Dr. Franck Bonnier pour son apprentissage attentif, ses conseils avisés et sa disponibilité à toute heure, y compris les week-ends. Les mots me manquent pour exprimer ma gratitude envers lui.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers le Dr. Yuri Dancik pour son encadrement minutieux, en particulier dans les tests de diffusion cutanée, ainsi que pour son aide dans la rédaction des publications.

Un grand merci à l'équipe Lipides : Systèmes analytiques et biologiques (LipSYS²) de l'université de Paris Saclay, en particulier à Ali, Rime et Joudi, pour leur précieuse aide et leurs contributions à la réalisation de mes travaux de thèse.

J'aimerais également remercier chaleureusement tous les membres du laboratoire, Martin, Katel, Stéphanie, Emilie, Xavier et Jean-François, pour leur soutien constant, leur conseil et leur disponibilité tout au long de ma thèse.

Un grand merci à Ayyoub, mon coéquipier, mon ami, pour nos discussions scientifiques et bien plus encore, pour les moments de partage et les allers-retours à la salle de sport.

Je remercie aussi, Amanda qui nous a rejoint l'année dernière et qui m'a beaucoup aidé sur la fin de cette thèse sur le plan scientifique et morale.

Je tiens également à remercier Louise, comme tu l'as mentionné dans ta thèse, "qui aime bien châtie bien", c'est donc l'occasion de te retourner le compliment.

Mes plus sincères remerciements vont à ma famille, mes parents et mes deux petits frères, qui m'ont encouragé tout au long de cette thèse. Leur soutien moral, leurs encouragements et leur compréhension ont été une source d'inspiration et de motivation inestimable. Je voudrais rendre hommage à une nouvelle recrue au sein de ma famille, à toi ma chérie, qui m'a apporté un immense bonheur et m'a encouragé tout au long de cette thèse.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers la région Centre-Val de Loire pour avoir financé mon projet de thèse.

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à toutes les personnes mentionnées ci-dessus, ainsi qu'à toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse. Votre soutien et votre confiance m'ont permis de mener à bien ce projet de recherche et de grandir en tant que scientifique.

Un immense merci à tous pour votre précieuse contribution à ma thèse…

RESUME

La peau joue un rôle fondamental en tant que barrière protectrice contre les agressions extérieures. Cependant, pour évaluer l'efficacité des produits dermatologiques et cosmétiques, il est essentiel de comprendre la capacité des ingrédients actifs (IA) à pénétrer et/ou traverser la peau. Les tests de diffusion cutanée sont des méthodes indispensables pour étudier cette interaction entre la peau et les produits pharmaceutiques ou cosmétiques et mesurer la pénétration et la perméation des IA. À l'heure actuelle, menés selon les recommandations des autorités compétentes, ces tests ne fournissent que des informations partielles sur la biodisponibilité des IAs et leur distribution dans les différentes couches de la peau. Les objectifs principaux de cette thèse sont les suivants : (i) développer une approche analytique multi-techniques pour répondre aux besoins d'objectivation des produits cosmétiques, afin de déterminer les profils et les cinétiques de pénétration des IA, et d'étudier les interactions moléculaires au niveau de la peau, (ii) évaluer les avantages et les performances analytiques de la micro-spectroscopie confocale Raman (CRM) en tant que technique non invasive et polyvalente appliquée à la peau. Une approche bio-analytique a donc été mise en place pour l'objectivation des produits cosmétiques. Elle combine l'approche classique utilisant les cellules de diffusion de Franz associée à la chromatographie liquide haute performance, et différentes techniques analytiques, telles que la micro-spectroscopie confocale Raman utilisée comme outil de caractérisation, et l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse utilisée comme outil d'analyse des lipides. Les travaux de cette thèse ont permis d'étudier les dynamiques moléculaires et les interactions entre les formulations et la peau dans divers modèles de peau, tels que le modèle synthétique Strat-M®, le modèle reconstruit EpiSkin® et les explants de peau humaine. De plus, ils ont mis en évidence l'effet du stockage sur la fonction de barrière des EpiSkin®. Enfin, les performances analytiques de la microspectroscopie confocale Raman (CRM) appliquée à la peau ont été estimées pour la première fois, en utilisant un modèle in vitro de stratum corneum humain isolé, permettant de contrôler la quantité d'actif dans le SC et d'établir une courbe d'étalonnage par des approches chimiométriques multivariées, pour mettre en place une approche quantitative par CRM. En conclusion, les travaux de cette thèse ont démontré la complémentarité des différentes techniques analytiques pour l'objectivation des produits cosmétiques, ainsi que l'apport de la CRM associée à la chimiométrie appliquée à la peau humaine.

Mots clés : Tests de diffusion cutanée, Approche bioanalytique multi-techniques, Microspectoscopie Cofocale Raman, Chimiométrie, modèles de peaux, Produits topiques.

ABSTRACT

The skin plays a fundamental role as a protective barrier against external aggressions. However, to assess the effectiveness of dermatological and cosmetic products, it is essential to understand the capacity of active ingredients (AI) to penetrate and/or cross the skin. Skin diffusion tests are indispensable methods for studying this interaction between the skin and pharmaceutical or cosmetic products, and for measuring the penetration and permeation of AI. Currently, conducted according to the recommendations of competent authorities, these tests only provide partial information on the bioavailability of AIs and their distribution in the different layers of the skin. The main objectives of this thesis are as follows: (i) to develop a multi-technique analytical approach to meet the needs of cosmetic product assessment, in order to determine the profiles and kinetics of AI penetration and study molecular interactions at the skin level, (ii) to evaluate the advantages and analytical performance of confocal Raman microspectroscopy (CRM) as a non-invasive and versatile technique applied to the skin. A bio-analytical approach has been implemented for the evaluation of cosmetic products. It combines the classical approach using Franz diffusion cells associated with high-performance liquid chromatography, and various analytical techniques such as confocal Raman microspectroscopy used as a characterization tool, and HPLC coupled with mass spectrometry used as a lipid analysis tool. The work of this thesis has allowed the study of molecular dynamics and interactions between formulations and the skin, in various skin models, such as the synthetic Strat-M® model, the reconstructed EpiSkin® model, and human skin explants. Moreover, it has highlighted the effect of storage on the barrier function of EpiSkin®. Finally, the analytical performance of confocal Raman microspectroscopy (CRM) applied to the skin has been estimated for the first time, using an in vitro model of isolated human stratum corneum, allowing the control of active ingredient quantity in the SC and the establishment of a calibration curve through multivariate chemometric approaches, to implement a quantitative approach using CRM. In conclusion, the work of this thesis has demonstrated the complementarity of different analytical techniques for the assessment of cosmetic products, as well as the contribution of CRM associated with chemometrics applied to human skin.

Keywords : Skin diffusion tests, multi-technique bioanalytical approach, Confocal Raman Microspectroscopy, Chemometrics, skin models, topical products.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure de la peau [2–5]. 23
Figure 2: Les principales voies de diffusion cutanée [23] 27
Figure 3: (A) Schéma représentatif d'une cellule de Franz. (B) schéma représentatif du dispositif qui permet de chauffer et d'agiter la cellule de Franz. (Https://permegear.com/franz-cells/). 36
Figure 4: Coupes histologiques (HE) d'un modèle d'épiderme reconstruit (EpiSkin®) et d'un explant de peau humaine (coloration à l'hématoxyline-éosine) [87]. 40
Figure 5: Image représentative (10x) d'une coupe au cryomicrotome montrant les différentes couches (A, B, C) d'une membrane Strat-M®. 42
Figure 6: *Représentation schématique de la diffusion dans et à travers le Stratum Corneum (SC) [100].* 44
Figure 7: Représentation graphique du flux à l'état stationnaire (JSS) et du temps de latence (tlag) sur une courbe d'évolution de masses cumulée en fonction du temps. 47
Figure 8: Schéma représentative d'appareillage de chromatographie à haute performance (HPLC). 52
Figure 9: Phénomènes de diffusion de photons. 55
Figure 10: Diagramme de Jablonski mettant en évidence les différences entre les différents phénomènes de diffusion de photons. 56
Figure 11: Représentation schématique des principaux composants du micro-spectromètre Raman. 57
Figure 12: Schéma représentant le principe de confocalité. 59
Figure 13: (a) Spectre représentatif de la peau humaine (a) dans la région d'empreintes digitales (400-1800 cm^{-1}). (b) dans la région de haut nombre d'ondes (2500-3600 cm^{-1}). 60
Figure 14: Configuration d'un microscope inversé pour les mesures CRM in vivo [126]. 65
Figure 15: Utilisation de l'algorithme de Lieber et Mahadevan pour prétraiter des spectres enregistrés à partir d'explants de peau humaine. 68
Figure 16: ACP réalisée sur des spectres Raman de peau humaine. (A) nuages de points des scores de CP1 et CP2. (B) Loading de CP1. 69
Figure 17: Organisation des données avant la régression PLSR [155]. 70
Figure V 1: *Schéma représentant l'expérience de perméation de la caféine.* 243
Figure V2: *Représentation schématique d'un profilage en profondeur du GEN-2 SCA Skin [1].* 245
Figure V3 *: Perte insensible en eau Trans-Épidermique (TEWL) mesurées avant et après exposition au laser sur les Donneur 1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et Donneur 6. Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart-type (n=3).* 248
Figure V4: *Masses cumulées de caféine à travers les peaux contrôles et exposées au laser en fonction du temps pour les 6 donneurs (Donneur 1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et Donneur6). Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart-type (n=4).* 251
Figure V5: *Ratios de masses cumulées après 6h de perméation des peaux exposées au laser et les peaux contrôles (considérées comme 100%) pour le Donneur1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et le Donneur 6. Les données sont présentées en moyennes ± écart-type (n=4).* 252
Figure V6: *Masse de caféine récupérée dans les peaux contrôles et exposées au laser pour le Donneur1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et Donneur 6. Les valeurs sont présentées en moyennes ± écart-type (n=4).* 257

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les différentes types de chromatographie en phase liquide et leurs principes de fonctionnement……..50

Tableau II : Attribution des bandes Raman du stratum corneum, de l'épiderme et du derme. ν : élongation ; γw : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochement (rocking) ……..63

Tableau V1 : Flux au steady-state (Jss), temps de latence (tlag) et le coefficient de perméabilité (Kp) obtenus des profils de masse cumulée en fonction du temps des peaux contrôles et les peaux exposées au laser pour le donneur 1 (a), le donneur 2 (b), le donneur 3 (c), le donneur 4 (d), le donneur 5 (e) et le donneur 6 (f)…….262

LISTE DES ACRONYMES

SC : Stratum Corneum

EV : Épiderme Viable

DE : Derme

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

AGL : Acides Gras Libres

NMF : Facteur d'hydratation Naturel

PCA : Acide Pyrrolidone

JS : Jonctions Serrées

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économique

EMA : Agence Européenne de Médicaments

FDA : Food and Drug Administration

API : Ingrédient Actif Pharmaceutique

ACI : Ingrédient Actif Cosmétique

BSA : Albumine Sérique Bovine

CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance

HSE : Équivalent à la peau humaine

RHE : Épiderme humain reconstruit

IPCS : Programme International sur la Sécurité Chimique

3R : Remplacement, Réduction et Raffinement

HE : Hématoxyline et Éosine

PDMS : PolyDiMèthylSiloxane

PES : PolyEtherSulfone

CPL : Chromatographie en Phase Liquide

LC : Chromatographie Liquide

CCM : Chromatographie en Couche Mince

UV : Ultraviolet

HEPT : Hauteur Équivalente à un Plateau Théorique

CRM : Microspectroscopie Raman Confocale

CCD : Dispositif à couplage de charge

NA : Ouverture Numérique

OCT : Tomographie par Cohérence Optique

SNV : Standard Normal Variate

ACP : Analyse en Composante Principale

CP : Composante Principale

PLSR : Régression des moindres Carrées Partiels

CV : Validation Croisée

LKOCV : Leave K Out Cross Validation

LOOCV : Leave One Out Cross Validation

LV : Variable Latente

RMSECV : Erreur Quadratique Moyenne de Validation

UE : Union Européenne

QSAR : Relation quantitative structure-activité

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le secteur de la cosmétique joue un rôle significatif dans l'économie française. La France occupe la deuxième place mondiale, après les États-Unis, en tant que producteur de cosmétiques, et son industrie cosmétique se distingue par sa performance à l'exportation. Parmi les régions françaises, la Région Centre Val de Loire (RCVL) se démarque en tant que région emblématique de l'industrie cosmétique. En effet, c'est en RCVL qu'est née en 1994 l'association Cosmetic Valley, désormais pôle de compétitivité national. La RCVL est la seule région française à avoir fait de la cosmétique un domaine prioritaire de spécialisation (DPS).

C'est dans ce contexte que la RCVL a lancé en 2015 le programme Ambition Recherche Développement Cosmétosciences, en collaboration avec l'Université d'Orléans, l'Université de Tours, le CNRS, Cosmetic Valley et le Studium. Ce réseau réunit actuellement 12 laboratoires et 23 équipes de recherche reconnus pour leurs expertises dans des domaines tels que l'approvisionnement en matières végétales et biotechnologiques, le développement d'éco-procédés d'extraction, la caractérisation des extraits végétaux, la formulation et l'encapsulation d'actifs, la biologie cutanée, ainsi que l'utilisation de nouvelles technologies pour évaluer l'activité et garantir la sécurité des actifs cosmétiques. L'objectif de ce programme est de favoriser la recherche et l'innovation collaboratives entre les laboratoires universitaires et les acteurs industriels dans le domaine de la cosmétique, afin de soutenir le développement de l'industrie cosmétique. Il occupe une position unique en Europe en couvrant l'ensemble de la chaîne de valeur, de la matière végétale aux produits finis. À ce jour, 40 projets collaboratifs ont été réalisés par les laboratoires de la région Centre-Val de Loire en partenariat avec plus de 30 acteurs industriels de l'industrie cosmétique.

L'EA 6295 Nanomédicaments et NanoSondes participe activement au programme Cosmétosciences grâce à son expertise en formulation et en développement de méthodes analytiques. Elle contribue à différents niveaux, notamment dans les domaines de la formulation, de l'encapsulation d'actifs, ainsi que dans l'utilisation de méthodologies analytiques et bioanalytiques innovantes pour le contrôle qualité et l'objectivation des produits cosmétiques. Dans ce contexte, l'EA6295 s'est spécialisée dans le développement de méthodes analytiques multi-techniques combinant des approches chromatographiques et spectroscopiques appliquées à la peau. Les premières recherches sur l'objectivation des produits cosmétiques ont été menées dans le cadre du projet COSMICC (« Nanovecteurs de bioactifs cosmétiques : Innovation en formulation et en méthodes de caractérisation et d'objectivation »),

qui correspondait à la phase 1 du programme régional ARD 2020 Cosmétosciences. Ce projet a notamment financé la thèse de Linda Miloudi, qui portait sur l'application de techniques spectroscopiques vibrationnelles couplées à des analyses statistiques multivariées pour la caractérisation et l'objectivation des produits de soins cosmétiques. Les travaux de thèse de Linda Miloudi ont permis de mettre en évidence les avancées réalisées dans l'utilisation des méthodes spectroscopiques pour les applications en dermo-cosmétiques. Cependant, ces travaux ont également soulevé plusieurs problématiques et interrogations. Ainsi, les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent logiquement dans la continuité des recherches précédentes et visent à apporter des éléments de réponse aux questions soulevées lors de la thèse de Linda Miloudi.

Les travaux de cette thèse ont été menés dans le cadre du projet "Ultrasons pour la Formulation des produits cosmétiques : Objectivation sur peau humaine" (UFO), financé par la Région Centre-Val de Loire dans le cadre d'un appel à projets régional. Ce projet est le fruit d'une collaboration entre l'EA 6295 Nanomédicaments et NanoSondes (NMNS) de l'Université de Tours et la société Genialis. L'objectif principal du projet UFO est de combiner l'expertise de l'EA 6295 dans le développement de nouvelles approches bioanalytiques appliquées à l'étude des dynamiques moléculaires dans la peau des produits cosmétiques, et de fournir des éléments de réponse sur l'efficacité des produits testés. Dans un contexte plus large, le projet vise à évaluer la contribution et les performances de la spectroscopie Raman en tant qu'approche analytique innovante et écoresponsable répondant aux exigences des autorités réglementaires, pour l'objectivation de produits cosmétiques. Cependant, l'utilisation de ces approches nécessite une maîtrise avancée tant au niveau analytique que dans le traitement des données multivariées.

Ainsi, les objectifs de la thèse peuvent être répartis en quatre axes principaux :

1- Mise en place, au laboratoire, d'une approche bioanalytique pour objectiver les produits cosmétiques.
2- Mise au point d'une approche analytique multi-techniques pour la caractérisation et la quantification de la composition moléculaire des modèles de peau.
    (i) La CLHP couplée à l'UV-visible pour quantifier les ingrédients actifs à travers les modèles de peau.
    (ii) La Microscopie Confocale Raman (MCR) utilisée dans cette étude pour caractériser moléculairement les modèles de peau à une échelle fine.

(iii) La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CLHP/corona et CLHP/HR-MS) pour l'analyse quantitative et qualitative des lipides dans les modèles de peau utilisés dans cette étude.

3- Déterminer les effets liés au stockage sur des modèles de peau reconstruits (EpiSkin®).
   (i) Démontrer l'effet de la congélation sur la fonction barrière des EpiSkin®
   (ii) Étudier l'impact de la fixation à la formaline sur les EpiSkin® pour les études de perméation (preuve de concept).
4- Déterminer l'apport et des performances de la spectroscopie Raman pour l'objectivation de produit cosmétiques.
   (i) Élaboration d'un modèle in vitro prédictif (signal Raman versus concentration) pour estimer la quantité d'actif présente dans le SC humain.
   (ii) Évaluation (pour la première fois) de critères numériques permettant d'analyser les performances analytiques de la spectroscopie Raman, notamment la limite de détection (LOD), la précision (BCMSEP), la sensibilité (SEN) et la sélectivité (SEL).
   (iii) Étude de l'impact de l'analyse par Micro-spectroscopie Raman confocale sur la fonction barrière de la peau humaine.

Le manuscrit qui présente ces travaux est divisé en plusieurs chapitres. Le chapitre I explore les notions générales sur la peau et sa composition, ainsi que les avancées actuelles des tests de diffusion cutanée in vitro et in vivo pour l'évaluation des produits topiques. Il aborde également les considérations réglementaires qui y sont liées, ainsi que les techniques analytiques employées pour quantifier la diffusion cutanée. Le chapitre II présente les expériences réalisées dans le cadre du premier axe. Les résultats obtenus montrent l'utilisation régulière de cette approche lors de l'évaluation de formulations innovantes. Le chapitre III décrit les travaux réalisés dans le cadre du deuxième axe, qui permettent de réévaluer l'utilisation d'une membrane synthétique Strat-M® pour les tests d'objectivation, par rapport aux autres modèles de peau. Le chapitre IV présente les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre du troisième axe de cette thèse. Ces travaux reposent sur des études de perméation et l'utilisation de la Micro-spectroscopie Confocale Raman combinée à l'analyse multivariée pour évaluer la fonction barrière du modèle. Le chapitre V regroupe les travaux du quatrième axe, mettant en évidence le caractère non invasif de la micro-spectroscopie Raman confocale et sa polyvalence pour l'objectivation des produits cosmétiques. Enfin, le chapitre VI donne la conclusion générale et les perspectives de ces travaux de thèse.

Les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont donné lieu à la rédaction de huit publications scientifiques. Parmi celles-ci, six ont été incluses dans ce manuscrit, dont quatre ont été publiées, une soumise dans international Journal of Pharmaceutics et une autre à soumettre. De plus, ces travaux ont également été présentés lors de plusieurs événements scientifiques, incluant quatre communications orales et neuf communications par affiche (posters).

LISTE DES PUBLICATIONS

Les travaux de cette thèse de doctorat ont fait l'objet de plusieurs communications scientifiques :

Liste des publications

- **Publiées**

H. Kichou, A.C. Caritá, G. Gillet, L. Bougassaa, X. Perse, M. Soucé, L. Gressin, I. Chourpa, F. Bonnier and E. Munnier. Efficiency of emulsifier-free emulsions in delivering caffeine and α-tocopherol to human skin. *International Journal of Cosmetic Science*. 2023; 45:329– 344.

H. Kichou, Y. Dancik, C.E. Molinier, N. Huang, M. Soucé, L. Gressin, G. Gillet, I. Chourpa, E. Munnier and F. Bonnier. Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin. *International Journal of Cosmetic Science*, 2022, vol. 44, no 2, p. 262-270.

H. Kichou, E. Munnier, Y. Dancik, K. Kemel, H.J. Byrne, A. Tfayli, D. Bertrand, M. Soucé, I. Chourpa and F. Bonnier. Estimating the analytical performance of Raman spectroscopy for quantification of active ingredients in human stratum corneum. *Molecules*, 2022, vol. 27, no 9, p. 2843.

D.Kocsis, **H. Kichou**, K. Döme, Z. Varga-Medveczky, Z. Révész, I. Antal and F. Erdő. Structural and Functional Analysis of Excised Skins and Human Reconstructed Epidermis with Confocal Raman Spectroscopy and in Microfluidic Diffusion Chambers. *Pharmaceutics*, 2022, vol. 14, no 8, p. 1689.

L.Van Gheluwe, E. Munnier, **H. Kichou**, K. Kemel, F. Mahut, M. Vayer, C. Sinturel, H.J. Byrne, F. Yvergnaux, I. Chourpa and F. Bonnier. Confocal Raman spectroscopic imaging for evaluation of distribution of nano-formulated hydrophobic active cosmetic ingredients in hydrophilic films. *Molecules*, 2021, vol. 26, no 24, p. 7440.

Y. Dancik, **H. Kichou**, C.E. Molinier, M. Soucé, E. Munnier, I. Chourpa and F. Bonnier. Freezing weakens the barrier function of reconstructed human epidermis as evidenced by Raman spectroscopy and percutaneous permeation. *Pharmaceutics*, 2020, vol. 12, no 11, p. 1041.

- **Soumise dans Internationa Journal of Pharmaceutics**

H. Kichou, F. Bonnier, Y. Dancik, J. Bakar, R. Michael-Jubeli, A C. Caritá, X. Perse, M. Soucé, A. Tfayli, I. Chourpa and E. Munnier. Strat-M® positioning for skin permeation studies: A Comparative Study including EpiSkin® RHE, and Human Skin.

- **A soumettre**

H. Kichou, A.C. Caritá, H.J. Byrne, F. Bonnier, I. Chourpa and E. Munnier. Formalin fixation of reconstructed human epidermis skin models prior to in vitro permeability studies: A proof of concept using caffeine.

Communications Orales

E. Munnier*, L. Van Gheluwe, **H. Kichou**, F. Yvergnaux, F. Mahut, M. Vayer, C. Sinturel, E. Gore, M. Grisel, I. Chourpa, F. Bonnier. Characterization of cosmetic films loaded with an encapsulated active molecule: contribution of Confocal Raman Imaging.4th Congress of COMET 2022 (July 5-6 2022 - Cergy, France)

I.Chourpa*, A. Rayyad, **H. Kichou**, A. Makki, L. Van Gheluwe, V.Del Genio, K. Hervé-Aubert, S. Galdiero, H.J. Byrne, E. Munnier and F.Bonnier. Bioanalytical applications of Raman spectroscopy to follow active pharmaceutical and cosmetic ingredients. The 9th international Conference on Advanced Applied Raman spectroscopy ‘RamanFest2022’ (15 et 16 avril 2022).

H. Kichou*, F. Bonnier, Y. Dancik , J. Bakar , R.Michael-Jubeli , A.C. Caritá , X.Perse , M. Soucé , A. Tfayli , I.Chourpa and E.Munnier. Evaluating Strat-M® synthetic membrane as substitute to in vitro and ex vivo skin models for permeation studies. ‘Skin models in Cosmetic Science: Bridging Established Methods and Novel Technologies – 2nd metting’ (08 Avril 2022 – En ligne).

H. Kichou*, G. Gillet, L. Bougassaa, X. Perse, M. Soucé, L. Gressin, I. Chourpa, F. Bonnier and E. Munnier. Développement et caractérisation d’émulsions sans tensio-actifs, pour des produits plus naturels et mieux tolérés. 20ème édition des Journées formulation de la Société Chimique de France (29 et 30 novembre 2021 – Compiègne).

Communications par posters

H. Kichou, A.C. Caritá, G. Gillet, L. Bougassaa, X. Perse, M. Soucé, L. Gressin, I. Chourpa, F. Bonnier and E. Munnier. Ecodesign of cosmetic emulsions: contribution of high frequency ultrasonication technology. 33ème congrès de l'IFSCC 'Rethinking Beauty Science' (Barcelone - Septembre 2023)

H. Kichou, A.C. Caritá, G. Gillet, L. Bougassaa, X. Perse, M. Soucé, L. Gressin, I. Chourpa, F. Bonnier and E. Munnier. Surfactant-free emulsions stabilized by high-frequency ultrasonication: bioequivalence tests of caffeine and α-tocopherol delivery to human skin. La 5ème edition du COSM'INNOV "The international Congress for Cosmetics Research" (Orléans - Mai 2023)

A.C . Caritá, **H. Kichou**, J.Marchand, F. Vial, E. Munnier. Investigation of skin aging in healthy humans. La 5ème edition du COSM'INNOV "The international Congress for Cosmetics Research" (24-25 mai 2023, Orléans, France)

H. Kichou, E. Munnier, Y. Dancik, K. Kemel, H.J. Byrne, A. Tfayli, D. Bertrand, M. Soucé, I. Chourpa and F. Bonnier. Analytical performance of Raman spectroscopy for quantification of active ingredients in Human stratum corneum. 19th European Conference on the spectroscopy of Biological Molecules 'ECSBM' (Poster, 29 août au 1 septembre 2022- Reims – Prix poster).

H. Kichou, F. Bonnier, Y. Dancik, J. Bakar, R. Michael-Jubeli, A.C. Caritá, X. Perse, M. Soucé, A. Tfayli, I. Chourpa and E. Munnier. Evaluating Strat-M® synthetic membrane as substitute to in vitro and ex vivo skin models for permeation studies 4th Cosmetic Measurment and testing 'COMET' Congress (Poster, 5 et 6 Juillet 2022- Cergy-Pontoise – Prix du jeune chercheur)

H. Kichou, A.C. Caritá*, X. Perse, M. Soucé, L. Gressin, G. Gillet, I. Chourpa, E. Munnier, F. Bonnier. Surfactant-free emulsions for the delivery of cosmetic ingredients: development, characterization, and in vitro skin permeation studies. 34th congresso brasileiro de cosmetologia (7-9 juin 2022, Sao Paulo, Brésil).

H. Kichou, E. Munnier, Y. Dancik, K. Kemel, H.J. Byrne, A. Tfayli, D. Bertrand, M. Soucé, I. Chourpa and F. Bonnier. In vitro model to assess the analytical performance of Raman spectroscopy for penetration studies of actives molecules in human skin. 23ème Congrés de Chimiométrie 'Chimiometrie 2022' (7 et 8 Juin 2022 - Brest).

H. Kichou, F. Bonnier, Y. Dancik, J. Bakar, R. Michael-Jubeli, X. Perse, M. Soucé, A. Tfayli, I. Chourpa and E. Munnier. Apport de la Spectroscopie Confocale Raman dans l'étude de la peau et la diffusion des molécules actives. 34ème Colloque Biotechnocentre, (20 et 21 octobre 2022 – Nouan le Fuzelier).

H. Kichou, F. Bonnier, Y. Dancik, J. Bakar, R. Michael-Jubeli, X. Perse, M. Soucé, A. Tfayli, I. Chourpa and E. Munnier. Approches chromatographiques et spectroscopiques appliquées à l'étude de la pénétration d'actifs dans la peau. 33ème colloque du Biotechnocentre, (7 et 8 octobre 2021 – Center Parcs Sologne).

I. La diffusion cutanée : méthodes bio-analytiques (in vitro & in vivo) et considérations réglementaires

I.1 La peau et sa fonction barrière :

La peau est un organe complexe qui se compose de différentes couches tissulaires, ainsi que d'éléments annexes tels que les follicules pileux, les glandes sébacées, le muscle érecteur du poil pour les unités pilosébacées et les glandes sudoripares [1]. Les principales couches qui la composent sont l'épiderme, le derme et l'hypoderme (voir Figure 1). La présence d'un réseau vasculaire dense dans le derme et les annexes cutanées joue un rôle crucial dans la diffusion transdermique. L'épiderme représente la couche la plus superficielle de la peau, se compose de cellules appelées kératinocytes (80% des cellules de l'épiderme), mélanocytes, cellules de Langerhans et cellules de Merkel. L'épiderme est constitué d'une succession de cinq couches cellulaires, formées grâce au processus de différentiation des kératinocytes, qui sont : la couche cornée (i.e. *stratum corneum* (SC), la couche claire (i.e. *stratum lucidum*), la couche granuleuse (i.e. *stratum granulosum*), la couche épineuse (i.e. *stratum spinosum*) et la couche basale (*stratum germinativum*). Les 4 dernières couches constituent la partie viable de l'épiderme, plus communément appelée Épiderme Viable (EV).

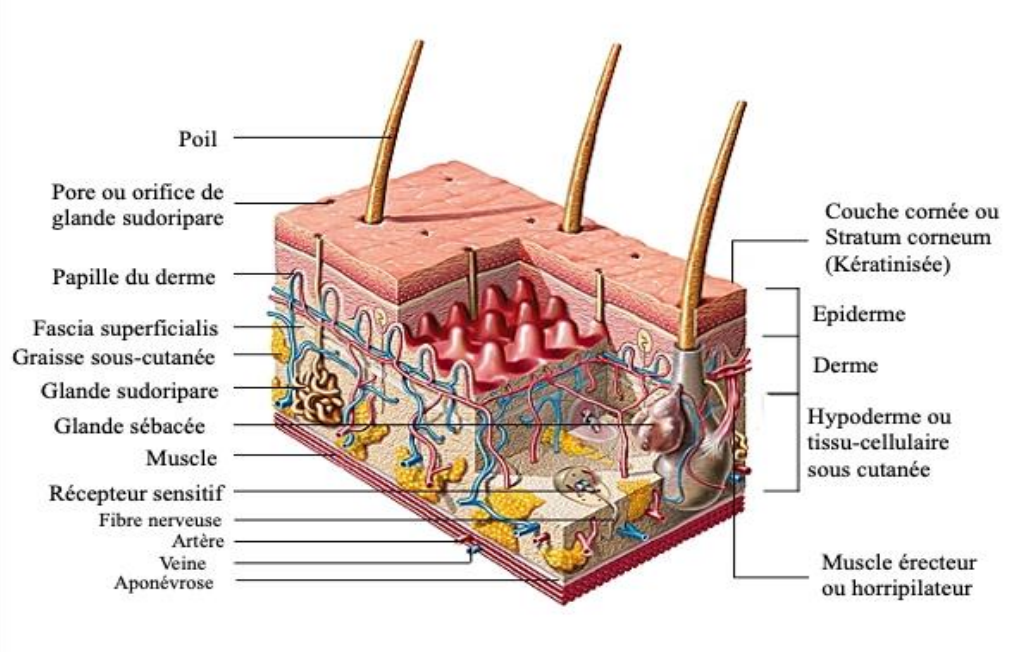


Figure 1: *Structure de la peau [2–5].*

La compréhension de la physiologie de la peau humaine a conduit à l'identification de quatre types distincts de fonctions barrières, à savoir les barrières physiques, chimiques, immunologiques et microbiennes [6]. La fonction barrière physique repose principalement sur la couche cornée, dont la composition protéinique et lipidique joue un rôle prépondérant. Bien que les tissus vivants abritent également une activité microbienne, la couche cornée est généralement considérée comme le principal site de la barrière cutanée microbienne [7]. Cette barrière est associée aux bactéries, champignons et virus présents dans la couche cornée. La barrière chimique repose sur des peptides antimicrobiens et des espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive oxygen species) présents dans le Stratum corneum et l'épiderme viable. Quant à la barrière immunologique, elle se trouve dans l'épiderme viable et le derme, et est associée aux cellules immunitaires telles que les cellules de Langerhans et les lymphocytes T, ainsi qu'aux fonctions immunologiques des kératinocytes [6]. En général, les études portant sur le transport topique et transdermique se concentrent principalement sur la barrière physique. Les recherches explorant les interactions potentielles entre les différentes barrières cutanées sont encore rares.

I.1.1 Le Stratum Corneum (SC) : la barrière principale de la peau :

Les molécules pharmaceutiques ou cosmétiques destinées à atteindre un site d'action dans la peau ou la circulation systémique doivent d'abord pénétrer et traverser le Stratum Corneum (SC), une barrière physique hautement efficace dont la fonction découle de sa composition biochimique ainsi que de sa structure. L'épaisseur totale du SC chez l'adulte en bonne santé varie d'environ 20 µm sur les joues, les fesses et les avant-bras à environ 200 µm sur la paume des mains [8–10]. L'épaisseur du SC est maintenue grâce au processus de desquamation. Les épaisseurs du SC et des autres couches de la peau varient également en fonction de l'âge et en cas de pathologie cutanée.

I.1.1.1 La Composition du SC :

Le Stratum Corneum (SC) est constitué d'une phase cellulaire principalement composée de cornéocytes, qui sont intégrés dans une matrice lipidique dense, souvent décrite comme une structure de "briques et de ciment". Les cornéocytes sont des cellules mortes et aplaties, disposées en colonnes entrelacées. Ils sont constitués de kératine et entourés d'une enveloppe cornée composée de protéines densément réticulées telles que la filaggrine, la loricrine et l'involucrine [3]. La cohésion entre les cornéocytes est assurée par des cornéodesmosomes [11]. En surface et à proximité, on estime que la composition en eau, lipides et protéines dans le

stratum corneum est d'environ 30 %, 20 % et 50 %, respectivement [12]. La proportion relative d'eau augmente avec la profondeur du SC, de sorte qu'elle représente environ 70 % de la masse du SC près de la jonction SC / EV [16]. De même, les cornéodesmosomes et les lipides ne sont pas distribués de manière homogène dans la profondeur du SC, alors qu'ils sont uniformément répartis dans la partie inférieure du SC (SC compact). Les cornéodesmosomes se dégradent vers les couches supérieures, convertissant la structure du SC en une structure en "panier tressé" avec des cornéodesmosomes reliant latéralement les cornéocytes. Cela élargit l'espace intercellulaire qui est rempli d'une quantité croissante de matrice lipidique et facilite la desquamation [2, 11, 13]. La couche cornée est constituée d'une monocouche de lipides comprenant des céramides, du cholestérol et des acides gras, dans des proportions presque équimolaires. Cette monocouche de lipides confère à la couche cornée une excellente barrière hydrofuge, assurant la protection des tissus sous-jacents contre la déshydratation, les infections, de nombreux produits chimiques et les contraintes mécaniques [11]. La composition lipidique du SC a été étudiée et examinée en détail dans la littérature [2–5]. Les céramides sont les lipides les plus abondants dans le SC, représentant environ un tiers des molécules lipidiques et 50 % des lipides du SC en poids. Leur chimie est extrêmement complexe. Quinze sous-classes différentes de céramides ont été identifiées dans le SC, mais en tenant compte des différentes longueurs de chaîne, le nombre total de structures se compte par centaines [3, 5]. Les Acides Gras Libres (AGL) dans la barrière cutanée sont composés de 14 à 34 carbones, principalement saturés et non ramifiés. Les hydroxy-AGL, les acides gras mono-insaturés et de petites quantités d'acides gras polyinsaturés sont également présents. Le cholestérol est le principal stérol présent et assure une structure lamellaire et latérale correcte ainsi qu'une fluidité lipidique [4, 5]. C'est cette organisation spécifique des lipides intercellulaires, en plus de sa structure globale, qui confère au SC sa fonction de barrière. Les lamelles lipidiques du SC sont organisées en phases lamellaires avec une périodicité de 13 nm et 6 nm. Leur arrangement latéral est orthorhombique dans la partie centrale du SC et hexagonal près de la surface [1, 4, 11, 14, 15]. L'arrangement orthorhombique, plus abondant, confère de l'ordre, une mobilité limitée et une densité d'emballage élevée. La densité d'emballage hexagonal permet une plus grande fluidité des lipides [4, 5].

I.1.1.2 Facteur d'hydratation naturel (NMF) :

Le niveau d'hydratation naturel du SC dépend de la présence du facteur d'hydratation naturel (NMF : Natural Moisturizing Factor). Le terme NMF est utilisé pour englober un ensemble de composants des cornéocytes, représentant jusqu'à 10 % de leur masse. À partir du précurseur

filaggrine, les principaux composants du NMF qui lient de grandes quantités d'eau sont formés : des acides aminés libres, de l'acide pyrrolidone carboxylique (PCA) et des lactates [16, 17]. Le NMF est responsable du maintien de l'élasticité du SC et des niveaux d'hydratation nécessaires au bon fonctionnement des enzymes du SC impliquées dans le processus de desquamation [17] et semble essentiel au maintien de la géométrie lipidique [18].

I.1.1.3 Le film hydrolipidique :

Un autre élément de la fonction de barrière du SC est son film hydrolipidique, une fine couche de sébum et de sueur, avec un pH moyen de 5,0 dans la plupart des parties du corps [19]. En plus de maintenir l'homéostasie de la barrière, le film hydrolipidique contribue à la barrière microbienne, assure une desquamation appropriée et atténue l'inflammation [20]. Une corrélation négative entre les facteurs du NMF et le pH du SC a été démontrée, une réduction du NMF entraînant une augmentation du pH cutané [4].

I.1.1.4 Dysfonctionnement de la fonction barrière :

Une variété de maladies dermatologiques ainsi que l'exposition à des substances toxiques modifient la composition et la structure du SC, ce qui peut entraîner un dysfonctionnement de la barrière cutanée. Les causes et les effets des maladies de la peau sur la fonction barrière ont été largement étudiés [1, 4, 11, 14, 15]. Les effets des composés exogènes tels que les tensioactifs et les promoteurs de pénétration ont été largement documentés dans la littérature [1, 21, 22]. Les anomalies de la filaggrine et, par conséquent, de la synthèse du NMF, ainsi que le dysfonctionnement des cornéodesmosomes, sont également connus pour être liés aux maladies de la barrière cutanée [13].

I.1.1.5 Les principales voies de diffusion cutanée :

I.1.1.5.1 Voie intercellulaire :

Les ingrédients actifs qui sont absorbés et pénètrent dans le SC le font principalement de manière intercellulaire, c'est-à-dire par diffusion passive dans la voie lipidique entourant les cornéocytes [23]. C'est particulièrement le cas pour les molécules de petite taille et relativement lipophiles.

I.1.1.5.2 Voie intra (trans) cellulaire :

La deuxième voie possible est la voie intra (trans) cellulaire, qui implique une diffusion dans le domaine lipidique, une partition à travers l'enveloppe protéique des cornéocytes, une diffusion dans l'espace intracellulaire des cornéocytes comme indiqué sur la figure 2.

La compréhension des deux voies de diffusion est d'une importance capitale, car elles peuvent être affectées par différents facteurs. Cela nous permet de mieux comprendre les limites de la diffusion cutanée des ingrédients actifs et de proposer des solutions potentielles pour améliorer leur diffusion et renforcer leur efficacité.

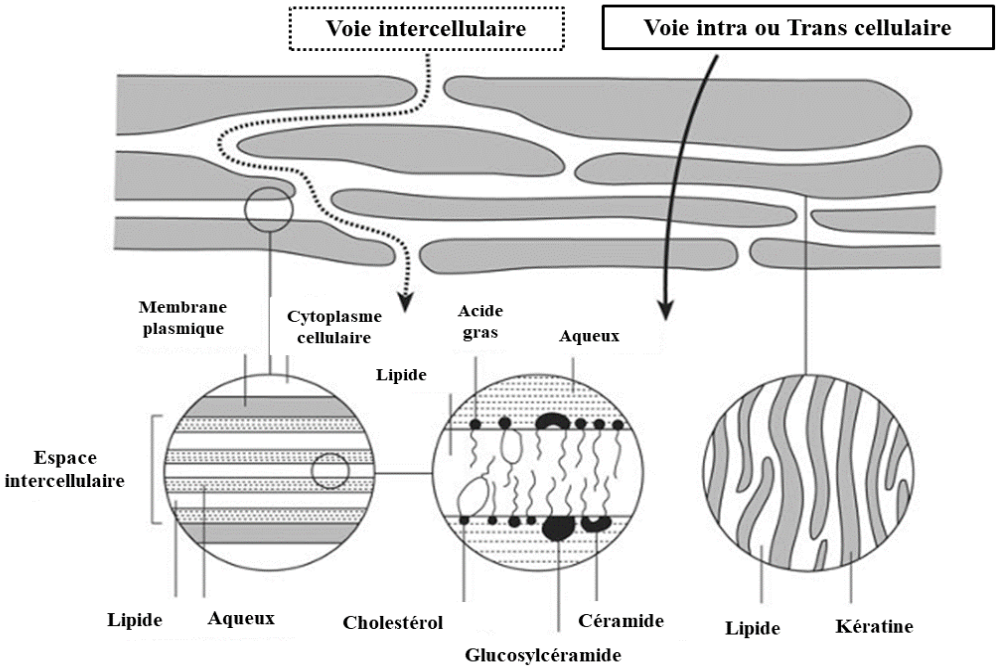


Figure 2: *Les principales voies de diffusion cutanée [23] .*

I.1.2 L'Épiderme Viable :

L'épiderme viable (EV), qui se situe en dessous du SC, se compose de différentes couches cellulaires ayant des fonctions variées. Les kératinocytes représentent environ 95 % des cellules épidermiques dans l'EV, tandis que les autres types cellulaires comprennent principalement des mélanocytes, des cellules de Langerhans et des cellules de Merkel [24]. L'EV est dépourvu de vaisseaux sanguins et contient environ 40 % de protéines, 40 % d'eau et 20 % de lipides [25]. Un processus continu de régénération se produit dans l'épiderme, grâce à la migration des kératinocytes situés à la jonction entre l'épiderme et le derme. Ces kératinocytes migrent vers

la couche cornée où ils subissent une transformation en cornéocytes. Ces derniers sont finalement éliminés par desquamation, assurant ainsi un renouvellement constant de la peau.
D'une épaisseur variant entre 50 et 90 µm [10, 26, 27], l'EV peut jouer un rôle de barrière physique supplémentaire contre la pénétration de molécules lipophiles [28–30]. La diffusion de molécules à travers l'EV et les couches sous-jacentes peut être influencée par l'accumulation de ces molécules dans les tissus. Le degré d'accumulation peut être anticipé par la polarité de la molécule, son affinité de liaison avec les protéines, l'impact éventuel du métabolisme cutané, ainsi que le flux de diffusion vers les tissus sous-jacents.
Au niveau cellulaire, les jonctions serrées (JS) sont maintenant reconnues comme des éléments essentiels de la barrière physique de l'EV [6, 31]. Les JS sont formées par diverses protéines et servent à relier les kératinocytes, assurant ainsi la fermeture de l'espace intercellulaire pour empêcher la diffusion de molécules [31]. Les JS peuvent jouer un rôle crucial dans la diffusion cutanée des molécules, car l'EV est une composante essentielle du métabolisme cutané. Les enzymes de phase I et de phase II se trouvent principalement dans la couche basale [32]. Ces enzymes peuvent favoriser soit l'activation chimique, soit la détoxification. Lors du développement de produits à usage topique, il est primordial de prendre en compte le métabolisme cutané afin de concevoir des formulations adaptées à une application topique [23, 33–35].

I.1.3 Derme et hypoderme :

Le derme est une couche située sous l'épiderme viable, dont l'épaisseur varie de 500 µm à 4 mm selon les régions. Le derme se compose du derme papillaire superficiel, une fine couche d'environ 100 à 200 µm, et du derme réticulaire, qui constitue le reste du derme. Environ 70 % du poids sec du derme est composé de fibres de collagène, tandis que l'élastine représente environ 5 % [24]. Le derme abrite les vaisseaux sanguins, le système lymphatique et nerveux, et soutient les structures cutanées annexes.
Situé en dessous du derme réticulaire, l'hypoderme, connu également sous le nom de tissu adipeux sous-cutané, présente une épaisseur pouvant atteindre plusieurs millimètres [25]. Il est constitué de petites gouttelettes de graisse séparées par des brins fibreux principalement constitués de collagène. L'hypoderme abrite également des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs. Ses fonctions principales sont le stockage d'énergie, l'isolation mécanique et thermique. De plus, il permet à la peau de se déplacer sur les tissus musculaires sous-jacents et les os [25, 33]. La diffusion des molécules dans le derme et les couches sous-jacentes semble principalement être influencée par leur liaison aux composants tissulaires,

notamment les protéines, leurs accumulations et la présence de vaisseaux sanguins sous la zone d'application topique [36]. Les structures cutanées annexes, telles que les unités pilosébacées, peuvent servir de voies d'accès permettant aux molécules d'atteindre les couches cutanées viables en contournant la barrière physique formée par la couche cornée. De plus, en raison de leur riche vascularisation résultant de leur emplacement dans le derme, elles peuvent également servir de voie de diffusion potentielle vers la circulation systémique.

I.1.4 Follicules pileux :

L'ensemble pilosébacé est constitué du follicule pileux, de la glande sébacée associée et du muscle érecteur du poil [24]. Le follicule pileux terminal est une structure en forme d'invagination allongée présente dans la peau. La couche cornée superficielle s'étend dans les infundibulums, lesquels s'étendent d'environ 500 μm de la surface de la peau jusqu'aux tissus viables [37]. Les infundibulums, qui correspondent aux parties coniques supérieures des follicules pileux ouvertes à la surface de la peau, représentent environ 2 à 3 % de la surface totale de la peau [38]. Il est important de noter que la couche cornée s'amincit à mesure que l'on s'enfonce plus profondément dans les infundibulums [39].

D'après plusieurs études, il semble que la voie folliculaire offre une possibilité potentielle de pénétration dans la peau vivante pour les composés hydrophiles, lipophiles et même les nanoparticules [40–45]. Bien que le follicule pileux soit généralement considéré comme une voie de contournement de la barrière cutanée, il est important de noter qu'il peut également constituer une barrière physique potentielle à la pénétration plus profonde de composés exogènes.

I.1.5 Glandes sudoripares et sébacées :

Les glandes sudoripares peuvent être regroupées en différentes catégories : (i) les glandes sudoripares eccrines, qui s'ouvrent à la surface de la peau et ont pour fonction la régulation thermique en produisant de la sueur qui s'écoule et permet de refroidir le corps [24, 46]. (ii) les glandes sudoripares apocrines, présentes dans les régions axillaires, mammaires, périnéales et génitales [47]. À la différence des glandes sudoripares eccrines, elles s'ouvrent dans les infundibulums des follicules pileux [46, 47]. (iii) les glandes sébacées, localisées exclusivement dans les régions poilues et supposées se développer à l'adolescence à partir des glandes sudoripares eccrines [47].

I.2 La diffusion cutanée :

L'étude de la diffusion cutanée des composés exogènes à travers la peau humaine revêt une importance considérable dans les domaines des traitements cosmétiques et dermatologiques, de l'administration transdermique de produits et de l'évaluation des risques associés aux substances toxiques. Selon l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), le processus de diffusion cutanée ou dermique peut être divisé en trois étapes [48]:

- ***Pénétration :*** il s'agit de la diffusion d'une substance dans une couche ou une structure spécifique, telle qu'un composé exogène dans la couche cornée (SC).
- ***Perméation :*** il s'agit de la pénétration à travers une couche pour atteindre une autre couche qui est à la fois fonctionnellement et structurellement différente de la première.
- ***Résorption :*** il s'agit de la diffusion d'une substance dans le système vasculaire (vaisseaux lymphatiques et/ou sanguins), qui agit comme le compartiment central.

La diffusion cutanée comprend, à des degrés variables, la pénétration du SC, la perméation à travers l'épiderme et la résorption par le réseau capillaire au niveau de la jonction dermo-épidermique. La perméation à travers le SC, qui est riche en lipides, est considérée comme l'étape déterminante de la vitesse. Une fois que le composé a franchi cette étape, idéalement, il traverse rapidement le reste de l'épiderme et du derme, dans des conditions appelées "conditions de sink", où la concentration du composé dans ce milieu n'excède pas 10 % de sa solubilité [49]. Pour faciliter ces processus, une molécule d'intérêt, qu'il s'agisse d'un ingrédient actif pharmaceutique (API) ou cosmétique (ACI), est souvent incorporé dans une formulation et peut contenir des agents prometteurs de pénétration. Cependant, il est possible qu'une accumulation de concentrations locales d'une molécule se produise, créant ainsi un effet de réservoir.

I.2.1 Lignes directrices et considérations législatives des tests de diffusion cutanée

I.2.1.1 L'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE) :

Dans le cadre de son programme sur l'environnement, la santé et la sécurité, l'OCDE a publié plusieurs décisions et recommandations du Conseil qui sont légalement contraignantes pour les 38 pays membres. De plus, l'OCDE a également émis de nombreux documents d'orientation et rapports techniques concernant les processus de test des produits chimiques. Les lignes directrices de l'OCDE sur la diffusion cutanée [48], ont pour objectif de fournir des orientations pratiques pour une interprétation harmonisée des données expérimentales issues d'études spécifiques sur la diffusion cutanée. Ces lignes directrices mettent l'accent sur l'établissement de valeurs appropriées de diffusion cutanée pour évaluer les risques pour la santé au travail et

la santé publique, mais elles sont généralement applicables à toutes les études sur la diffusion cutanée.

I.2.1.1.1 In vivo

La ligne directrice 427 de l'OCDE le test des produits chimiques concerne spécifiquement les études de diffusion cutanée in vivo [50].

Ces tests consistent à mesurer une molécule d'intérêt, de préférence radiomarquée, appliquée sur la peau animal (rasée de préférence), avec une dose ou différentes doses appropriées, sous la forme d'une formulation représentative. La préparation d'essai est maintenue au contact de la peau pendant une période donnée, sous un patch adapté (non occlusif, semi-occlusif ou occlusif). Au terme de la période d'exposition, le patch est retiré et la peau est nettoyée à l'aide d'un solvant approprié. En générale, chaque étude porte sur plusieurs groupes d'animaux exposés à la préparation d'essai. Un groupe est euthanasié à la fin de la période d'exposition, et les autres groupes sont euthanasiés par la suite à des intervalles déterminés. A la fin de la période d'échantillonnage, les animaux restants sont euthanasiés, le sang est collecté pour analyse, la zone d'application est prélevée pour analyse, et la carcasse est analysée pour rechercher toute matière non excrétée. Les échantillons sont analysés selon par des méthodes appropriées pour l'estimation du degré d'absorption cutanée.

I.2.1.1.2 In vitro

Les test in vitro sont décrits par la ligne directrice 428 de l'OCDE pour les test in [48]. Ces méthodes consistent à mesurer la diffusion des produits chimiques dans la peau en utilisant des explants de peau. Les méthodes peuvent utiliser soit de la peau non viable pour mesurer uniquement la diffusion, soit de la peau fraîche et métaboliquement active pour mesurer à la fois la diffusion et le métabolisme cutané. Différentes espèces de mammifères, y compris les humains, peuvent être utilisées pour la peau, mais le choix de l'espèce, du site anatomique et de la technique de préparation doit être justifié.

Bien que des échantillons de peau de pleine épaisseur puissent être utilisés, il est préférable d'utiliser des membranes épidermiques ou des échantillons de peau de faible épaisseur (200 à 500 µm) [48]. La méthodologie recommandée est celle de la cellule de diffusion (méthode de Franz). Cela permet d'établir un bilan de masse complet en prenant en compte la quantité restante de substance test dans la peau traitée. L'utilisation de la méthode de diffusion cutanée in vitro de l'OCDE (ligne directrice 428) a été approuvée par des organisations telles que l'Union Européenne (UE) dans son avis sur les critères de base pour l'évaluation in vitro de la diffusion

cutanée des ingrédients cosmétiques [51]. Le document souligne également que seules des préparations cutanées d'origine naturelle peuvent être utilisées et note que bien que la qualité des cultures de peau cultivées ou reconstituées ait considérablement progressé, ces cultures n'ont pas une fonction barrière complète comparable à celle de la peau vivante [52].

I.2.1.2 L'Agence Européenne des Médicaments (EMA) :

L'EMA a émis des directives concernant la qualité et l'équivalence des produits topiques [53], Ces directives fournissent des protocoles d'essais d'équivalence pour différents aspects, notamment : (i) la libération in vitro, (ii) la perméation cutanée humaine in vitro, (iii) le prélèvement in vivo de la couche cornée par le biais de prélèvements par des bandes adhésives (tape stripping), et (iv) l'essai de vasoconstriction in vivo pour les corticostéroïdes. Ces essais d'équivalence peuvent être appliqués et requis dans différents contextes, tels que les demandes d'autorisation de mise sur le marché pour des produits topiques existants. De plus, ils sont nécessaires en cas de modifications apportées au produit pendant le processus de développement ou après l'approbation réglementaire, notamment si ces modifications pouvaient avoir un impact significatif sur la sécurité, la qualité ou l'efficacité du produit. Les lignes directrices relatives aux essais d'équivalence en termes d'efficacité exigent une comparaison des cinétiques de perméation avec le produit de référence. Les études recommandées comprennent la perméation cutanée in vitro avec de la peau excisée, le prélèvement de la couche cornée in vivo (tape stripping) sur des volontaires humains, ainsi que la bioéquivalence pharmacocinétique. Bien que le protocole de l'essai de perméation in vitro ne soit pas explicitement mentionné, il est basé sur un test de diffusion utilisant de la peau humaine adulte excisée (in vitro), qui est similaire au test 428 de l'OCDE [48]. Le protocole détaillé pour le prélèvement in vivo de la couche cornée (tape stripping) dans le cadre des essais d'équivalence est décrit dans l'Annexe III du projet de directive de l'EMA [53].

I.2.1.3 La Food and Drug Administration (FDA)

La FDA des États-Unis a émis une directive similaire pour évaluer la bioéquivalence des produits topiques [54]. Selon cette directive, les études doivent être menées sur la peau de l'avant-bras (face interne) de volontaires humains en bonne santé. Étant donné la variabilité interindividuelle, les produits à comparer doivent être appliqués sur le même volontaire. De plus, un témoin négatif non équivalent au produit de référence doit également être inclus pour démontrer la capacité discriminante de la méthode. Les produits doivent être comparés à deux moments différents pour chaque sujet. Un graphique présentant le profil de distribution du

produit dans la couche cornée doit être fourni pour chaque site d'application. Pour la comparaison des produits, les paramètres d'équivalence tels que la masse de substances récupérées dans les sites de diffusion et d'élimination doivent être comparés statistiquement, conformément à la directive sur les expériences de bioéquivalence [55].

I.2.2 Facteurs influençant la diffusion cutanée :

Dans leur rapport intitulé "Absorptions cutanées" dans le cadre des Critères de santé environnementale (235) [56], l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) présente plusieurs éléments susceptibles d'influencer les processus de pénétration, de perméation et de résorption des composés chimiques à travers la peau :

- **(i)** La molécule d'intérêt (état physique, masse moléculaire, coefficient de partition lipide/eau, ionisation, effets cutanés locaux).
- **(ii)** La peau (espèces, site anatomique, température, hydratation du SC, lésions du SC, métabolisme, peau malade, desquamation, flux sanguin et lymphatique).
- **(iii)** Le véhicule et ou la formulation (solubilité, volatilité, distribution dans le SC, excipients, effet sur le pH du SC)
- **(iv)** La dose d'application (concentration, dose finie et infinie, dose de surface cutanée (épaisseur du film, concentration), surface totale de la peau en contact avec le véhicule, durée d'exposition).
- **(v)** Autres facteurs (effet de réservoir et son interprétation dans l'évaluation des risques).

Comprendre, suivre et quantifier ces multiples facteurs d'influence constitue le principal défi des études sur la diffusion cutanée.

I.2.3 Mesure de la perméation et de la pénétration cutanée

I.2.3.1 Mesures in vivo

Comme décrit dans les lignes directrices de l'OCDE **(voir section I.2.1. Lignes directrices et considération législatives des tests de diffusion cutanée)**. Les méthodes in vivo utilisées pour mesurer la pénétration cutanée et la perméation impliquent l'utilisation d'une peau intacte sur le plan physiologique et métabolique afin d'évaluer comment la molécule d'intérêt pénètre à travers la peau jusqu'à la circulation systémique.

Dans le cadre du développement de produits pharmaceutiques topiques, les modèles animaux sont couramment utilisés pour mesurer la perméation et la pénétration cutanée, car il n'est pas

possible d'effectuer des tests approfondis sur les êtres humains. Le rat est l'espèce la plus fréquemment choisie dans ce contexte en raison de ses taux de diffusion cutanée similaires à ceux de l'humain. La substance test, généralement marquée avec un radioisotope, est appliquée sur la peau rasée (plusieurs groupes) des animaux à une dose unique ou sur une plage de doses, sous la forme d'une formulation appropriée et représentative, généralement jusqu'à 10 µL/cm^2, afin de simuler une exposition potentielle chez l'homme. Après l'euthanasie, la carcasse est examinée et le sang est analysé à l'aide de méthodes appropriées pour l'estimation du taux de diffusion cutanée.

En ce qui concerne le développement de produits cosmétiques à usage topique, les mesures in vivo sur la peau humaine sont considérées comme la référence. Cependant, ces tests ne sont autorisés que si la molécule ne présente aucun effet toxique pour les êtres humains, ce qui est évalué au préalable par des tests de toxicité.

Les tests in vivo sont généralement effectués en prélevant le SC à l'aide d'une technique appelée "Tape stripping". Cette méthode a été largement utilisée pour évaluer l'efficacité et l'innocuité des produits [57, 58], et elle est approuvée par les autorités réglementaires pour les tests in vivo de diffusion cutanée [50].

I.2.3.1.1 La méthode du 'Tape stripping' in vivo :

Le principe de la méthode du tape stripping consiste à enlever séquentiellement des couches de la couche cornée (SC) d'une épaisseur d'environ 1 µm à l'aide de bandes adhésives préalablement appliquées sur une zone spécifique exposée au produit étudié. La quantité de substance collectée par la bande adhésive est tout d'abord déterminée par pesée, puis quantifiée à l'aide de différentes techniques de mesure. Cette méthode peut être utilisée pour établir le profil de concentration d'un produit dans la couche cornée en fonction de la profondeur du SC, permettant ainsi de déterminer le coefficient de partition, le flux de diffusion et la quantité cumulative du produit testé qui pénètre dans cette couche. Toutefois, il convient de noter que cette méthode n'est pas très fiable et nécessite généralement une pesée précise de la bande adhésive ainsi qu'une mesure du taux de perte en eau Trans-épidermique après le retrait de la bande adhésive. Le nombre de bandes adhésives nécessaires pour éliminer une fraction donnée de la couche cornée peut varier en fonction du type de ruban adhésif utilisé, de la pression appliquée, de la force de décollement, ainsi que de facteurs tels que le site anatomique, l'âge, le sexe et l'origine ethnique du sujet. Malgré ces limitations, le tape stripping présente l'avantage évident de permettre des observations in vivo de la pénétration de la couche cornée chez les humains.

I.2.3.2 Mesures de la perméation in vitro

Les cellules de diffusion de Franz représentent la méthode la plus couramment employée pour évaluer la perméation et la pénétration in vitro des produits pharmaceutiques et cosmétiques. Ces tests sont validés par les directives de l'OCDE [48].

Initialement décrite par Thomas Franz en 1975 [41], la cellule de Franz, telle qu'illustrée dans la figure 3-(A), est actuellement utilisée avec différentes géométries et dimensions, mais toutes incluent un compartiment donneur dans lequel le produit est appliqué.

Le produit appliqué est généralement exprimé en en masse d'actif (mg) par surface de diffusion (cm^2) et appliqué soit en dose infinie (> $4mg/cm^2$) ou en dose finie (<$4mg/cm^2$).

Le compartiment récepteur qui contient un milieu récepteur approprié, est pourvu d'un orifice d'échantillonnage qui permet de prélever du liquide récepteur à différents moments, ce qui est idéal pour étudier les cinétiques de perméation. Les milieux récepteurs utilisés dans les tests de perméation et de pénétration sont généralement des solutions aqueuses physiologiques tamponnées à un pH de 7, ce qui les rend représentatifs des fluides corporels. La solubilité de l'ingrédient actif dans les liquides récepteurs doit respecter les conditions de sink, de sorte que la partition de la peau vers le milieu récepteur ne soit pas limitée par la solubilité et n'impacte pas le taux de perméation. La solubilité dans les milieux récepteurs peut être améliorée en ajoutant des co-solvants tels que l'éthanol, ou des tensioactifs. Cependant, il est bien connu que ces co-solvants ont un impact sur l'intégrité de la peau [41, 59, 60], ce qui fait que leur utilisation n'est plus recommandée par les experts. En alternative, de l'albumine sérique bovine (BSA) peut être ajoutée au milieu récepteur pour améliorer la solubilité. Une autre option consiste à augmenter le volume des échantillons prélevés dans le milieu récepteur et à le remplacer par un milieu frais à chaque point d'échantillonnage.

L'échantillon de peau est fixé entre les compartiments donneur et récepteur de manière à ce que le stratum corneum soit en contact direct avec le compartiment donneur, assurant ainsi un contact direct avec le produit, tandis que le derme est en contact direct avec le milieu récepteur [61].

La température peut être contrôlée à l'aide d'un bain d'eau ou d'une enceinte de régulation, comme indiqué dans la figure 3-(B). La température de surface de la peau est maintenue à 32 °C. Selon la méthode de régulation choisie, il peut être nécessaire de maintenir le fluide de régulation à des températures plus élevées, par exemple 37 °C, afin d'obtenir une température de 32 °C à la surface de la peau. Généralement, une méthode analytique telle que la

Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) est utilisée en tant qu'étape ultérieure pour quantifier les produits dans les compartiments récepteurs [62].

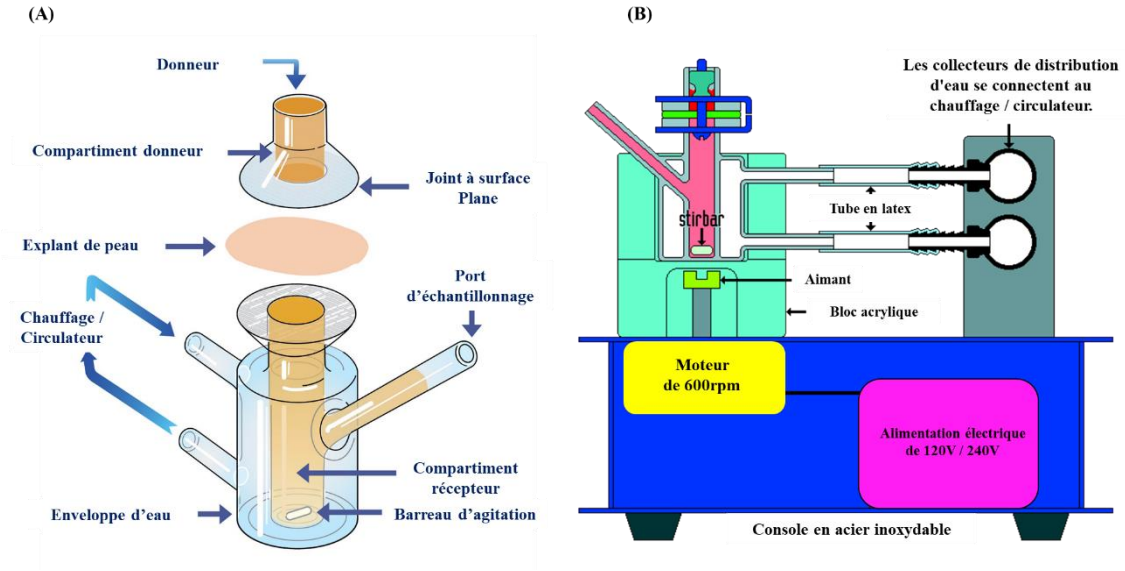


Figure 3: *(A) Schéma représentatif d'une cellule de Franz. (B) schéma représentatif du dispositif qui permet de chauffer et d'agiter la cellule de Franz. (Https://permegear.com/franz-cells/).*

I.2.3.2.1.1 Modèles équivalents à la cellule de Franz

À l'origine, les cellules de Franz étaient produites en verre, mais avec les avancées de l'impression 3D, il est désormais possible de les fabriquer sur mesure, en utilisant notamment de la résine d'acrylate. [61]. Certaines études ont rapporté l'utilisation de chambres à micro-fluidique ainsi que de modèles "skin on the chips" pour les tests de perméation. Ces systèmes utilisent le principe de diffusion en cellules de Franz, mais diffèrent par une perfusion continue du milieu récepteur afin de générer un flux pendant le test de diffusion [63, 64].

Dans ce contexte, plusieurs systèmes in vitro peuvent être utilisés, tels que les modèles de Saarbruecken et de Hambourg. La caractéristique principale du modèle de Saarbruecken est l'absence de milieu récepteur liquide, ce qui évite une hydratation non physiologique de la peau. Dans ce modèle, les échantillons de peau sont placés sur un papier filtre imprégné d'une solution isotonique d'électrolytes, puis insérés dans la cavité d'un bloc en téflon [65]. D'autre part, le modèle de Hambourg est particulièrement intéressant pour les expériences utilisant une peau viable, car il permet de suivre l'étendue des transformations métaboliques dans l'épiderme et le derme tout au long des essais. Pour ce faire, le derme est alimenté par un milieu tandis que l'épiderme est en contact avec l'interface de l'air. La zone de diffusion est délimitée par un

anneau en polypropylène fixé avec de l'Histoacryl, et la partie externe de la peau est utilisée pour évaluer l'épaisseur de la couche cornée et de l'épiderme [66].

I.2.3.3 Mesures de la pénétration in vitro

En plus des études de perméation, il est également possible de suivre la pénétration in vitro de produits. À cet effet, la peau excisée est incubée dans des cellules de Franz (ou des modèles équivalents). Après une période d'exposition variable selon les expériences, la peau peut ensuite être segmentée à l'aide de la méthode du "Tape stripping", de la séparation thermique ou de la cryo-segmentation afin de déterminer la concentration de la molécule dans les différentes couches cutanées [67, 68]. La méthode du tape stripping fournit une analyse détaillée du profil de concentration en fonction de la profondeur à l'intérieur de la couche cornée.

Le stratum corneum (SC) est considéré comme la principale barrière à la diffusion des molécules, ce qui signifie que les différences de pénétration observées à l'intérieur du SC peuvent également se propager aux couches profondes de la peau. Ainsi, il peut être utilisé comme un substitut pour décrire la perméation de la molécule, même s'il mesure uniquement sa concentration dans le SC. Cependant, le tape stripping in vitro, tout comme in vivo, est soumis aux mêmes limitations, notamment un degré élevé de variabilité dans la quantité retirée, une variabilité introduite par l'opérateur lors de la réalisation de l'expérience, une grande variabilité inter-laboratoire [69].

La séparation thermique à 62°C est utilisée pour isoler l'épiderme des tissus sous-jacents. Il est important de prendre des précautions pour éviter l'extraction du produit de la peau lors de la séparation thermique, par exemple en utilisant une étuve à température régulée plutôt que de l'eau chaude, afin d'éviter la diffusion de la molécule (surtout molécules hydrophiles) dans l'eau qui a servi à chauffer la peau. L'avantage de la séparation thermique est que la teneur en principe actif peut être analysée et quantifiée de manière distincte dans l'épiderme et les tissus sous-jacents. L'inconvénient est que cette technique fournit des quantités globales dans les tissus, et donc aucun profil de profondeur ne peut être obtenu. Comme troisième option, la peau peut être segmentée à l'aide d'un cryomicrotome. Dans ce cas, des coupes de peau d'une épaisseur très fine (de 10 à 50 µm) sont réalisées à l’aide d’un cryomicrotome. Chacune de ces coupes peut être analysée individuellement pour obtenir des profils de profondeur.

I.2.4 Les modèles de peaux utilisés pour les tests de perméation et de pénétration : Avantages et limites

En raison des coûts élevés, des préoccupations éthiques et de la grande variabilité interindividuelle de la peau humaine, ce qui complique la réalisation et l'interprétation des expérimentations, les chercheurs se tournent de plus en plus vers d'autres modèles de peau. Parmi ces alternatives, on retrouve les explants de peau *in vitro* (humaine et animale), les modèles équivalents à la peau humaine (HSE) tels que le modèle d'épiderme humain reconstruit (RHE) et les modèles de peau synthétique. Il est important de noter que chaque modèle de peau présente ses propres limites et avantages, ce qui permet une utilisation spécifique en fonction de l'étude et des informations recherchées.

I.2.4.1 Les explants de peau

I.2.4.1.1 *Explants de peau humaines :*

Les tests de diffusion cutanée in vitro sont couramment effectuées en utilisant des échantillons de peau humaine excisée, considérés comme le modèle de référence. Les explants de peau prélevés lors de chirurgies plastiques peuvent être utilisés soit immédiatement après la procédure en tant que "peau fraîche", soit être conservés par congélation. En raison de la disponibilité limitée des échantillons de peau fraîche et de la contrainte temporelle associée, les biopsies congelées sont autorisées par plusieurs organismes consultatifs et réglementaires internationaux pour tous les tests portant sur des composés qui ne sont pas métabolisés par voie cutanée (recommandations de l'OCDE) [48]. Les critères de santé environnementale sur la diffusion cutanée du Programme International sur la Sécurité Chimique (IPCS) indiquent que la peau humaine peut être conservée à -20 °C pendant un an au maximum pour les études de perméation [70]. Le Comité scientifique des produits de consommation de l'UE recommande un stockage à -20 °C ou inférieur, sans précision sur la durée [51]. Cependant, plusieurs études ont rapporté que le stockage à différentes températures (-20 °C, -85 °C) pendant des périodes longues ou courtes (d'une semaine à un an) entraîne une altération de la fonction barrière de la peau en raison de la formation de cristaux de glace [71]. Des recherches ont démontré des différences significatives de perméation entre la peau congelée et la peau non congelée [72–76]. L'utilisation d'agents cryoprotecteurs, tels que le glycérol à 10 %, a été étudiée pour prévenir la formation de cristaux de glace [71, 77, 78]. Cependant, il est important de noter que ces agents peuvent également modifier la structure et la fonction de la barrière cutanée. De plus, la déshydratation de la peau peut survenir, entraînant une altération de l'intégrité de la couche

cornée et une diminution de la fonction de barrière. En raison de considérations éthiques, de la disponibilité limitée, du stockage et de raisons économiques, des modèles de peau alternatifs à la peau humaine excisée sont largement utilisés en tant que substituts.

I.2.4.1.2 Explants de peau animales :

L'utilisation de peau animale comme alternative à la peau humaine excisée dans les études de perméation cutanée a été abondamment étudiée dans la littérature. Différents modèles ont été adoptés, tels que la peau porcine [79], les rongeurs (cobaye [80], [81] et souris sans poils [82]), ainsi que la peau de lapin [83]. Il est largement reconnu et référencé que la peau porcine offre des données comparables à celles obtenues avec la peau humaine excisée en raison de leur similarité structurelle, ce qui en fait un choix privilégié dans les études récentes [22, 57]. En outre, l'utilisation de peau animale excisée fraîche offre l'avantage d'une moindre variabilité par rapport aux échantillons de peau humaine excisée [26].

Cependant, depuis 2010, la directive 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques encourage fortement l'application du principe des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement). Le principe du "Remplacement" consiste à substituer des matériaux insensibles aux animaux conscients. La "Réduction" vise à réduire le nombre d'animaux utilisés tout en obtenant des informations équivalentes en quantité et en précision. Le "Raffinement" vise à réduire l'impact ou la sévérité des procédures inhumaines appliquées aux animaux encore nécessaires. Cette directive doit être prise en compte lors de la sélection des approches d'essai à utiliser dans les tests réglementaires des produits médicinaux humains et vétérinaires. De plus, depuis 2013, le 7e amendement à la directive sur les cosmétiques 76/768/CEE interdit les tests sur animaux, et depuis mars 2013, il est interdit de réaliser des tests sur animaux pour les produits cosmétiques dans l'Union Européenne.

I.2.4.2 Les modèles équivalents à la peau humaine (HSE) :

Les modèles équivalents à la peau humaine (HSE : Human Skin Equivalents) sont de plus en plus reconnus comme des alternatives précieuses pour les essais pharmacologiques et toxicologiques qui utilisent des tissus humains ou animaux. Les HSE offrent un potentiel scientifique et économique plus élevé, tout en évitant les problèmes éthiques associés à l'utilisation de tissus animaux [84]. Les modèles d'épiderme humain reconstruit (RHE : Reconstructed Human Epidermis) sont des HSE spécifiquement conçus pour reproduire histologiquement l'épiderme humain, comprenant la couche cornée (SC) et l'épiderme viable (EV), comme illustré dans la figure 4. Ils sont constitués de kératinocytes humains normaux

ensemencés sur une membrane semi-perméable en polycarbonate ou sur une matrice de collagène. Après une phase initiale de culture dans un milieu liquide, les RHE sont ensuite cultivés à l'interface air-liquide, où le côté apical (surface de la peau) est exposé à l'air tandis que le côté basal de la culture reste en contact avec le milieu de culture [85]. Cette exposition à l'air induit la différenciation et la stratification des cornéocytes, conduisant ainsi à la formation de la couche cornée [86]. Le temps total de culture nécessaire pour obtenir un RHE mature est d'environ 3 semaines.

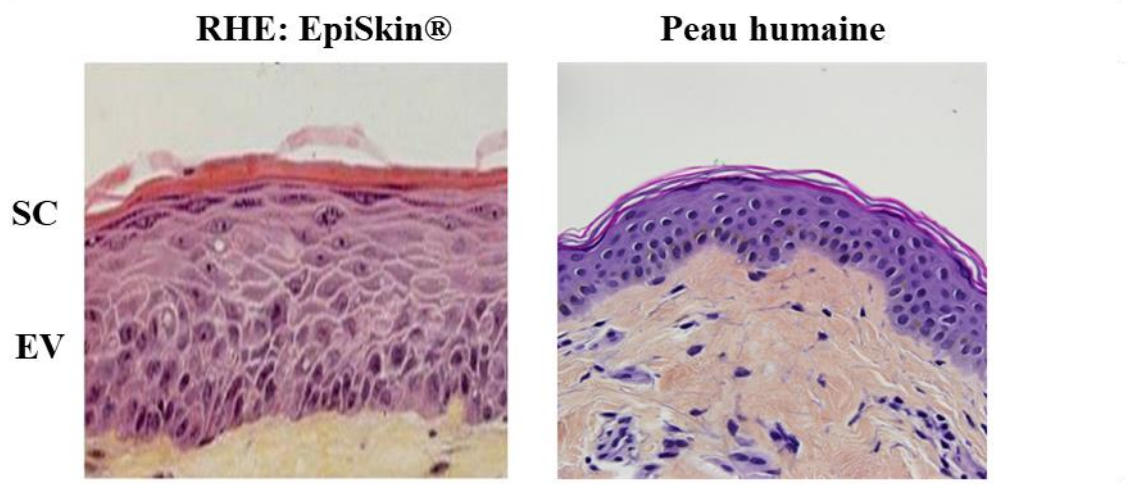


Figure 4: *Coupes histologiques (HE) d'un modèle d'épiderme reconstruit (EpiSkin®) et d'un explant de peau humaine (coloration à l'hématoxyline-éosine) [87].*

Un grand nombre de modèles RHE sont décrits dans la littérature scientifique, allant des modèles développés en interne dans les laboratoires de recherche académique aux modèles commerciaux optimisés par des groupes industriels depuis plus de 20 ans [84]. Les RHE, qui imitent la peau humaine normale, ont de nombreuses applications courantes, telles que les essais toxicologiques in vitro, les tests d'efficacité des produits topiques et les études de perméation cutanée [85]. Plusieurs RHE commerciaux ont été validés pour les essais in vitro d'irritation et de corrosion cutanée, et référencés dans les directives correspondantes de l'OCDE [88]. Bien qu'ils aient une barrière cutanée significativement plus perméable que les modèles de peau excisée [89, 90], les RHE restent utiles pour le criblage d'ingrédients actifs et/ou de formulations. Des études ont démontré des similitudes dans l'ordre de perméation entre les RHE et les explants de peau humaine [91, 92]. De plus, les RHE de haute qualité sont utiles pour les

études nécessitant une variabilité biologique plus faible que les modèles de peau excisée [89]. Cependant, les RHE ont l'inconvénient de devoir être utilisés peu de temps après leur fabrication. Le fabricant du modèle de peau commercial EpiSkin® recommande d'utiliser le modèle dans les 48 heures suivant sa réception. Pour les RHE cultivés en laboratoire, qui peuvent présenter une variabilité intra- et inter-lots plus importante en termes de formation de la barrière cutanée, les recommandations internes peuvent être encore plus strictes. Cette exigence limite considérablement la disponibilité des RHE pour le criblage de composés et/ou de formulations topiques, en raison du délai d'environ 3 semaines nécessaire pour leur synthèse et de leur coût élevé, surtout pour les RHE commerciaux. Cette contrainte contraste fortement avec la peau excisée, qui peut être conservée jusqu'à 3 mois à -20 °C avant d'être utilisée dans des expériences de perméation. Malgré la popularité croissante des HSE, les effets des conditions de stockage sur leur fonction barrière n'ont pas été largement étudiés.

I.2.4.3 Les modèles de peaux synthétiques :

Les modèles de peau synthétiques offrent une alternative pertinente aux modèles de peau biologiques, ce qui permet de surmonter les limitations liées à leur disponibilité et à leur stockage. Dans le domaine des études de perméation et de pénétration cutanée, les membranes synthétiques sont couramment utilisées. Parmi celles-ci, on trouve les membranes polymériques telles que les membranes en polycarbonate ou en polydiméthylsiloxane (PDMS), qui possèdent des propriétés de perméabilité contrôlée. Ces membranes peuvent être modifiées pour simuler différentes conditions cutanées, telles que l'épaisseur de la couche cornée ou la présence de lipides. Elles permettent ainsi de mesurer la vitesse de diffusion des substances à travers la barrière cutanée et de prédire leur potentiel de diffusion dans les tissus sous-jacents [93, 94].
Les membranes à base de cellulose, comme la cellulose régénérée et les membranes d'acétate de cellulose, sont également utilisées dans les tests de perméation cutanée. Elles possèdent des caractéristiques de perméabilité et de sélectivité similaires à celles de la peau humaine, ce qui en fait des outils fiables pour évaluer la diffusion, la distribution et le métabolisme des composés actifs présents dans les formulations cosmétiques et pharmaceutiques [93]. Les membranes en PolyEtherSulfone (PES) sont fréquemment employées dans les tests de perméation en raison de leurs excellentes propriétés de barrière et de leur compatibilité avec les applications biomédicales. Ces membranes offrent une structure poreuse régulière avec une taille de pore contrôlable, ce qui permet de simuler avec précision la perméabilité des substances à travers la peau humaine [95].

Plus récemment, les membranes Strat-M® (Merck Millipore) ont été développées dans le but d'étudier la perméation d'ingrédients actifs à la fois lipophiles et hydrophiles [96, 97]. Ces membranes Strat-M® sont constituées de plusieurs couches synthétiques de polymères ayant des densités différentes, imitant ainsi les différentes couches de la peau humaine comme le montre la figure 5. Ce qui distingue ces membranes, c'est leur fiabilité constante d'un lot à l'autre, ainsi que l'absence de problèmes de sécurité ou de limitations de stockage. Selon la littérature, elles se rapprochent le plus de la peau humaine excisée en termes de propriétés de barrière, ce qui en fait un substitut approprié [96–99]. Les études utilisant les membranes Strat-M® sont principalement axées sur la comparaison de la pénétration/perméation des produits chimiques dans des formulations contenant des agents de pénétration [96, 98, 99]. Cependant, leur utilisation pour évaluer la perméation des ingrédients actifs cosmétiques et pharmaceutiques (ACI/API) sans l'ajout d'agents de pénétration reste peu explorée.

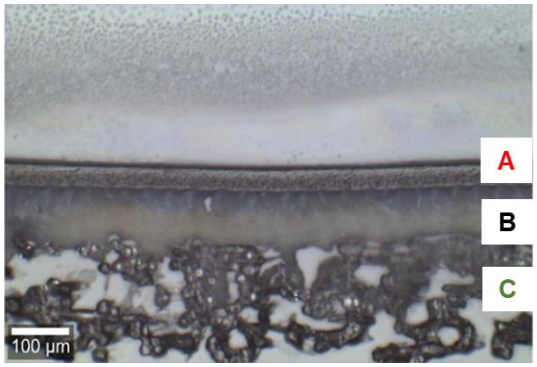


Figure 5: *Image représentative (10x) d'une coupe au cryomicrotome montrant les différentes couches (A, B, C) d'une membrane Strat-M®.*

Afin d'évaluer les études de perméation et de pénétration à travers différents modèles de peau, il est possible de calculer plusieurs paramètres mathématiques. Parmi ceux-ci, on retrouve le flux de diffusion à l'état stationnaire (Jss) des molécules dans la peau, les quantités cumulatives au fil du temps (Qn), le coefficient de perméabilité (Kp) qui reflète la vitesse de diffusion, ainsi que le temps de latence (tlag) qui représente le délai entre l'application du produit topique et l'atteinte de l'état stationnaire [23, 100, 101]. Ces paramètres mathématiques permettent de comparer différentes études de pénétration et de perméation impliquant diverses formulations, concentrations et promoteurs de pénétration.

I.2.5 Modélisation et représentation mathématique de la diffusion cutanée

La modélisation mathématique de la diffusion cutanée de molécules exogènes a pour objectif d'aider à la visualisation et au paramétrage des processus de pénétration, de perméation et de résorption. Elle permet également la comparaison des méthodologies expérimentales et la validation de nouvelles techniques analytiques. Des modèles mathématiques de complexité variable ont été développés pour établir un lien entre les différentes méthodologies expérimentales et les exigences législatives en matière d'approbation des protocoles.

Dans le cadre de l'administration topique et transdermique, le Stratum Corneum (SC) est traditionnellement considéré comme la principale barrière pour la plupart des produits chimiques exogènes. Dans sa forme la plus idéalisée, le SC est représenté comme une membrane homogène, sans tenir compte de sa complexité biologique. De plus, pour modéliser la diffusion à travers le SC, des simplifications supplémentaires sont appliquées, notamment :

(i) La modélisation du donneur (molécule + formulation/véhicule) appliqué à la surface du SC comme un réservoir très grand et bien agité, ce qui implique que la dose de la molécule à la surface du SC reste "infinie" ou non épuisée pendant toute la durée de l'expérience.

(ii) L'hypothèse des conditions de sink, supposant une diffusion rapide de la molécule vers l'interface entre le SC et l'épiderme viable.

Cette représentation idéalisée est illustrée dans la figure 6. Dans cette représentation, les deux processus physiques qui régissent le transport d'une molécule à travers le SC sont la répartition à l'équilibre entre les interfaces et la diffusion passive au sein du SC homogène. Lorsque la diffusion à travers le SC s'est produite pendant un temps suffisant, de sorte que le gradient de concentration de la molécule à travers le SC est constant, indiquant un état stationnaire, la diffusion peut être modélisée à l'aide de la 1ère loi de Fick. En appliquant cette loi à un SC homogène qui respect les conditions de sink , on obtient [102] :

$$J_{SS} = \frac{D_{SC}}{h_{SC}} \Delta C_{SC} \quad \textbf{(1)}$$

J_{SS} est le flux de diffusion à l'état stationnaire. « D_{SC} » est le coefficient de diffusion (m^2/s). « h_{SC} » est l'épaisseur du SC et ΔC_{SC} = C (x = 0, t) - C (x = h_{SC}, t) est la différence de concentration de la molécules diffusée dans le SC. Dans des conditions de sink C (x = h_{SC}, t) =

0. $\Delta C_{SC} = C\ (x = 0, t) = C_D$; « C_D » correspond à la concentration du donneur. $K_{D/SC}$ correspond au coefficient de partition.

L'équation 2 peut être, donc réécrite comme suit :

$$J_{SS} = \frac{K_{D/SC} D_{SC}}{h_{SC}} C_D \quad \textbf{(3)}$$

Le coefficient de perméabilité à l'état stationnaire 'Kp', est défini comme suit :

$$K_p = \frac{K_{D/SC} D_{SC}}{h_{SC}} \quad \textbf{(4)}$$

En remplaçant les termes de l'équation 4 dans l'équation 3, le flux à l'état stationnaire peut s'écrire comme suit :

$$J_{SS} = K_p C_D \quad \textbf{(5)}$$

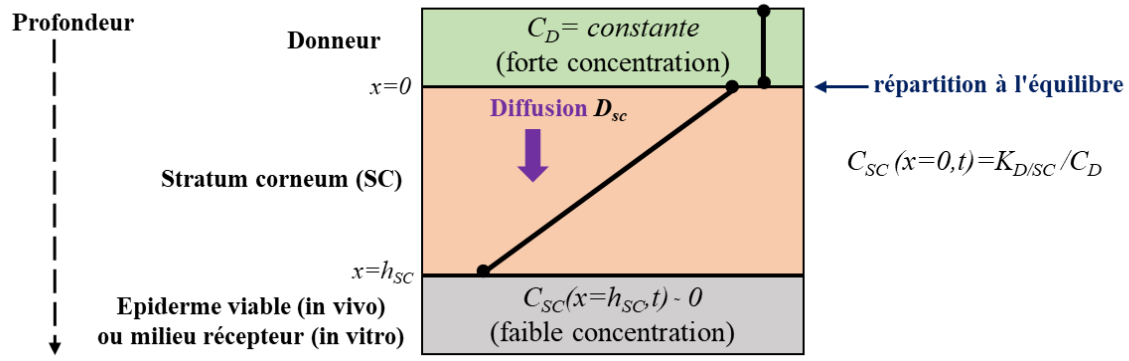


Figure 6: *Représentation schématique de la diffusion dans et à travers le Stratum Corneum (SC) [100].*

Pour une substance donnée, le coefficient de perméabilité Kp dépend du véhicule ou de la formulation appliquée sur la peau. Afin de limiter l'influence du donneur, il est recommandé d'utiliser le flux maximal à l'état stationnaire, appelé « $J_{MAX,SS}$ », qui se produit lorsque la substance est présente à une concentration saturée dans le donneur, en équilibre avec sa concentration dans le SC [103]. On peut donc décrire le flux maximal « $J_{MAX,SS}$ » avec l'équation suivante :

$$J_{MAX,SS} = \frac{S_D D_{SC}}{h_{SC}} = K_P S_D \quad \textbf{(6)}$$

Où S_D est la solubilité de la molécule dans le véhicule/formulation appliquée. En comparant les équations. 5 et 6, le flux maximal peut être estimé à partir du flux à l'état stationnaire en utilisant :

$$J_{\mathrm{MAX,SS}} = J_{\mathrm{SS}} \frac{S_{\mathrm{D}}}{C_{\mathrm{D}}} \quad \textbf{(7)}$$

La variation de concentration de la molécule dans le SC en fonction de la profondeur et du temps est régie par l'équation de diffusion, également connue sous le nom de la 2ème loi de Fick :

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D_{\mathrm{SC}} \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad \textbf{(8)}$$

En appliquant les conditions aux limites :

(i) Condition initiale : C (x, t=0) =0 ;

(ii) Concentration constante du donneur : C (x=0, t) =$K_{D/SC}$ C_D

(iii) Les conditions de sink à l'interface EV/SC : C (x=h_{SC}, t) =0.

La solution de l'équation 8 est :

$$C(x,t) = K_{\mathrm{D/SC}} C_{\mathrm{D}} \left[1 - \frac{x}{h_{\mathrm{SC}}} - \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} sin\left(n\pi \frac{x}{h_{\mathrm{SC}}}\right) exp\left(-\frac{t}{t_{\mathrm{D}}} \pi^2 n^2\right)\right] \quad \textbf{(9)}$$

Où t_D=(h^2_{SC}) / D_{SC} représente le temps de diffusion dans le SC.

A l'état stationnaire, le terme de la somme non linéaire dans l'équation 9 peut être négligé. En conséquence l'équation 9 peut être récrite comme suit :

$$C(x) = K_{\mathrm{D/SC}} C_{\mathrm{D}} \left[1 - \frac{x}{h_{\mathrm{SC}}}\right] \quad \textbf{(10)}$$

Les équations 9 et 10 peuvent être utilisées pour extraire des paramètres de diffusion tels que $K_{D/SC}$ et D_{SC} à partir des profils de concentration en fonction de la profondeur dans le SC, qui peuvent être obtenus, par exemple, à partir d'expériences de tape stripping.

Dans les études expérimentales d'administration topique ou transdermique, il est courant de rapporter la quantité cumulative de la molécule diffusée à travers la peau en fonction du temps [102]:

$$Q(t) = A\int_0^t Jdt = A\int_0^t -D_{SC}\frac{\partial C(x=h_{SC},t)}{\partial x}dt = AK_{D/SC}C_D h_{SC}\left[\frac{t}{t_D} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2}\sum_{n=1}^{\infty}\frac{(-1)^n}{n^2}exp\left(-\frac{t}{t_D}\pi^2 n^2\right)\right] \quad \textbf{(11)}$$

À l'état stationnaire, l'équation 11 se simplifie et donne :

$$Q_{SS}(t) = \frac{\frac{AK_D C_D h_{SC}}{SC}}{t_D}\left(t - \frac{t_D}{6}\right) = \frac{AK_{D/SC}C_D D_{SC}}{h_{SC}}\left(t - \frac{h_{SC}^2}{6D_{SC}}\right) \quad \textbf{(12)}$$

En utilisant les équations 4 et 5 et $t_{LAG} = h_{SC}^2/6D_{SC}$ l'équation 12 peut être récrite comme suit :

$$Q_{SS}(t) = AJ_{SS}(t - t_{LAG}) = AK_P C_D(t - t_{LAG}) \quad \textbf{(13)}$$

L'équation 13 est fréquemment employée pour ajuster la portion linéaire des courbes de quantité cumulative obtenues par quantification à l'aide de différentes techniques analytiques en fonction du temps, tel qu'illustré dans la Figure 7.

Le flux à l'état stationnaire J_{SS} correspond à la pente de la phase linéaire, tandis que t_{lag} représente le point d'intersection de la portion linéaire de la courbe avec l'axe des abscisses. Pour une approche plus rigoureuse, l'équation 11 peut être ajustée à l'ensemble de la courbe de quantité cumulative en fonction du temps, afin d'inclure la phase non linéaire des données. Bien que cette description mathématique de la fonction barrière cutanée soit simpliste, elle permet d'identifier des paramètres pour quantifier la pénétration et la perméation des composés appliqués par voie topique, tels que le coefficient de partition ($K_{D/SC}$), la constante de diffusion (D_{SC}), le flux de diffusion (J), le coefficient de perméabilité (Kp), la quantité cumulative d'ingrédients actifs à travers la peau Q(t) et le temps de latence (t_{lag}).

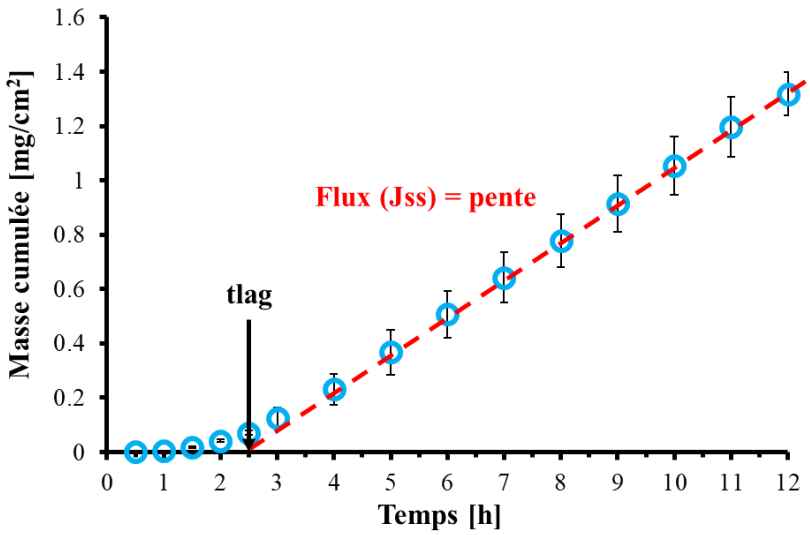


Figure 7: *Représentation graphique du flux à l'état stationnaire (JSS) et du temps de latence (tlag) sur une courbe d'évolution de masses cumulée en fonction du temps.*

I.3 Techniques analytiques pour la quantification de la perméation et de la pénétration cutanée

I.3.1 La chromatographie en phase liquide

La chromatographie en phase liquide (CPL), également appelée chromatographie liquide (CL), est une technique couramment utilisée pour l'analyse qualitative et quantitative de composés en mélange. Elle trouve des applications, entre autre, dans la confirmation des produits de réaction en synthèse organique, le suivi des molécules (actives) en milieu biologique, et le contrôle qualité des matières premières et des produits finis dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique [104].

I.3.1.1 Principe de la Chromatographie Liquide

Cette méthode de chromatographie repose sur la séparation des composés transportés par un liquide (phase mobile) à travers une substance solide divisée (phase stationnaire), qui peut être contenue dans un tube (colonne chromatographique) ou fixée sur une surface inerte. La séparation est réalisée en fonction des interactions physiques entre les analytes et la phase mobile, ainsi qu'entre les analytes et la phase stationnaire [105]. Il existe deux géométries de chromatographie, à savoir la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie sur colonne. Dans la suite, seule la chromatographie sur colonne sera considérée sous la forme de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

I.3.1.2 La Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) :

Dans cette technique, l'échantillon à analyser est entraîné par un liquide, appelé phase mobile, à travers une colonne remplie d'une fine substance solide, appelée phase stationnaire. L'HPLC utilise une pompe haute pression qui permet de maintenir un débit constant de la phase mobile à travers la colonne contenant la phase stationnaire. En réduisant le diamètre des particules de la phase stationnaire, on obtient des pics plus fins, ce qui améliore la résolution et réduit le seuil de détection. Cette combinaison de caractéristiques, à savoir une rapidité élevée et une résolution élevée, justifie l'appellation "haute performance" [105, 106].

I.3.1.3 Les différents types de chromatographie en phase liquide

Il existe diverses variantes de chromatographie en phase liquide, telles que la chromatographie d'adsorption, de partage, par échange, d'exclusion stérique et la chromatographie chirale. Le tableau I regroupe les différents types de chromatographie ainsi que leurs principes de fonctionnement.

Tableau I : Les différentes types de chromatographie en phase liquide et leurs principes de fonctionnement.

Type de chromatographie	**Principe**
La chromatographie (d'adsorption) en phase normale	Cette technique fait appel à une phase stationnaire solide possédant une capacité d'adsorption élevée, telle que l'oxyde d'aluminium, les silicates de magnésium ou la silice. Cette dernière est pratiquement la seule utilisée de nos jours, mais elle peut également être greffée de groupements polaires (alcool, amine). Les composés à séparer sont retenus à divers degrés à la surface de la phase stationnaire par adsorption physique en fonction de leur polarité.
La chromatographie (de partage) en phase inverse	La séparation des analytes repose sur leur solubilité dans la phase mobile. Cette affinité est influencée par la polarité des analytes et des phases employées. En mode normal, la phase stationnaire est de nature polaire, tandis qu'en mode inverse, elle est apolaire.

La chromatographie par échange d'ions	La phase solide de cette méthode est composée d'une résine insoluble contenant des groupes fonctionnels qui ont la capacité de se dissocier. Les échangeurs de cations sont généralement équipés de groupements d'acide sulfonique, tandis que les échangeurs d'anions comportent des groupements d'ammonium quaternaire
La chromatographie d'exclusion stérique	Elle permet la séparation des composés en fonction de leur taille moléculaire. La phase stationnaire est constituée d'un matériau poreux tel que des particules de silice ou de polymères. Les molécules dont le diamètre dépasse celui des pores ne peuvent pas pénétrer et sont donc exclues de la rétention. Le temps de rétention dans la colonne augmente à mesure que la taille des analytes diminue
La chromatographie chirale	Elle est basée sur l'établissement de liaisons non covalentes entre les énantiomères du composé à analyser et un adsorbant chromatographique chiral. Cela entraîne la formation de complexes diastéréoisomères qui présentent des affinités de liaison différentes. Cette technique est utilisée pour séparer les énantiomères, c'est-à-dire les formes stéréoisomères d'un composé qui sont des images miroir l'une de l'autre

I.3.1.4 Les différentes phases stationnaires :

I.3.1.4.1 Phase normale :

Les colonnes en phase normale sont composées d'une phase stationnaire présentant des caractéristiques polaires. La phase normale couramment utilisée est constituée de particules de silice sur lesquelles des groupes silanols et des groupes siloxanes sont présents. Ces groupes permettent à la silice de retenir les composés à analyser grâce à des liaisons hydrogène ou à des interactions dipôle-dipôle. La phase normale est principalement utilisée pour la séparation des composés peu polaires en raison du faible nombre de groupements polaires qu'ils contiennent [107].

I.3.1.4.2 Phase inverse :

La phase inverse utilise également des particules de silice comme support, tout comme la phase normale, mais toute la surface polaire est recouverte de chaînes alkyles attachées aux groupes silanols. Les groupes silanols restants peuvent entraîner des interactions hydrophiles indésirables, ce qui rend les résultats non reproductibles, en particulier pour les molécules basiques. Pour éviter cela, la surface de la silice est généralement recouverte d'une fonction méthyle. Cette étape est appelée "end-capping". Les fonctions chimiques utilisées pour l'end-capping peuvent varier, et les colonnes de dernière génération, conçues pour résister à des pH extrêmes, sont généralement greffées avec des groupes offrant un encombrement stérique plus important. Selon le degré de greffage, une résolution plus ou moins élevée est obtenue. Cette phase stationnaire est appelée "inverse" car elle change de nature, passant d'une nature polaire et hydrophile à une nature apolaire et hydrophobe [107].

I.3.1.5 Appareillages et fonctionnement :

L'appareillage de base d'un système HPLC se compose de plusieurs modules [104], comme indiqué dans la figure 8. Chaque module joue un rôle bien spécifique :

I.3.1.5.1 Pompe :

La génération d'un flux constant de solvant à travers la colonne de séparation est assurée par la pompe à haute pression. Cette pompe est constituée de deux pistons alternatifs, d'un dispositif d'amortissement des pulsations, d'un système de purge et d'amorçage, d'électrovannes et d'un capteur de pression.

I.3.1.5.2 L'auto-injecteur :

Sa fonction consiste à injecter de manière précise et constante l'échantillon liquide dans le flux de solvant en amont de la colonne de séparation.

I.3.1.5.3 Colonne :

Son rôle est de sélectivement retenir les composés de l'échantillon en fonction de leurs interactions chimiques avec la phase stationnaire, après quoi les composés sont progressivement élués de la colonne.

I.3.1.5.4 Le détecteur :

Le détecteur est un appareil qui donne un signal proportionnel à la concentration des composés présents. Divers types de détecteurs sont employés en HPLC, comprenant des détecteurs

d'absorption UV-Visible, des détecteurs de fluorescence, et bien d'autres jusqu'au spectromètre de masse.

I.3.1.5.4.1 *Détecteur UV-Visible :*

Le détecteur utilisant l'absorption UV ou visible est couramment employé en HPLC afin de détecter et mesurer les analytes présents dans un échantillon. Comme tout spectrophotomètre UV-visible, Il repose sur la capacité des composés chimiques à absorber la lumière dans les gammes d'ultraviolets (UV) ou de lumière visible [108].

Principe : Le détecteur UV/visible se compose d'une lampe émettant une lumière polychromatique dans la plage des UV ou du visible, ainsi que d'une cellule de détection. Le détecteur UV classique est donc un spectrophotomètre dans lequel la cuve de l'échantillon a été remplacée par une cellule traversée en continu par le flux de la phase mobile sortant de la colonne. L'appareil mesure donc l'absorbance de la phase mobile et des composés séparés à une longueur d'onde fixe. Le tracé de cette absorbance en fonction du temps est le chromatogramme dans lequel la sortie de chaque composé séparé est visible par un pic dont la hauteur est proportionnelle à sa concentration.

Dans ces travaux de thèse, un détecteur à barrette de diodes a été utilisé. Le flux de la phase mobile à la sortie de la colonne traverse une cellule de détection qui est éclairée par une lampe polychromatique. La partie de la lumière qui n'a pas été absorbée par la solution est ensuite séparée en différentes longueurs d'onde qui sont détectées par une série de photodiodes. Le détecteur enregistre donc simultanément l'absorbance à un grand nombre de longueurs d'onde en fonction du temps. Ainsi, on peut afficher le résultat de la séparation sous la forme de chromatogrammes à différentes longueurs d'onde, permettant le choix optimal de celles-ci. On peut également afficher, pour chaque pic détecté, son spectre d'absorption UV-visible, ce qui peut contribuer à l'identification des composés.

Les détecteurs UV/visible sont largement utilisés en raison de leur polyvalence et de leur sensibilité élevée. Ils conviennent à une gamme étendue de composés chimiques et permettent une détection rapide et précise. Des détecteurs supplémentaires tels que les détecteurs de fluorescence ou de masse peuvent être utilisés en complément pour une analyse plus spécifique et sensible.

I.3.1.5.4.2 *Détecteur à fluorescence :*

Le détecteur de fluorescence est fréquemment employé en chromatographie liquide à haute performance (HPLC) afin de repérer et quantifier les composés fluorescents. Contrairement au

détecteur à absorption UV/visible qui évalue l'absorption de la lumière, le détecteur de fluorescence tire parti de la propriété de certains composés à émettre de la lumière fluorescente lorsqu'ils sont excités par une source lumineuse adaptée [109].

Principe : Le détecteur de fluorescence repose sur le principe de la spectroscopie de fluorescence. L'échantillon provenant de la colonne HPLC est exposé à une lumière d'excitation ayant une longueur d'onde spécifique. Certains composés fluorescents présents dans l'échantillon absorbent cette lumière d'excitation et passent à un état excité. Lorsqu'ils reviennent à leur état fondamental, ces composés émettent de la lumière fluorescente à une longueur d'onde plus longue et particulière à chaque composé. Le détecteur de fluorescence mesure ensuite l'intensité de la lumière fluorescente émise par les composés fluorescents à une longueur d'onde d'émission spécifique. La quantité de lumière détectée est approximativement proportionnelle à la concentration de ces composés dans l'échantillon. Les détecteurs de fluorescence offrent une sensibilité élevée et une grande sélectivité pour les composés fluorescents. Ils sont couramment utilisés pour analyser, des fluorophores, des substances fluorescentes naturelles, des marqueurs spécifiques et des dérivés fluorescents des analytes produits dans le but d'améliorer la sensibilité et la sélectivité de la détection. Les détecteurs de fluorescence sont particulièrement utiles lorsque l'échantillon contient des composés non fluorescents ou lorsque la sélectivité est essentielle pour éviter les interférences d'autres composés présents dans l'échantillon. En combinant la HPLC avec un détecteur de fluorescence, il est possible de détecter de manière précise et spécifique les composés fluorescents, ce qui en fait une méthode d'analyse puissante.

Il convient de souligner qu'il est possible de connecter plusieurs détecteurs en série ou en parallèle sur un même système chromatographique (voir figure 8), ce qui permet d'analyser un échantillon avec différents détecteurs qui se complètent souvent pour obtenir une analyse complète de l'échantillon.

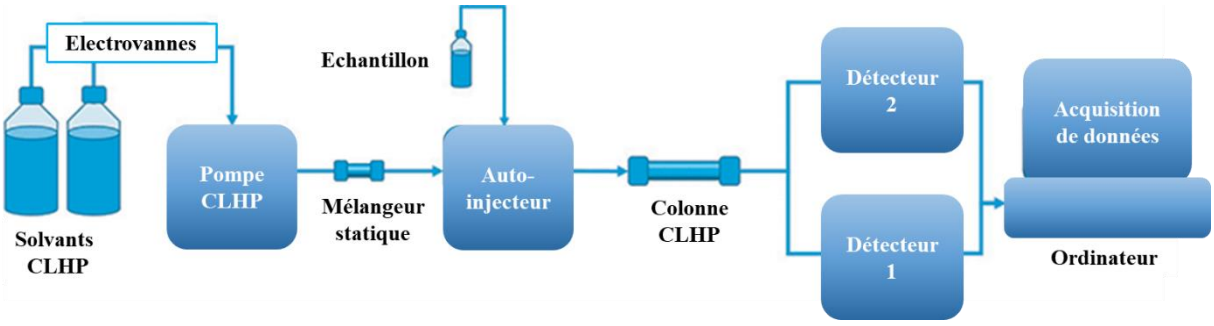


Figure 8: *Schéma représentatif d'appareillage de chromatographie à haute performance (HPLC).*

I.3.1.6 Grandeurs caractéristiques en chromatographie :

Le résultat obtenu lors d'une analyse HPLC est généralement présenté sous la forme d'un chromatogramme, qui est une courbe représentant le signal détecté en fonction du temps. Le chromatogramme se compose de plusieurs pics de forme gaussienne, chacun possédant ses propres caractéristiques distinctes [107] :

(i) Le temps de rétention, symbolisé par t_R, fait référence au moment où le pic atteint son point culminant. Le temps de rétention nul, également connu sous le nom de t_M, est le temps associé à un composé qui n'est pas retenu par le processus de chromatographie.

(ii) Le facteur de rétention k du pic, par la formule

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_R} \quad \textbf{(14)}$$

(iii) La sélectivité α entre deux pics 1 et 2 (2 étant plus retenu que 1), est exprimée par le rapport de leurs facteurs de rétention respectifs.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \textbf{(15)}$$

La sélectivité α mesure le potentiel de la colonne à séparer les temps de rétention des pics. La valeur de α est toujours supérieure (ou égale) à 1. Plus cette valeur est grande, plus il sera facile de séparer les deux composés, à condition toutefois qu'ils soient retenus.

(iv) La largeur du pic peut être évaluée grâce à la mesure du pic à mi-hauteur notée « $W_{1/2}$ ».

À partir de là, il est possible de calculer plusieurs propriétés de la colonne qui influencent la séparation des pics chromatographiques :

(v) L'efficacité N ou nombre de plateaux théoriques est reliée à la largeur du pic par la formule.

$$N = 16 \cdot \frac{{t_R}^2}{W^2} = 5{,}54 \cdot \frac{{t_R}^2}{{W_{1/2}}^2} \quad \textbf{(16)}$$

À partir de cette mesure, il est possible de calculer la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) « H », qui est utilisée pour comparer des colonnes de longueurs différentes.

$$H = \frac{L}{N} \quad \textbf{(17)}$$

(vi) La résolution R_S entre les pics 1 et 2 est déterminée en utilisant la formule suivante :

$$R_S = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\omega_1 + \omega_2} \quad \textbf{(18)}$$

La mesure de la résolution évalue la qualité de la séparation des deux pics en comparant l'écart entre les temps de rétention avec la largeur moyenne d'un pic à la base. Quand la résolution est supérieure à 1,5, on peut considérer que le signal redescend à la ligne de base entre les deux pics (pour des pics de même taille). La résolution, telle que définie, est l'objectif principal de la chromatographie pour obtenir une séparation des composés. Elle dépend des trois caractéristiques mentionnées précédemment : l'efficacité, la sélectivité et la rétention. Alors que la résolution est expérimentalement déterminée à partir des temps de rétention et largeurs des pics selon l'équation **(18)**, on peut démontrer l'importance de l'efficacité, de la sélectivité et de la rétention par cette équation dérivée :

$$R_{S1,2} = \frac{1}{2} \cdot \sqrt{N} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \cdot \frac{\bar{k}}{1 + \bar{k}} \quad \textbf{(19)}$$

À partir de l'équation 19, on peut donc dire que pour obtenir une bonne résolution (Rs > 2), il faut que : (i) les composés soient correctement retenus (k > 1, de préférence plus), (ii) l'efficacité de la colonne soit correcte (par exemple N > 5 000 pour une colonne de 15 cm remplie de particules de 5 µm), (iii) si nécessaire, améliorer la sélectivité en modifiant le type de phase mobile (solvant fort, pH) ou le type de colonne.

I.3.2 La Spectroscopie Raman

Dans les années 1920-30, un phénomène optique appelé la diffusion inélastique de la lumière a été théoriquement prédit en 1923 par le scientifique autrichien Adolf Smekal. Par la suite, en 1928, deux physiciens, Leonid Mandelstam (soviétique) et Chandrasekhara Venkata Raman (indien), l'ont confirmé expérimentalement de manière indépendante [110, 111]. Les travaux de M. Raman sur la diffusion de la lumière lui ont valu le prix Nobel en 1930, et le phénomène a été nommé en son honneur. Depuis l'introduction des sources monochromatiques de lumière, notamment les lasers, la spectroscopie Raman, qui exploite ce phénomène, s'est répandue dans l'industrie et la recherche.

I.3.2.1 Principe

Lorsqu'un échantillon est irradié par une source lumineuse monochromatique, plusieurs scénarios d'interaction entre la lumière et la matière peuvent se produire. En effet, la majorité des photons subissent une diffusion élastique de type Rayleigh, où l'énergie des photons diffusés reste inchangée par rapport aux photons incidents ($h\nu_{diff} = h\nu_0$). Cependant, deux autres effets de diffusion inélastique, caractérisés par des modifications de fréquence, peuvent également se produire. Ces phénomènes sont connus sous le nom de diffusion Raman Stokes, avec une perte d'énergie du photon diffusé ($h\nu_{diff} = h\nu_0 - h\nu_{vib}$), mais un gain d'énergie par la molécule qui en profite pour activer l'une de ses vibrations, et de diffusion Raman anti-Stokes, avec un gain d'énergie du photon diffusé ($h\nu_{diff} = h\nu_0 + h\nu_{vib}$) qui est reçu par la molécule (voir Figure 9). Bien que des approches avancées, telles que celles décrites par la loi de distribution de Maxwell-Boltzmann, permettent de comprendre en détail la répartition des niveaux d'énergie d'une molécule [112], une interprétation simplifiée de l'effet Raman Stokes peut être proposée en utilisant le diagramme de Jablonski (Figure 10).

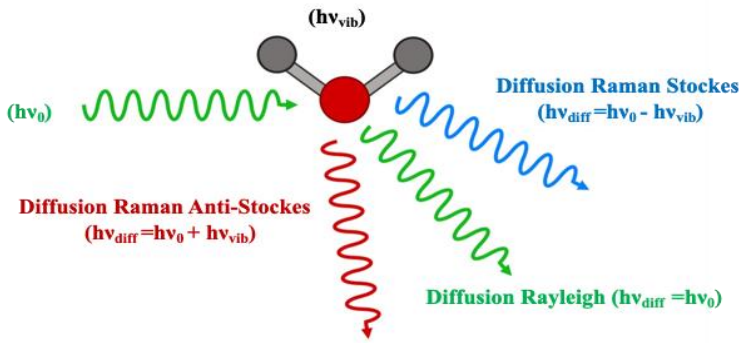


Figure 9: *Phénomènes de diffusion de photons.*

Étant donné que l'effet Raman Stokes a une probabilité plus élevée à des températures modérées, lorsqu'on réalise une analyse par spectroscopie Raman, on mesure généralement l'effet Stokes, qui fournit une plus grande quantité de photons par rapport à l'effet anti-Stokes, qui est davantage utilisé pour l'étude des phénomènes thermiques. Il est important de souligner que l'effet Raman est un phénomène de faible probabilité, où environ un photon sur 10^8 est impliqué [112], ce qui explique la réputation de la spectroscopie Raman en tant que technique peu sensible. Les récents progrès dans le développement des sources laser d'une part, et des systèmes de détection d'autre part, ont permis d'obtenir un nombre suffisant de photons Raman,

ouvrant ainsi de nouvelles possibilités d'applications, y compris le développement de la micro-spectroscopie confocale Raman (CRM, comme confocal Raman microspectroscopy).

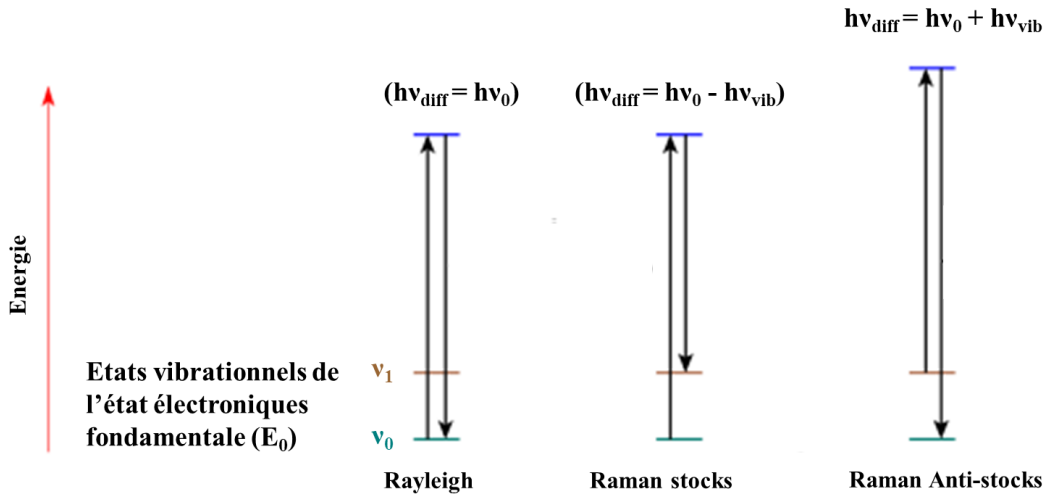


Figure 10: *Diagramme de Jablonski mettant en évidence les différences entre les différents phénomènes de diffusion de photons.*

I.3.2.2 Appareillage et fonctionnement

La micro-spectroscopie Raman confocale (CRM) est apparue au cours des dernières décennies comme un outil puissant dans la recherche biologique, offrant un potentiel de traduction clinique [113, 114]. En fournissant des bandes correspondant aux vibrations des liaisons moléculaires [115], un spectre Raman fournit une empreinte caractéristique de la structure moléculaire, ce qui permet de la reconnaître même au sein d'échantillons complexes et d'analyser leur composition chimique.

Un micro-spectromètre Raman confocal se compose de six éléments principaux (voir Figure 11). Tout d'abord, il comprend une (ou plusieurs) source(s) laser (1) utilisée(s) pour l'excitation des échantillons. Les sources lumineuses utilisées en spectroscopie Raman sont des lasers fournissant une lumière monochromatique qui est purifiée de ces raies secondaires à l'aide de filtres interférentiels. Ensuite, il comprend un microscope confocal équipé d'un objectif (2) qui permet de focaliser le faisceau laser sur l'échantillon placé sur une platine motorisée en XYZ (3) et de recueillir la lumière diffusée par celui-ci.

Un filtre Notch ou Edge est également intégré (4) pour éliminer la composante Rayleigh (ν_0) de la lumière diffusée, ne laissant passer que la composante Raman Stokes (ν_0-ν_{vib}). De plus, le système comprend un dispositif de séparation des longueurs d'onde, généralement un réseau dispersif (5), qui permet d'analyser distinctement les différents photons Raman, lesquels se regroupent en plusieurs dizaines de bandes. Enfin, un système de détection de type CCD (6) est utilisé pour générer les spectres Raman, dont l'intensité est exprimée en unités arbitraires (u.a.) et la position est exprimée en cm^{-1}, représentant les décalages des ν_{diff} par rapport à ν_0 (ν_0 étant défini comme égal à 0 cm^{-1}). La figure 11 présente une représentation schématique simplifiée des principaux composants du micro-spectromètre Raman ainsi que le trajet optique de la lumière.

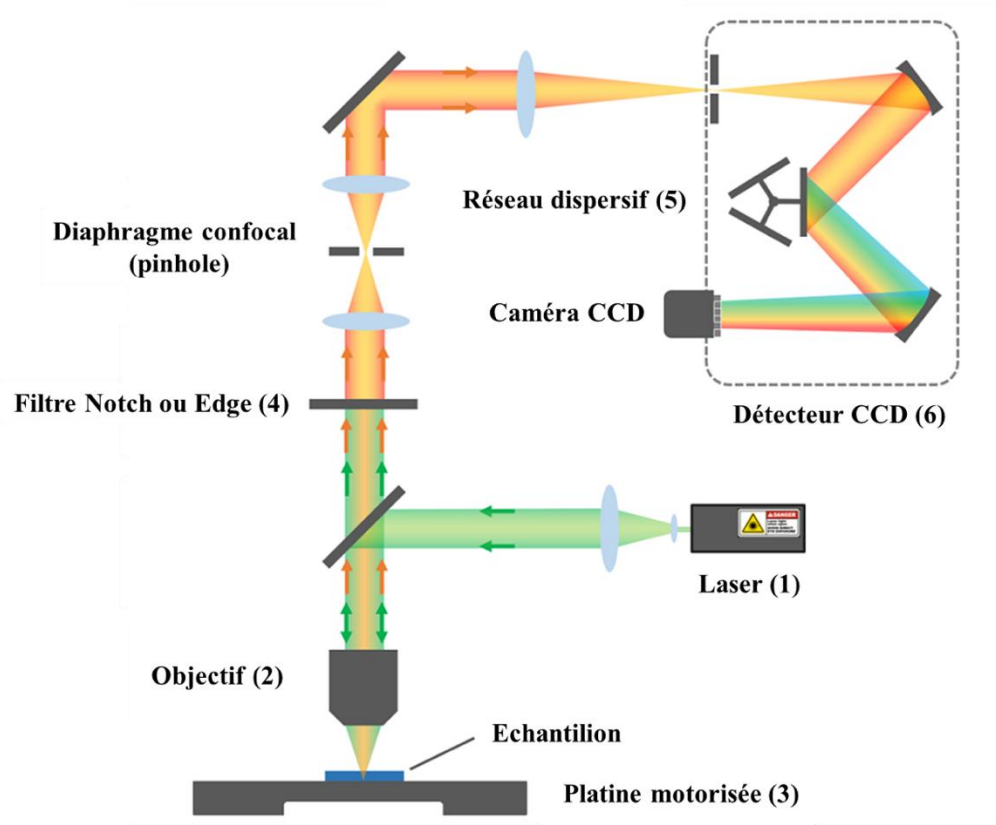


Figure 11: *Représentation schématique des principaux composants du micro-spectromètre Raman.*

Un micro-spectromètre peut être utilisé en mode confocal pour cartographier de petites zones d'échantillon avec une résolution spatiale micrométrique [116]. Cette résolution dépend de la longueur d'onde du laser utilisé, mais peut être ajustée plus précisément en fonction des caractéristiques de l'objectif choisi (ouverture numérique) et de l'ouverture réglable du diaphragme confocal (pinhole) ou d'un autre type de filtre spatial (détaillés plus bas). La confocalité signifie que l'excitation lumineuse et la collecte de la lumière Raman se font à

travers le même objectif. Le filtre spatial est utilisé pour exclure les photons provenant des zones d'échantillon hors du plan focal, réduisant ainsi principalement la résolution axiale et légèrement la résolution latérale [117, 118]. La résolution latérale fait référence à la capacité du système à distinguer les détails fins dans les images et peut être calculée en utilisant la formule de Rayleigh, comme suit :

$$Résolution\ latérale = \frac{0{,}61\,\lambda}{NA} \quad \textbf{(20)}$$

Où λ représente la longueur d'onde de la lumière utilisée et NA représente l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

I.3.2.2.1 *Détecteurs :*

Un détecteur de dispositif à couplage de charge (CCD) est utilisé. Il s'agit d'un détecteur de photons très sensible, adapté à l'analyse du signal Raman intrinsèquement faible dans les domaines de l'UV, du visible et du proche infrarouge. Un CCD est composé d'un grand nombre de petites zones sensibles à la lumière appelées pixels [117].

I.3.2.2.2 Réseau dispersif :

Le réseau de diffraction réfléchit chaque longueur d'onde à un angle différent. La capacité de résolution du réseau est déterminée par le nombre de traits par millimètre (traits/mm) présents sur sa surface, pouvant varier de 300 à 3600 traits/mm. Un réseau de 300 traits/mm offre une résolution plus faible, tandis qu'un réseau de 3600 traits/mm peut offrir une résolution plus élevée. La résolution spectrale dépend également de la longueur d'onde du laser utilisé et de la longueur focale du spectromètre.

I.3.2.2.3 Filtres :

Un filtre de type Edge, également appelé "passe-haut", est généralement utilisé pour éliminer la composante Rayleigh correspondant à la longueur d'onde du laser. Ce filtre ne transmet que les longueurs d'onde supérieures à celle du laser. Les filtres de type Notch, quant à eux, créent une coupure spectrale en forme d'encoche centrée sur la longueur d'onde du laser. Ils permettent ainsi la mesure des raies Stokes et anti-Stokes, mais leur utilisation devient moins courante en raison de leur durée de vie courte (quelques années) [119].

I.3.3 Avantages de la Micro-spectroscopie Raman Confocale (CRM)

La micro-spectroscopie Raman confocale (CRM), contrairement à la spectroscopie Raman classique (non confocale), permet de réduire les signaux indésirables tout en améliorant la résolution axiale des spectres Raman enregistrés. Dans cette configuration, le diaphragme confocal, également appelé pinhole, est spécialement conçu pour privilégier la collecte du signal provenant d'un petit volume appelé voxel, situé sur le plan focal de l'objectif, comme illustré dans la Figure 12 [112, 118]. L'objectif est utilisé pour concentrer la lumière sur l'échantillon et collecter la lumière rétrodiffusée. Il doit avoir une grande ouverture numérique (NA) afin d'obtenir de petits voxels tout en collectant autant de lumière rétrodiffusée que possible. En utilisant une platine motorisée, il est possible de déplacer l'échantillon dans les trois directions (X, Y, Z), ce qui permet de réaliser des mesures à différentes positions. La résolution axiale peut être calculée selon la formule de Berek, qui dépend de la NA et le grossissement des objectifs, comme présenté dans l'équation 21.

$$Résolution\ axiale = \frac{350}{NA+M} + \frac{0{,}275}{NA^2} \quad \textbf{(21)}$$

Où M est le grossissement total qui correspond au grossissement de l'objectif multiplié par le grossissement de l'oculaire.

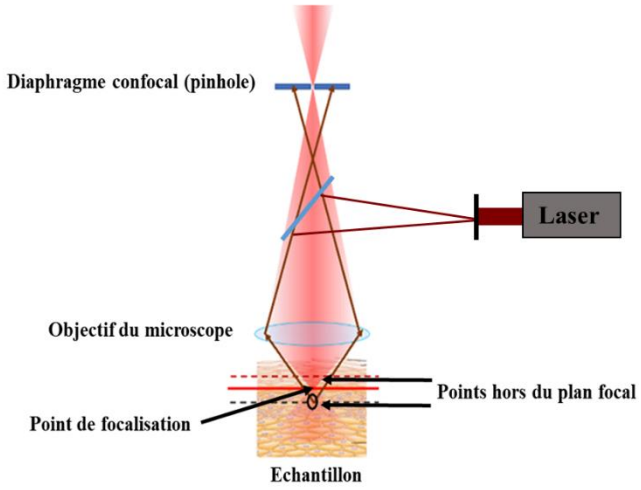


Figure 12: *Schéma représentant le principe de confocalité.*

I.3.3.1 La micro-spectroscopie Raman pour la caractérisation biochimique de la peau

Les premières études spectroscopiques Raman de la peau ont été effectuées en utilisant la technique de la spectroscopie macroscopique, à base de spectromètre Raman à transformée de Fourier (Raman-TF). Elles ont permis d'identifier les caractéristiques spectrales des composants biomoléculaires qui constituent la couche cornée à partir d'échantillons de peau de cadavres [120–122]. L'introduction des détecteurs de dispositif à couplage de charge (CCD) hautement sensibles dans les années 1990 a entraîné l'utilisation de l'instrumentation Raman dispersif à l'échelle microscopique [123]. Cette méthode peut être utilisée en mode confocal, ce qui permet d'obtenir une résolution spatiale élevée des sous-structures biochimiques de la peau, qui sont plus facilement accessibles dans des sections de peau excisée. La Figure 7 présente un spectre représentatif de la peau humaine enregistré grâce à un laser opérant à une longueur d'onde de 532 nm. (a) dans la région d'empreintes digitales (400 - 1800 cm^{-1}) (b) dans la région des hauts nombres d'ondes (2500 - 3600 cm^{-1})

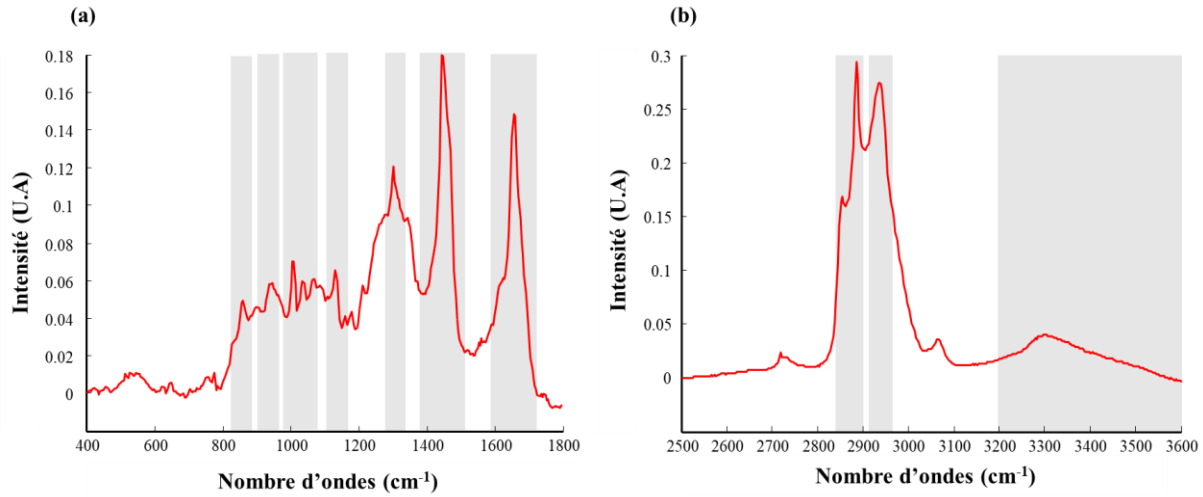


Figure 13: *Spectre représentatif de la peau humaine (a) dans la région d'empreintes digitales (400-1800 cm^{-1}). (b) dans la région de haut nombre d'ondes (2500-3600 cm^{-1}).*

Les spectres associés représentent les composants biochimiques de la peau, tels que les protéines, les lipides, les acides aminés. L'attribution des bandes Raman est représentée dans le tableau II.

Tableau II : Attribution des bandes Raman du stratum corneum, de l'épiderme et du derme. ν : élongation ; δ : déformation angulaire [124, 125].

Nombre d'ondes (cm^{-1})	Attribution des bandes
854	Doublet de Fermi - Tyrosine (cycle)

	Respiration du cycle - Tyrosine Élongation du cycle - prolines
919	(C-C) étirement du cycle de proline - collagène
958	ν (C-C) (hélice α) - cholestérol
1002 - 1005	Respiration symétrique du cycle aromatique - Phénylalanine
1027	ν (C-C) du squelette - lipides C-H Phénylalanine
1064	ν (C-C) Conformation squelettique trans des chaines carbonées des lipides
1127	ν (C-C) Lipides : chaîne hydrocarbonée trans Céramides
1157	ν (C-C), ρ CH_3, C-C vibration de la élongation squelettique – lipides, céramides
1207	ν (C-C_6-H_5) (cycle aromatique)- phénylalanine, tryptophane, Tyrosine et Amide III -protéines
1297 - 1302	δ (C-H) de l'Amide III - protéines
1339	ν (C-C, C-H) – Phénylalanine, Tryptophane
1440-1469	δ (CH_2) toute molécule organique
1655	ν(C=O) Amide I - protéines en hélice α
2854	ν(CH_2) symétrique - lipides
2885	ν(CH_2) asymétrique - protéines (Kératine)
2930	ν(CH_3) symétrique - lipides, céramides et cholestérol
2970	ν (CH_3) symétrique protéines ν (CH_3)C-H asymétrique (lipides)

3200 - 3600	ν (OH) de l'eau

ν : élongation ; δ : déformation angulaire

En 1998, Caspers et ses collègues ont effectué des analyses sur la composition biochimique de la peau, en utilisant la microscopie Raman confocale équipée d'un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 850 nm. Ils ont réalisé ces analyses sur des sections de peau humaine excisée, mettant ainsi en évidence que le stratum corneum est principalement composé de kératine, tandis que le derme affiche une signature marquée du collagène [126]. De plus, l'étude menée par Caspers et ses collègues a démontré que la microscopie Raman confocale pouvait être utilisée pour effectuer un profilage en profondeur, également appelé "section optique", de la composition biochimique de la peau in vivo. Cela a ouvert de nouvelles perspectives pour le suivi in situ / in vivo des processus dermatologiques [126].

Dans le cadre de l'analyse quantitative in vivo, Caspers et ses collègues ont entrepris en 2001 d'étudier la détermination des profils de concentration moléculaire dans la peau [127]. Ils ont mis au point une méthode basée sur l'ajustement des spectres de chaque région (la région de "l'empreinte digitale" et la région des hauts nombres d'ondes) en utilisant la méthode des moindres carrés. La région de "l'empreinte digitale" fait référence à la plage de longueurs d'onde de 400 à 1850 cm^{-1}, avec une longueur d'onde d'excitation de 850 nm et un signal Raman détecté entre environ 880 et 1000 nm. Les mesures dans la région de nombre d'onde élevé concernent la plage de 2500 à 3800 cm^{-1}, avec une longueur d'onde d'excitation de 730 nm et un signal Raman détecté entre environ 890 et 1010 nm. Cette approche permet de déterminer la composition de chaque région en combinant de manière pondérée les spectres des composants bruts constitutifs. Il convient de souligner que l'efficacité de diffusion Raman peut varier considérablement d'un composé à l'autre, ce qui facilite l'évaluation des contributions relatives. Dans cette étude, la concentration en eau dans la couche cornée a été déterminée en utilisant les rapports des bandes caractéristiques de l'eau et des protéines dans la région des hauts nombres d'onde, pondérés par une constante de proportionnalité établie à partir de mesures de protéines pures et d'eau (étalonnage externe). Les profils des principaux composants du facteur d'hydratation naturel (NMF), du lactate et de l'urée ont été déterminés de manière similaire. Afin de normaliser la réponse spectrale de l'eau et des protéines, un facteur de correction a été introduit. Les rapports normalisés eau/protéine ont été utilisés pour représenter le pourcentage de l'hydratation en fonction de la profondeur de la couche cornée. Cette approche permet d'obtenir une mesure directe et semi-quantitative de la quantité d'eau présente dans la couche

cornée à différentes profondeurs. Malgré la diminution de l'intensité du signal à mesure que le laser pénètre plus profondément dans la peau, l'utilisation du même balayage pour les pics d'eau et de protéines permet de quantifier l'hydratation sur l'ensemble de la plage d'analyse. En appliquant un algorithme au profil moyen d'eau collecté, il est possible d'estimer l'épaisseur du stratum corneum (SC) in vivo. Cette méthode a été validée en comparant les résultats obtenus directement par tomographie par cohérence optique (OCT) à partir de différents sites anatomiques [128, 129].

I.3.3.2 La micro-spectroscopie Raman appliquée à la pénétration et la perméation cutanée

I.3.3.2.1 In vitro :

Dans le cadre de l'application de la CRM in vitro, on distingue deux types d'analyses : (i) l'analyse en profondeur (profil en Z) et (ii) l'analyse sur coupes de peau réalisée au cryomicrotome. L'analyse en profondeur, également appelée profilage en Z, permet une caractérisation chimique en profondeur non destructive avec une grande sélectivité chimique. Cependant, elle présente certaines limites en termes de profondeur de pénétration, de signal faible, d'artefacts de surface et d'interférences spectrales. En tant qu'alternative, l'analyse sur coupes de peau réalisée au cryomicrotome a été explorée, car elle offre une haute résolution spatiale, préserve la structure tissulaire et permet une analyse non destructive. Toutefois, cette méthode nécessite du temps et de l'expertise, présente un potentiel de dégradation des échantillons et peut être sensible aux variations individuelles de la composition chimique de la peau. Dans ce contexte, la CRM a été largement utilisée dans les domaines pharmaceutique et cosmétique pour étudier la pénétration des molécules actives [130–135], ou pour étudier les effets des UV et des polluants sur la peau [136].

Dans ce contexte, Tfayli et al. ont montré que la CRM appliquée à des coupes de peaux excisées peut également être utilisée pour suivre et déterminer les profils de pénétration du métronidazole en fonction de la profondeur des échantillons de peau humaine [137]. De plus, un certain nombre d'études ont utilisé la caféine (petite molécule hydrophile) comme substance modèle de perméation pour démontrer le potentiel et la versatilité de la CRM en tant qu'outil de quantification de la perméation et de la pénétration cutanées d’ingrédients actifs [101, 135, 138–140].

La CRM a été aussi utilisée en tant qu’outils de cartographie spectrale pour la caractérisation biochimique et le suivi de la distribution d’actifs dans la peau. Dans ce contexte, Ali et al, ont utilisé la CRM couplée à une analyse de cluster k-means pour caractériser des coupes

transversales de peaux humaines [141]. Les résultats montrent que les spectres de chaque groupe représentent la combinaison des contributions de tous les composants constitutifs des différentes couches de la peau, permettant ainsi une différenciation distincte et caractéristique des différentes couches de la peau. Dans une autre étude, Stella et al, ont montré que l'association de la CRM (longueur d'onde du laser = 691nm) à une analyse multivariée peut être utilisée pour suivre la pénétration et la perméation des ingrédients cosmétiques actifs (ACI) après une application topique [142]. Cette étude démontre comment la méthode Résolution Multivariée de Courbes par Moindres Carrés Alternés (MCR-ALS) peut être appliquée pour détecter et décrire de manière semi-quantitative le profil de diffusion du Delipidol® (ACI amincissant), à partir de cartographies spectrales Raman.

Récemment, Lunter et Daniels ont réalisés une étude comparative entre la CRM (longueur d'onde du laser = 532 nm) et la perméation en cellule de Franz, visant l'étude de la pénétration de la procaïne formulée dans différents véhicules et appliquées sur de la peau de porc excisée [133]. Dans ce contexte, trois formulations d'hydrogel ont été testées (avec ou sans promoteur de pénétration), à cet effet les flux de diffusion, le coefficient de perméation et les masses pénétrées dans le SC ont été évalués. Les résultats en cellule de Franz montrent que le flux de la procaïne diffusée dans le SC s'est avéré similaire pour les trois véhicules, indépendamment de la présence d'un promoteur de pénétration. Les résultats CRM couplée à des approches chimiométriques, type K-means ont montré des résultats similaires aux expériences en cellule de diffusion de Franz sur la pénétration de la procaïne. La CRM donne une représentation directe des paramètres les plus pertinents, à savoir la quantité pénétrée et la profondeur de pénétration.

En résumé, la CRM révèle la composition biochimique de la peau et la répartition précise de l'actif dans ses différentes couches. Contrairement aux méthodes conventionnelles telles que la cellule de Franz et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) qui nécessitent une extraction de l'actif des tissus pour une évaluation quantitative **(voir section I.2.2.3. Mesure de la pénétration in vitro)**, la CRM offre une vision directe et détaillée de l'actif in situ, sans altération.

I.3.3.2.2 In vivo :

Les premières mesures in vivo par CRM ont été développées à partir des travaux de Caspers et al. Ces derniers ont créé une plateforme de mesure spécifique pour les études in vivo, remplaçant ainsi la platine classique des microscopes. Cette plateforme de mesure fait office de microscope inversé (Figure 14) [126]. Dans ce système, la région d'intérêt est positionnée sur

une fenêtre en CaF_2, montée horizontalement sur une platine en aluminium. Le laser est ensuite focalisé sur la peau à travers la fenêtre en CaF_2 à l'aide d'un objectif à immersion (63x/0.70, Leica). Cette configuration a notamment permis de minimiser les mouvements de la peau par rapport à l'objectif du microscope. En déplaçant verticalement l'objectif, il était possible d'ajuster la profondeur à laquelle le laser était focalisé dans la peau.

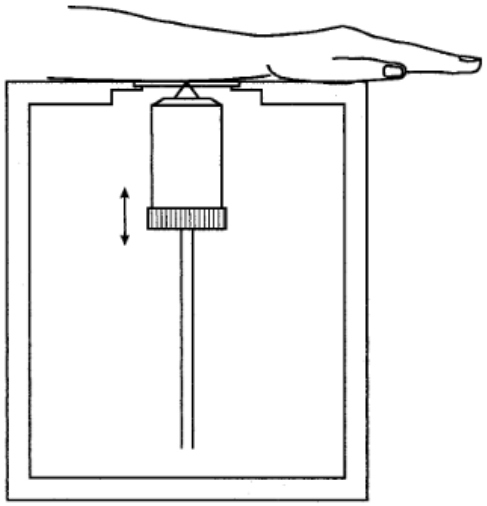


Figure 14: *Configuration d'un microscope inversé pour les mesures CRM in vivo [126].*

Depuis les développements de Caspers et de ses collègues, la CRM a été largement étudiée pour l'analyse in vivo de la peau humaine [126, 143], notamment pour examiner les effets de produits et ingrédients actifs hydratants [128, 129, 144–146]. De plus, la CRM a été utilisée pour suivre la perméation des phospholipides dans la peau [147]. Pudney et al, ont mené une étude de CRM sur la libération in vivo du trans-rétinol dans la peau [148], et cette étude a ensuite été étendue pour explorer les effets des agents favorisant la pénétration [149]. Mateus et al, ont réalisé une étude comparative directe entre la CRM in vivo et la méthode du tape stripping afin de suivre la pénétration de l'ibuprofène appliqué sur l'avant-bras de volontaires humains [134]. Les résultats ont montré une concordance entre les profils de distribution de l'ibuprofène dans la couche cornée analysés par CRM et ceux obtenus par tape stripping. En 2019, Caspers et al, ont présenté une méthodologie utilisant la CRM in vivo qui permet une quantification absolue des profils de pénétration des produits appliqués localement sur la peau [120]. Plus récemment, Iliopoulos et al, ont réalisé une étude comparative de la perméation de la niacinamide, appliquée sous forme de dose finie et de différentes formulations, dans la peau humaine in vitro en utilisant des cellules de Franz conventionnelles, et in vivo en utilisant une méthode CRM quantitative [122]. L'étude comparative in vitro / in vivo a révélé une excellente corrélation entre les quantités cumulées de niacinamide qui ont pénétré in vitro et les quantités mesurées in vivo

avec la CRM à une profondeur de 2 µm dans la couche cornée. De plus, une corrélation tout aussi solide a été observée entre les masses cumulées de niacinamide in vitro et la quantité totale qui a pénétré la couche cornée in vivo par unité de surface (µg/cm^2).

Il a été clairement démontré que la microscopie Raman confocale (CRM) est un outil efficace pour analyser la composition biochimique de la peau, à la fois in vitro et in vivo, ainsi que pour suivre la pénétration et la perméation des ingrédients actifs. Grâce à sa spécificité chimique, elle permet une identification et une localisation précises des produits dans la peau, et une analyse approfondie des profils spectraux peut même être utilisée pour suivre la cristallisation ou la métabolisation des actifs [135].

En résumé, la spectroscopie Raman confocale (CRM) est une technique qui permet de suivre la pénétration et la perméation de substances dans la peau en utilisant différents modèles, tels que des échantillons de peau excisée et des études in vivo. Cette méthode peut être comparée favorablement aux méthodes de références couramment utilisées, telles que les cellules de diffusion de Franz et le Tape stripping. Cependant, des limitations subsistent, notamment en ce qui concerne la zone d'analyse, qui est généralement limitée à des régions spécifiques comme l'avant-bras, et dépendent fortement de la molécule étudiée. Il est essentiel de souligner que la réponse Raman est étroitement liée à la structure chimique de la molécule. Ainsi, certaines molécules peuvent présenter un signal Raman très faible, ce qui rend leur détection difficile et peu fiable en termes de quantification. De plus, les similitudes structurelles entre certaines molécules et les composants biochimiques présents dans la peau peuvent entraîner un signal Raman similaire ou un chevauchement entre les deux, rendant ainsi la différenciation complexe à réaliser. Malgré les progrès réalisés dans le développement de méthodes de classification et de quantification basées sur des analyses statistiques et chimiométriques, il est important de souligner que des limitations subsistent dans l'utilisation de la CRM. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour déterminer et évaluer de manière précise les avantages et les performances de la spectroscopie Raman dans ce domaine.

I.3.4 Traitement de données : prétraitement et analyse multivariée :

Les spectres obtenus grâce à la spectroscopie Raman confocale (CRM) sur des échantillons complexes tels que la peau contienne une multitude d'informations complexes. Afin de garantir la fiabilité des expérimentations, un nombre important de répliques est réalisé et des milliers de spectres sont enregistrés. Selon les informations recherchées, il est souvent crucial de détecter de subtiles modifications, telles qu'un changement de conformation ou une faible concentration d’une molécule d’intérêt dans la peau. A cet effet, les spectres nécessitent

généralement un traitement précis et une analyse adaptée. C'est pourquoi la CRM est souvent associée à des techniques de prétraitement et d'analyse multivariée afin d'exploiter pleinement les données spectrales obtenues. Le prétraitement des données contribue à améliorer la qualité des spectres en réduisant les interférences et les variations indésirables. L'analyse multivariée regroupe un ensemble de techniques statistiques et mathématiques permettant d'extraire des informations précieuses à partir de données complexes. Dans le contexte de la spectroscopie Raman, l'analyse multivariée peut résoudre divers problèmes, tels que la quantification des composés d'intérêt, l'identification de substances inconnues, la détection de contaminants et la classification d'échantillons différents. La combinaison de la spectroscopie Raman et de l'analyse multivariée offre la possibilité d'obtenir des informations précises et fiables sur la composition et les propriétés des échantillons analysés. Cette association renforce l'argument en faveur de la reconnaissance officielle de la méthodologie de la microscopie Raman confocale pour la validation des produits pharmaceutiques et cosmétiques appliqués par voie topique. Cela ouvre ainsi de nombreuses perspectives dans des domaines tels que l'analyse pharmaceutique, la cosmétique et le contrôle de la qualité des produits.

I.3.4.1 Les méthodes de prétraitement :

Les spectres Raman renferment généralement une quantité considérable et complexe d'informations spectrales qui peuvent être extraites à l'aide de diverses méthodes chimiométriques. Ces méthodes, comprenant des approches mathématiques et statistiques, permettent la prédiction et la classification des données. Le prétraitement des données spectrales joue un rôle essentiel en éliminant le bruit de fond et les interférences, ce qui améliore la qualité des spectres et permet d'extraire toutes les informations pertinentes. Par exemple, l'effet de fond, pouvant être influencé par la nature de l'échantillon et le substrat utilisé, représente un défi expérimental pour son élimination. Pour y remédier, des méthodes itératives d'ajustement polynomial sont employées, telles que l'algorithme de Lieber et Mahadevan Jansen [150], la Normalisation Standard Variante (SNV) et le filtrage de Savitzky-Golay. La normalisation SNV élimine les variations de pente et les signaux de ligne de base additifs, tandis que le filtrage de Savitzky-Golay, utilisant des filtres polynomiaux du premier et du deuxième ordre, lisse les spectres en résolvant les pics superposés et en réduisant les variations de la ligne de base [150]. L'exemple illustré dans la Figure 15 présente l'application de l'algorithme de Lieber et Mahadevan pour le prétraitement des spectres enregistrés à partir d'explants de peau humaine. Ce prétraitement permet notamment de supprimer l'effet de fond lié au composé endogène fluorescent de la peau. Après le prétraitement, différentes méthodes multivariées

peuvent être utilisées pour extraire des informations qualitatives et quantitatives à partir des spectres Raman.

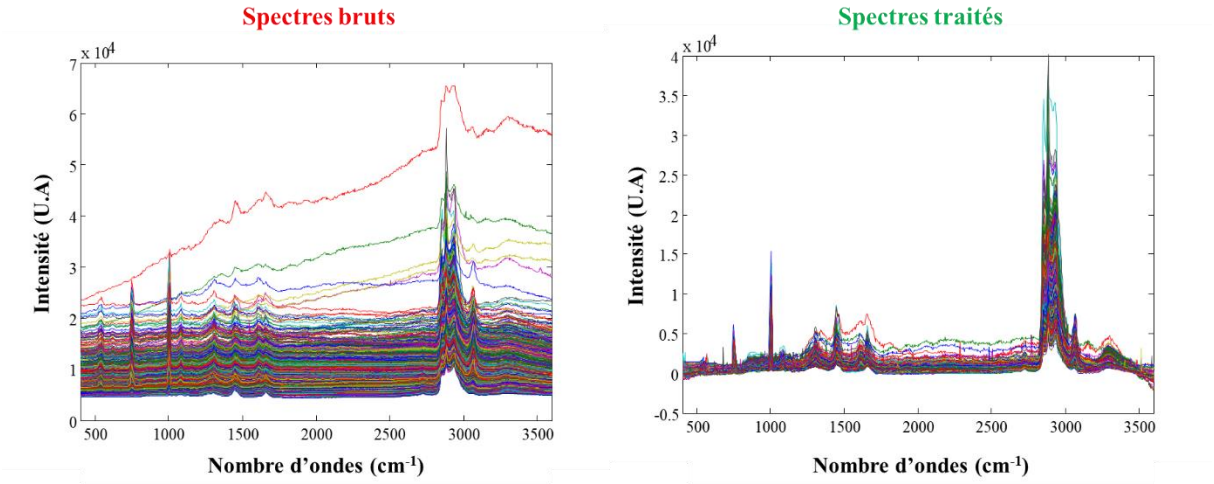


Figure 15: *Utilisation de l'algorithme de Lieber et Mahadevan pour prétraiter des spectres enregistrés à partir d'explants de peau humaine.*

I.3.4.1.1 Analyse en Composante Principale (ACP)

L'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une technique statistique largement utilisée en recherche pour l'analyse de jeux de données multivariés [151, 152]. Son objectif principal consiste à réduire la dimensionnalité des données tout en préservant au maximum les informations qu'elles contiennent. Pour ce faire, de nouvelles variables, appelées composantes principales (CPs), sont créées comme des combinaisons linéaires des variables d'origine. Les composantes principales sont classées selon leur capacité à expliquer la variabilité des données, permettant ainsi d'identifier celles qui sont les plus significatives pour décrire les différences et les relations entre les observations. Par exemple, CP1 représente la variance maximale dans les informations contenues dans l'ensemble de données, CP2 représente la variance suivante, et ainsi de suite [153]. La mesure de variabilité expliquée permet de quantifier l'importance de chaque composante dans la description des données. L'interprétation des composantes principales se fait en analysant les pondérations des variables d'origine dans chaque composante (loadings). De plus, l'ACP permet de visualiser les données dans un espace de dimension réduit, généralement en deux ou trois dimensions (graphique de scores), ce qui facilite la compréhension et l'interprétation des relations entre les observations. Cette représentation graphique met en évidence des structures, des tendances ou des regroupements dans les données

[154]. Le résultat de l'ACP est un modèle bilinéaire de scores T et de « loadings » P [155], qui peut être décrit comme suit :

$$X = TP + E = t_1 p_1 T + t_2 p_2 T + \cdots + t_A p_A T + E \quad \textbf{(21)}$$

Où X est une matrice de taille M × N, composée de M échantillons (lignes) avec N variables mesurées, A est le nombre de CP calculées. T et P, respectivement, sont composées de vecteurs orthogonaux et orthonormaux. E est une matrice de taille M × N contenant la variance non expliquée par les CPs (résidus). La figure 16 illustre un exemple d'application de l'ACP sur des spectres de la peau exposée ou non à un ingrédient actif (Résorcine).

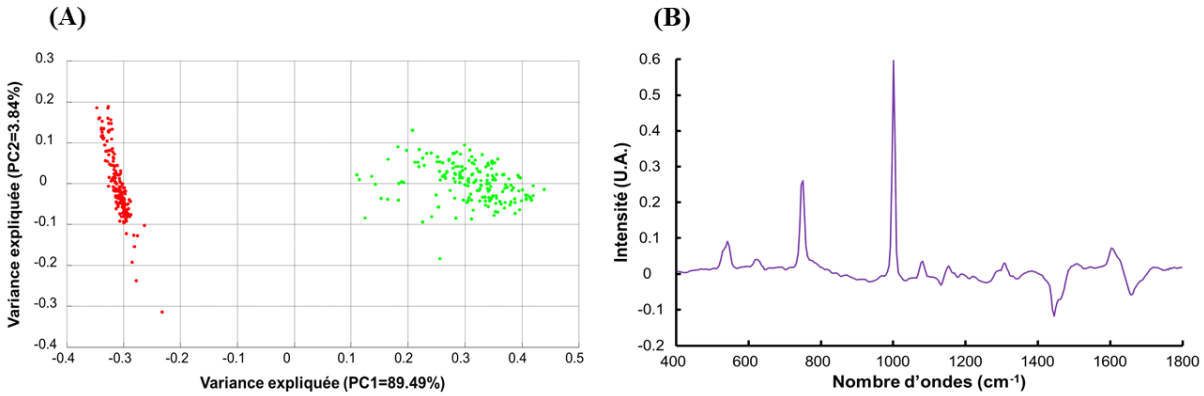


Figure 16: *ACP réalisée sur des spectres Raman de peau humaine. (A) nuages de points des scores de CP1 et CP2. (B) Loading de CP1.*

I.3.4.1.2 Régression des Moindres Carrées Partiels (PLSR)

La Régression partielle des moindres carrés (PLSR) est une méthode d'analyse statistique largement utilisée pour établir une relation entre un ensemble de variables indépendantes (X) et une variable dépendante (Y). Son application principale se trouve dans le domaine de l'analyse spectroscopique, où elle permet de prédire des quantités inconnues à partir de mesures spectrales. La PLSR constitue une extension de la régression linéaire multiple qui permet de traiter efficacement les cas où les variables indépendantes sont fortement corrélées entre elles [156]. De plus, la PLSR vise à maximiser la covariance entre l'information spectrale et les concentrations mesurées [156, 157]. Dans le modèle linéaire de la PLSR, les données sont généralement organisées en deux matrices, X et Y, représentant respectivement les variables indépendantes et la variable dépendante. Avant l'analyse, ces données sont soumises à une

transformation logarithmique, elles sont centrées et mises à l'échelle. Ensuite, elles sont décomposées en coordonnées factorielles T et U, comme illustré dans la Figure 17 [156].
Avant de réaliser une PLSR, la matrice X est convertie en une matrice de chargements (P') et une matrice de poids (W'), qui dépendent du nombre d'objets (N) et du nombre de composantes (A). Quant à la matrice Y, elle est organisée en une matrice de poids (C').

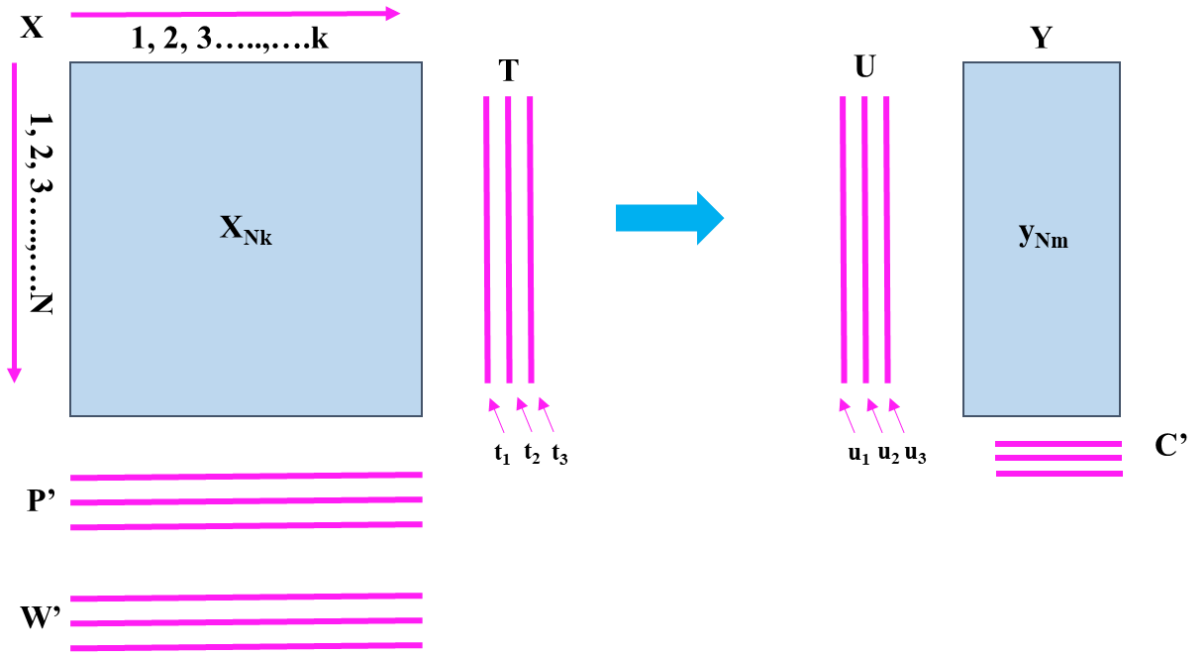


Figure 17: *Organisation des données avant la régression PLSR [155].*

Où T = (N × A) dans lequel les colonnes sont « t » (scores X) tandis que U = (N × A) dans lequel les colonnes sont « u » (scores Y).

La spécificité de la PLSR se manifeste à travers le vecteur de pondération ou coefficient de régression, qui indique les nombres d'ondes (variables) utilisés pour la quantification. Le coefficient de régression de la PLSR peut être calculé en fonction de la variance entre la réponse y et la matrice de données X, conformément à l'équation 22 [155]:

$$W_{PLS,1}^{T} = \frac{y^T X}{\|y^T X\|} \qquad \textbf{(22)}$$

Où, X est la matrice de données, y est la réponse et T est un vecteur orthogonal.

I.3.4.1.3 Les méthodes de validation croisée

Les méthodes de validation croisée (CV) sont utilisées dans la méthode PLSR afin d'effectuer une sélection optimale des variables prédictives [150]. Dans des conditions réelles, la construction d'un modèle prédictif optimal à l'aide d'ensembles de données indépendants (ensembles d'entraînement, de validation et de test) nécessite beaucoup de temps pour générer suffisamment de données.

À l'intérieur d'un ensemble de données, la sélection manuelle de l'ensemble de validation et de l'ensemble d'entraînement peut entraîner des biais et conduire à des résultats trop optimistes. C'est pourquoi la validation croisée est devenue une méthode couramment utilisée pour évaluer un modèle avec un nombre limité de données [158, 159].

Selon l'objectif souhaité, il existe différents types d'algorithmes de CV, tels que la « Leave K Out Cross Validation (LKOCV) » et la « Leave One Out CV (LOOCV) ». La LKOCV est la méthode la plus largement utilisée, car elle divise de manière aléatoire l'ensemble de données en sous-échantillons/segments de taille égale appelés K, où K ≤ n (nombre d'échantillons). Chaque segment est mis de côté une fois et utilisé comme ensemble de validation, tandis que les K-1 segments restants sont utilisés pour la prédiction [150]. Contrairement au LOOCV, qui exclut un objet à chaque itération et l'utilise comme ensemble d'entraînement [160]. La LKOCV renforce la PLSR en évitant la surestimation des données prédites.

Dans la PLSR, le meilleur modèle quantitatif est celui qui présente la plus faible valeur de régression, mais il est important d'être prudent lors de la sélection du nombre de variables latentes (LVs) afin de ne pas surestimer le modèle. Un modèle robuste et précis peut être construit en sélectionnant le nombre optimal de LVs à partir de l'erreur quadratique moyenne de validation croisée (RMSECV) lors du processus de validation croisée. La sélection des LVs doit se situer dans une région où aucune différence statistiquement significative supplémentaire ne peut être observée, et le reste des LVs ne doit pas contenir un excès de bruit spectral [157].

Le RMSECV peut être calculé comme suit [161] :

$$RMSECV = \sqrt{\sum_{i=0}^{m} \frac{(x_i - \hat{x}_i)^2}{m}} \quad \textbf{(23)}$$

Où, x_i représente la concentration réelle de l'analyte dans le i-ème échantillon, $\hat{x}_i$ représente la concentration prédite de l'analyte dans le i-ème échantillon, et m est le nombre d'échantillons dans l'ensemble.

La micro-spectroscopie Raman confocale (CRM) associée à des méthodes d'analyse multivariée se révèle être un outil prometteur pour la caractérisation, le suivi de la distribution de molécules et la quantification d'ingrédients actifs dans la peau. Cependant, leur utilité doit être démontrée par des approches normalisées et reproductibles et leurs performances analytiques doivent être estimées ouvrant ainsi de nouvelles perspectives en vue de d'une validation par les autorités régulatrices. Dans ce contexte, des directives sont disponibles pour valider de nouvelles méthodes bioanalytiques utilisées pour mesurer les concentrations d'analytes dans les matrices biologiques, en particulier si ces méthodes sont non invasives et respectueuses de l'environnement par rapport aux techniques de référence comme la chromatographie. L'objectif principal de la validation est de démontrer la fiabilité d'une méthode spécifique pour déterminer la concentration d'un analyte dans une matrice biologique spécifique, telle que la peau. Les caractéristiques clés d'une méthode bioanalytique pour garantir une performance acceptable et des résultats analytiques fiables comprennent la sélectivité, la limite inférieure de détection et de quantification, la fonction de réponse et la plage d'étalonnage (performance de la courbe d'étalonnage), l'exactitude, la précision, les effets de matrice, ainsi que la stabilité de l'analyte dans la matrice biologique et la stabilité de l'analyte et des étalons.

II. Mise au point au laboratoire d'une approche bio-analytique pour l'objectivation de produits cosmétiques

Les travaux de recherche présentés dans ce chapitre ont été rendus possibles grâce à la mise en place, au sein du laboratoire, d'une approche bioanalytique qui combine des tests de perméation avec la chromatographie couplée à la détection UV-visible. Cette approche a été utilisée dans le cadre d'un partenariat avec l'entreprise Genialis, basée à Henrichemont (18), dans le but d'évaluer l'impact d'un protocole de stabilisation développé par cette entreprise sur la pénétration cutanée des actifs cosmétiques. Ce chapitre présente deux études qui ont été l'objet de deux articles publiés au cours de cette thèse.

II.1 Contexte :

Ces deux études ont été réalisées dans le cadre du projet "Ultrasons pour la Formulation des produits cosmétiques : Objectivation sur peau humaine" (UFO), financé par la Région Centre-Val de Loire dans le cadre d'un appel à projet régional. Le projet est une collaboration entre l'équipe de recherche EA 6295 Nanomédicaments et NanoSondes (NMNS) de l'université de Tours, spécialisée dans le développement d'approches bioanalytiques, et la société Genialis, détentrice d'un procédé breveté (N149668A1) utilisant la technologie Hydrofeeling®. Cette technologie permet de stabiliser des émulsions par ultrasons, sans recourir à l'ajout de tensio-actifs.

La technologie Hydrofeeling® de Genialis représente une innovation brevetée basée sur la stabilisation ultrasonore des formulations topiques (n° WO2020149668 et WO2017037372). Cependant, pour pouvoir l'appliquer à grande échelle, l'entreprise doit évaluer la sécurité et l'efficacité des produits résultants de ce procédé afin de répondre aux exigences de l'industrie cosmétique et de la réglementation européenne. Ces formulations doivent permettre une diffusion optimale des actifs cosmétiques dans les différentes couches de la peau, où ils peuvent exercer leurs effets, sans compromettre les fonctions biologiques de la barrière cutanée. Hydrofeeling® répond aux attentes actuelles en proposant des solutions novatrices et respectueuses de l'environnement dans le domaine de l'industrie cosmétique, ce qui rend les produits à la fois plus économiques et plus écologiques, sans avoir recours à l'ajout de tensio-actifs. Il existe une forte demande pour le développement de procédés de formulation utilisant des actifs cosmétiques d'origine végétale et naturelle, répondant ainsi aux exigences de l'industrie verte. Pour promouvoir la technologie Hydrofeeling®, Genialis doit surmonter plusieurs obstacles scientifiques, notamment dans les domaines de l'objectivation sur peau

humaine (aspect biologique), de l'analyse (nécessité d'une plateforme instrumentale variée et spécialisée) et de la formulation (compréhension de la rhéologie des produits).

II.1.1 Les objectifs scientifiques du projet sont les suivants :

(i) Développer des méthodologies adaptées à l'étude des dynamiques moléculaires dans la peau après l'application des formulations topiques innovantes Hydrofeeling®.

(ii) Étudier les paramètres physico-chimiques et la stabilité de ces formulations, ainsi que leur impact sur la peau, afin de rationaliser l'optimisation des procédés de formulation.

Grâce à l'application des protocoles développés, deux articles ont été publiés, fournissant des réponses sur l'efficacité des émulsions sans tensio-actifs en déterminant les cinétiques de perméation et les profils de pénétration en utilisant deux actifs modèles présentant des propriétés physico-chimiques différentes. De plus, des informations ont été obtenues concernant la composition, la physico-chimie et la stabilité de ces formulations, contribuant ainsi à l'optimisation du procédé Hydrofeeling®.

II.2 Introduction :

La tendance actuelle dans le domaine de la formulation cosmétique consiste à réduire le nombre d'ingrédients afin d'éviter les effets indésirables sur l'homme et l'environnement, ainsi qu'à limiter l'utilisation d'ingrédients issus de la synthèse chimique. La technologie Hydrofeeling®, développée par Genialis, repose sur l'exposition ultrasonore du produit, ce qui permet de stabiliser les émulsions sans avoir besoin d'ajouter des tensio-actifs. Les tensio-actifs sont connus pour jouer un rôle en tant que promoteurs de pénétration cutanée. Ils peuvent modifier la structure lipidique du stratum corneum en fluidifiant les lamelles ou en extrayant certains lipides de la matrice intercellulaire. De plus, certains tensioactifs peuvent altérer l'organisation lipidique de la peau ou interagir avec les protéines cutanées, entraînant sécheresse, inflammation et irritation cutanée. La technologie Hydrofeeling® représente donc une alternative innovante sans l'ajout d'additifs, offrant des perspectives intéressantes pour simplifier les formules des produits dermo-cosmétiques et évaluer leur perméabilité sans la présence de tensio-actifs. En plus de rendre les produits plus économiques et plus respectueux de l'environnement, la technologie Hydrofeeling® pourrait également améliorer leur efficacité. Le procédé de stabilisation par ultrasons a été utilisé avec succès au cours des dernières décennies, notamment dans l'industrie alimentaire, offrant plusieurs avantages potentiels tels que de petites tailles de gouttelettes et une distribution uniforme, une stabilité à long terme et

une faible consommation d'énergie. Les ondes ultrasonores sont généralement classées en deux catégories : les ultrasons à basse fréquence et haute énergie (> 1 $W.cm^{-2}$, 20 - 100 kHz) et les ultrasons à haute fréquence et faible énergie (< 1 $W.cm^{-2}$, 100 - 1 MHz). Les ultrasons à basse fréquence sont souvent utilisés pour la préparation d'émulsions présentant de très petites tailles de gouttelettes. Cependant, les forces de rupture intenses générées par le phénomène de cavitation peuvent provoquer une élévation significative de la température, entraînant la dénaturation et/ou la destruction des molécules. En revanche, les ultrasons à haute fréquence sont non destructifs et peuvent être utilisés pour étudier les propriétés physicochimiques des matériaux, telles que leur état physique, leur composition et leur structure. La technologie des ultrasons à haute fréquence (HFUT) a été utilisée pour stabiliser des émulsions sans avoir recours à des tensio-actifs. Dans cette méthode, la phase aqueuse et la phase huileuse sont pré-mélangées, puis placées dans un réacteur ultrasonique haute fréquence thermostaté équipé de douze transducteurs piézoélectriques qui vibrent sous l'influence d'un champ électrique. Bien qu'une étude préliminaire in vitro sur des cellules humaines ait démontré la biocompatibilité d'une émulsion sans tensioactifs produite par HFUT, aucune étude n'a encore examiné la cinétique de perméation de ces émulsions préparées par HFUT ni leur impact sur la fonction barrière de la peau, qui constitue une barrière naturelle pouvant limiter la pénétration et donc les effets des actifs cosmétiques. Les émulsions doivent favoriser la diffusion des actifs pour produire leurs effets, tout en préservant les fonctions biologiques de la barrière cutanée.

II.3 Objectifs :

L'objectif de la première étude est de démontrer que les émulsions cosmétiques sans tensio-actifs, stabilisées par HFUT, préservent la perméation cutanée des ingrédients actifs par rapport à une émulsion de référence contenant des tensio-actifs couramment utilisés (esters de sorbitane). Ainsi, une comparaison directe des profils de perméation de la caféine a été réalisée sur des modèles de peau humaine reconstruite exposés aux deux formulations. La caféine, en tant qu'ingrédient actif naturel connu pour ses propriétés amincissantes ou anti-âge, a été choisie pour cibler spécifiquement les cellules situées dans les couches profondes de la peau.

La deuxième étude a pour objectif de valider l'utilisation de la technologie HFUT dans le développement d'émulsions chargées avec deux types de molécules modèles (la caféine et l'α-tocophérol) qui présentent des propriétés physico-chimiques très distinctes. La caféine est hydrophile, avec un coefficient de partage octanol/eau (logKow) de -0,07 et une masse moléculaire de 194,19 g/mol. D'autre part, l'α-tocophérol est une molécule lipophile, avec un logKow de 12 et une masse moléculaire de 430,72 g/mol. À cet effet, les profils de perméation

cutanée de la caféine et de l'α-tocophérol ont été étudiés sur de la peau humaine, considérée comme la référence en matière de tests de perméation. Bien que l'utilisation de modèles de peau reconstruite soit pertinente et bien établie dans la littérature, des études rapportent une plus grande perméation des ingrédients actifs à travers ces modèles par rapport à la peau humaine excisée. Par conséquent, il est attendu que les résultats de perméation obtenus ici soient plus représentatifs que ceux obtenus lors de la première étude. Il est à noter que, dans cette deuxième étude, la composition de l'émulsion a été modifiée pour mieux répondre aux exigences du marché en matière de produits plus respectueux de l'environnement, l'huile de paraffine (d'origine pétrolière) a été remplacée par de l'huile d'amande douce (d'origine végétale).

II.4 Développements méthodologiques :

II.4.1 Développements liés à la méthode CLHP

La méthode utilisée pour quantifier la caféine lors des deux études est basée sur une méthode validée par la Pharmacopée Européenne, utilisant la chromatographie en phase inverse sur une colonne greffée de chaînes alkyles C18. Cependant, des améliorations ont été apportées afin d'optimiser la méthode, notamment en modifiant le pourcentage de solvant et la phase mobile pour réduire le temps total d'analyse. À cet effet, nous avons utilisé un mélange de 50% de méthanol et 50% d'eau, tamponné avec 10 mM d'acide phosphorique, ce qui nous a permis d'obtenir un temps de rétention de 2,62 minutes et un temps total d'analyse de 6 minutes, au lieu des 10 minutes précédentes, avec une phase mobile composée de 30% de méthanol et 70% d'eau selon la méthode de la pharmacopée. Pour cette étude, nous avons opté pour un détecteur à barrette diode (DAD), qui est un spectrophotomètre UV-visible réglé à une longueur d'onde de 273 nm, laquelle est la longueur d'onde optimale pour la détection de la caféine.

Une fois la méthode mise au point, nous avons construit une courbe d'étalonnage en utilisant différentes concentrations de caféine afin d'évaluer les performances de la technique. Plusieurs paramètres ont été calculés, tels que la linéarité, la limite de détection et la limite de quantification. Les résultats ont montré que la méthode était parfaitement adaptée à la quantification de faibles quantités de caféine, avec un coefficient de régression égal à 1 et une limite de quantification de l'ordre de $2,4 \times 10^{-5}$ mg/ml. Toute valeur de concentration en dessous de cette limite a été rapportée à zéro dans cette étude.

Dans le cadre de la deuxième étude, pour la détection de l'α-tocophérol très lipophile, nous avons utilisé une phase mobile composée de 100 % de méthanol et de 10 mM d'acide phosphorique. Cette phase mobile nous a permis d'obtenir un temps de rétention de 7,82 minutes

et un temps total d'analyse de 10 minutes. Pour la détection, nous avons privilégié l'utilisation d'un détecteur à fluorescence qui présentait plusieurs avantages par rapport au détecteur DAD, notamment une sensibilité accrue grâce à un système de conjugaison de doubles liaisons présent dans la structure de l'α-tocophérol, ce qui lui confère des propriétés fluorescentes permettant une détection des composés à des concentrations plus faibles en fluorescence qu'en UV-visible. Cela s'est avéré particulièrement avantageux pour la détection de l'α-tocophérol dans le SC, l'épiderme et le derme. Après une recherche bibliographique approfondie, nous avons réglé le détecteur sur des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 292 nm et 340 nm respectivement. Comme mentionné précédemment, nous avons évalué les performances de la méthode en construisant une courbe d'étalonnage. Les résultats ont démontré une linéarité égale à 1 et une limite de quantification de l'ordre de $1{,}1 \cdot 10^{-6}$ mg/mL, ce qui était idéal pour la détection de concentrations très faibles d'α-tocophérol dans les différentes couches de la peau.

Dans le cadre de cette étude, il était nécessaire de réduire le temps d'analyse en raison du grand nombre d'échantillons à traiter. En effet, nous disposions de 135 échantillons pour chaque cinétique de perméation, provenant de différents donneurs et prélevés à différents moments. En raccourcissant le temps d'analyse, nous avons pu obtenir les résultats dès le lendemain de la cinétique. Cette approche présente plusieurs avantages importants. Tout d'abord, elle permet de surmonter les limitations liées à la stabilité de l'ingrédient actif, car les résultats sont obtenus rapidement après le prélèvement, évitant ainsi toute dégradation potentielle. De plus, cela nous a permis de nous affranchir de l'obligation de stocker les échantillons dans une chambre froide ou au congélateur, ce qui aurait pu affecter la qualité des échantillons. En réduisant le temps d'analyse, nous avons donc pu optimiser le processus et obtenir des résultats fiables et pertinents dans un délai court.

II.4.2 Développements liés à la méthode du Tape stripping

Dans le cadre de la deuxième étude (#Article 2), des considérations expérimentales spécifiques ont été prises en compte lors de l'utilisation de la méthode du tape stripping (TS) sur des biopsies de peau humaine. La méthode du tape stripping consiste à enlever séquentiellement des couches de la couche cornée (SC) à l'aide de bandes adhésives. Cette méthode permet de quantifier la quantité de substance collectée et de déterminer son profil de concentration en fonction de la profondeur du SC. Cependant, cette méthode présente des limitations, notamment la nécessité d'une pesée précise des bandes adhésives. Le nombre de bandes nécessaires peut varier en fonction de divers facteurs tels que le type de ruban adhésif utilisé, la pression appliquée et les caractéristiques individuelles des sujets. Les questions clés étaient de déterminer combien de

bandes adhésives devaient être arrachées pour retirer la totalité du SC et comment réaliser cette opération de manière reproductible sur des biopsies de 20 mm de diamètre. Dans le but d'optimiser notre approche par TS, nous avons contacté le Pr. Dominique Lunter et sa doctorante de l'université de Tübingen en Allemagne, qui avaient réalisé plusieurs études de TS sur des biopsies de peau humaine. Nous avons échangé à plusieurs reprises afin de mettre au point un protocole adapté à nos expérimentations.

Le protocole optimisé consistait à placer les biopsies sur une surface rigide et à appliquer les bandes adhésives. Une fois la bande appliquée, une pression constante était exercée avec le pouce tout en effectuant une rotation. Cette technique, basée sur les travaux de Liu et al., a montré une variabilité moindre par rapport à l'utilisation d'un applicateur de bandes adhésives (roller), par exemple (références 33, #Article 2). Dans la deuxième étape, nous avons déterminé le nombre de bandes adhésives à retirer en fonction de la mesure de la perte insensible en eau (transepidermal water loss, TEWL). Selon notre protocole, après l'arrachage de 5 bandes adhésives, nous mesurions la TEWL, et dès que les valeurs de TEWL devenaient 5 à 6 fois supérieures aux valeurs mesurées avant le TS, cela indiquait que la totalité du stratum corneum avait été retirée. En moyenne, cela correspond à l'arrachage de 20 à 25 bandes adhésives pour enlever la totalité du SC. Ce protocole optimisé de TS nous a permis de quantifier l'α-tocophérol dans la couche cornée de la peau humaine et de comparer son accumulation à partir de deux formulations différentes. Grâce à ces mises au point expérimentales, nous avons pu obtenir des données fiables et pertinentes pour notre étude.

II.5 Résultats :

Les résultats de la première étude ont montré que l'émulsion sans tensioactifs présente une taille moyenne des gouttelettes presque deux fois plus petite et une viscosité trois fois plus élevée que l'émulsion de référence. Cependant, ces différences n'ont pas altéré le profil de perméation. Les flux de diffusion de caféine (Jss), les temps de latence (tlag) et les coefficients de perméabilité (Kp) entre les émulsions ne différaient que de 20 à 30 %. Ces données confirment que la stabilisation de l'émulsion par HFUT ne compromet pas la perméation de l’actif véhiculé par l'émulsion. Les résultats de la seconde étude montrent que les formulations développées sont stables et présentent une distribution appropriée de la taille des gouttelettes. La taille moyenne des gouttelettes des émulsions sans tensioactifs est inférieure à 1,5 μm, quelle que soit la polarité de l'actif. Toutes les formulations présentent un comportement rhéofluidifiant adapté à un usage cosmétique. Les études de perméation cutanée montrent que l'émulsion sans ES contenant de la caféine (molécule hydrophile) présente une capacité de délivrance similaire à

celle de l'émulsion de référence. Dans le cas de l'α-tocophérol (molécule lipophile), des différences ont été observées dans la distribution de l'actif dans le SC, avec un avantage pour l'émulsion de référence, probablement lié à l'interaction entre les tensioactifs et les lipides du SC. Enfin, cette étude démontre que les émulsions stabilisées par HFUT sont stables, présentent des caractéristiques rhéologiques adéquates pour un produit cosmétique chargé en ingrédients actifs hydrophiles et lipophiles, assurant ainsi la perméation et l'accumulation dans la peau humaine.

II.6 Conclusion

Les résultats de ces deux études confirment le fort potentiel de cette technologie dans le domaine cosmétique. Les émulsions produites par le HFUT favorisent la délivrance des actifs cosmétiques à la peau humaine et à la peau reconstruite. Pour la caféine, le traitement HFUT maintient l'efficacité de l'émulsion dans les deux modèles de peau utilisés. Cependant, pour l'α-tocophérol, l'émulsion de référence montre une meilleure délivrance cutanée, en particulier dans les couches du stratum corneum. En raison de ses caractéristiques physico-chimiques, limitant sa pénétration cutanée, le tensio-actif présent dans la formulation peut agir comme un agent favorisant la pénétration, augmentant ainsi la rétention cutanée de l'α-tocophérol. Cependant, compte tenu des potentiels dommages causés par les tensio-actifs sur la peau, l'émulsion sans tensio-actifs représente un compromis judicieux entre efficacité et préservation de l'intégrité de la barrière cutanée. En conclusion, cette étude met en évidence la polyvalence de la technologie HFUT et renforce son potentiel dans la production d'émulsions pour les domaines cosmétiques et dermatologiques.

Lors de notre étude, nous avons observé des différences entre les résultats obtenus à partir des modèles de peau reconstruits EpiSkin® et ceux de la peau humaine pour la perméation de la caféine. Ces divergences soulignent la possibilité que les résultats ne reflètent peut-être pas pleinement la véritable différence entre les deux types de formulations (avec ou sans tensio-actifs). Cela a suscité notre intérêt à approfondir notre compréhension de ces modèles de peau et de leurs différences par rapport à la peau humaine afin d'expliquer ces variations. Nous avons donc entrepris des investigations supplémentaires pour examiner plus en détail ces modèles de peau et mieux comprendre leur adéquation en tant que substituts de la peau humaine dans nos expérimentations.

II.7 #Article N°1: Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin

Check for updates

Received: 2 February 2022 | Accepted: 19 March 2022

DOI: 10.1111/ics.12772

International Journal of Cosmetic Science SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE COSMÉTOLOGIE

ORIGINAL ARTICLE

Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin

Hichem Kichou[1] | **Yuri Dancik**[1,2,3] | **Christophe Eklouh-Molinier**[1] | **Nicolas Huang**[3] | **Martin Soucé**[1] | **Laurianne Gressin**[4] | **Guillaume Gillet**[4] | **Igor Chourpa**[1] | **Emilie Munnier**[1] | **Franck Bonnier**[1]

[1]Faculté de Pharmacie, EA6295 NMNS « NanoMédicaments et NanoSondes », Université de Tours, Tours, France

[2]Le STUDIUM Institute of Advanced Studies, Orléans, France

[3]CNRS, Institut Galien Paris-Saclay, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

[4]GENIALIS, Henrichemont, France

Correspondence
Emilie Munnier, Faculté de Pharmacie, EA6295 NMNS « NanoMédicaments et NanoSondes », Université de Tours, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.
Email: emilie.munnier@univ-tours.fr

Present address
Yuri Dancik, Simcyp Division, Certara UK Ltd., Sheffield, UK

Funding information
APR-IR Région Centre Val de Loire – project UFO, Grant/Award Number: 2020-00138875; ARD Centre Val de Loire - Project MINIONs, Grant/Award Number: 2020-00141275; ARD Cosmétosciences - Project BIOACTIS, Grant/Award Number: 2017-00118114

Abstract

Objective: The cosmetic industry endeavours to strengthen the greener and safer claims of processes to respond to the high demand from customers for natural and environmentally friendly products. High-frequency ultrasonication technology (HFUT) is a physical process enabling the stabilization of emulsions without requiring additional ingredients, such as emulsifying surfactants (ES) to be introduced into the formulations. In this study, key formulation characteristics of an emulsion synthesized by HFUT and a reference emulsion (RE) were compared, as well as the permeation kinetics of caffeine, used as a model active cosmetic ingredient, from both types of emulsions.

Methods: The pH, droplet size and viscosity of emulsions prepared by the HFUT and the RE were determined and compared. The permeation of caffeine from the HFUT emulsion and the RE applied to the surface of reconstructed human epidermis (RHE) models was compared.

Results: The ES-free formulations prepared by HFUT displayed a nearly 2-fold lower average droplet size and over 3-fold greater viscosity, compared to the RE. Despite these differences, the absence of ES in the HFUT emulsion did not significantly alter the permeation kinetics of caffeine through RHE. The caffeine steady-state flux, lag time and permeability coefficients differed by 20%–30%only.

Conclusion: This study demonstrates the potential of the HFUT to yield topical cosmetic products with lower requirements ingredients-wise, without losing efficacy, supporting the possible implementation of the technology in the cosmetic industry.

KEYWORDS

emulsifier-free emulsion, emulsions, formulation, permeation, reconstructed human epidermis, ultrasound stabilization

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2022 The Authors. *International Journal of Cosmetic Science* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Cosmetic Scientists and Societe Francaise de Cosmetologie.

Résumé

Objectif: l'industrie cosmétique œuvre à renforcer les revendications plus écologiques et plus sûres des processus pour répondre à la forte demande des clients de produits naturels et plus respectueux de l'environnement. La technologie d'ultrasons à haute fréquence (High-Frequency Ultrasonication Technology, HFUT) est un processus physique permettant de stabiliser les émulsions sans qu'il soit nécessaire d'ajouter des ingrédients supplémentaires, tels que des surfactants émulsifiants, aux formulations. Dans cette étude, les principales caractéristiques de formulation d'une émulsion synthétisée par HFUT et d'une émulsion de référence ont été comparées, ainsi que la cinétique de perméation de la caféine, utilisée comme ingrédient cosmétique actif modèle, dans les deux types d'émulsion.

Méthodes: le pH, la taille des gouttelettes, et la viscosité de l'émulsion préparée par HFUT et de l'émulsion de référence ont été déterminés et comparés. La perméation de la caféine de l'émulsion HFUT et de l'émulsion de référence appliquées à la surface de modèles d'épiderme humain reconstruit a été comparée.

Résultats: la formulation sans surfactants émulsifiants préparée par HFUT présentait une taille moyenne de gouttelettes presque 2 fois plus faible et une viscosité plus de 3 fois supérieure comparée à l'émulsion de référence. Malgré ces différences, l'absence de surfactants émulsifiants dans l'émulsion HFUT n'a pas significativement modifié la cinétique de perméation de la caféine dans l'épiderme humain reconstruit. Le flux à l'état d'équilibre de la caféine, le temps de latence et les coefficients de perméabilité différaient de 20 à 30 % uniquement.

Conclusion: cette étude démontre le potentiel de la technologie HFUT à générer des produits cosmétiques topiques possédant des exigences plus faibles en termes d'ingrédients, sans perte d'efficacité, soutenant la mise en œuvre éventuelle de la technologie dans l'industrie cosmétique.

INTRODUCTION

Emulsions constitute the basis of many skin care products on the market: creams, milks, foundations, masks and even some hygiene products. In cosmetics, an emulsion is a dispersed system most commonly made up of an oil phase dispersed in fine droplets in an aqueous phase. While the former can have intrinsic properties to repair the skin barrier, the latter ensures hydration of the skin. Emulsions are also valuable vehicles enabling the delivery of lipophilic and/or hydrophilic active cosmetic ingredients (ACI), thanks to the hybrid aqueous-lipid nature of the system. The rheological properties (most of all Newtonian or shear thinning behaviour) of these products allow for easy spreading over large surfaces and efficient skin penetration [1].

Emulsions, as every dispersed system, exhibit thermodynamic instability which leads to the separation of the aqueous and oil phases over time. Therefore, additional ingredients are commonly introduced into the formulations such as emulsifying surfactants (ES), to promote the formation and stability of emulsions; thickeners, to slow down the movement of the droplets and electrolytes, to balance the surface electrical charge of the droplets [2]. In addition to stabilizing the formula, ES are also known to act as penetration enhancers [3]. In particular, they enhance skin penetration either through modification of the lipidic structure of the *stratum corneum*, or through solubilization of the ACI into the intercellular lipid space [4]. Surfactants are also known to weaken the skin barrier function by disrupting the structural lipids' organization as evidenced by increased transepidermal water loss (TEWL) [5]. It was shown *in vitro* that the SC and all the living layers of reconstructed epidermis can be morphologically altered with extensive disorganization of the horny layer and vacuolization of the nucleated cells following exposure to surfactants [5]. ES mostly come from chemical synthesis with significant consequences on the environment and have their value in formulation challenged [6]. ES

are also linked to potential side effects, such as endocrine disruption [3] and cutaneous irritation [4, 7]. Moreover, ES can also add difficulties at the industrial production scale, requiring vacuum conditions to avoid foam formation. Increasingly, expectations for eco-friendly cosmetic products with reduced environmental impact are defining trends in the skin care market, hence also influence strategies for development of new formulas. The current challenge in the cosmetics industry is about reducing the number of ingredients in formulations, to offer natural and environmentally responsible products while guaranteeing a competitive price. Developing new formulations with synthetic emulsifiers substituted with bio-based surfactants, natural polymers, proteins or solid microparticles (Pickering emulsions) [8] is time consuming, can result in limited efficiency and is not systematically eco-friendly or cost-effective for manufacturers. At the same time, difficulties in securing the supply chain for these natural molecules can be an additional obstacle. Therefore, stabilizing emulsions using a physical process instead of using chemical interfaces like ES is a promising approach to address current needs of the cosmetic industry for greener and safer processes and products.

Innovative technologies for preparation of emulsions with ultrasonic processes represent a relevant tool that has proven to be useful, especially in the food industry [9]. The sound ranges used can be divided into two types: low-frequency (LF) and high-frequency (HF) ultrasounds. While LF ultrasounds, frequently used to prepare emulsions with very small droplet sizes like nanoemulsions, can induce the denaturation and/or destruction of molecules by a cavitation mechanism due to a significant increase of the temperature [10], HF ultrasounds are low-energy ultrasounds with frequencies above 1 MHz and intensities below 1 W.cm^{-2}. They have the advantage of avoiding violent mechanical effects of acoustics cavitation and molecular modifications [11]. Stabilization of emulsions by means of high-frequency ultrasound technology (HFUT) (between 1 and 3 MHz) has already been evaluated in the food field, based on a patented method developed by Genialis (N149668A1) [12]. In this method, the emulsion is pre-mixed then introduced in a thermostatic HF ultrasound reactor equipped with 12 piezoelectric ceramics vibrating at high frequency under electric field influence.

Kaci *et al.* demonstrated that the technique stabilizes Coenzyme Q10 emulsion with no ES, no excessive heating and no degradation of the active molecule [13]. The HFUT treatment of the emulsions led to a significant decrease in pH, combined with a highly negative surface charge of the droplets (<−60 mV) [12]. The supposed mechanism of stabilization is the formation of a hydroxide layer formed by adsorption of OH^-ions at the oil/water interface, generating high energy barrier between droplets leading to emulsion stability [14, 15]. An ionic capsule is generated around the droplets [16], enabling the preparation of emulsions with simplified composition, most importantly without addition of ES to the formula [12, 16]. While a preliminary *in vitro* study on human mesenchymal stem cells showed the biocompatibility of a ES-free emulsion produced by HFUT [13], to date there has not been any investigation of the kinetics of skin penetration of ACI loaded in products prepared by this technology.

The present study aims to prove that cosmetic ES-free emulsions stabilized by HFUT do not lead to a reduction in ACI skin permeation compared to a reference emulsion containing commonly used ES (presently sorbitan esters). Therefore, a direct comparison of permeation profiles for caffeine with both formulations was performed on reconstructed human skin models. Caffeine was used as a model natural ACI with slimming or anti-aging activities, hence targeting cells located in deeper skin layers. Ultimately, the study demonstrates that stabilization of emulsions with HFUT does not compromise their efficacy, supporting the possible implementation of the technology in the cosmetic field.

MATERIALS AND METHODS

Ingredients

Caffeine was purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), ultrapure water Elix® from Merck (Darmstadt, Germany) and NaOH pellets from VWR international (Briare, France). Polysorbate 80 (Montanox 80®) and sorbitan monooleate (Montane 80®) were purchased from Seppic (La Garenne Colombes, France). Oleic acid was purchased from AMI Ingredients (Tauxigny, France), xanthan gum from SACI-CFPA (Paris, France) and paraffinum liquidum from Cooper (Melun, France). Methanol and Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS) were purchased from Fisher scientific (Illkirch, France).

Preparation of samples

ES-free emulsion prepared by HFUT

Caffeine was dissolved in ultrapure water to constitute the aqueous phase. Oleic acid was dissolved in paraffin oil to constitute the oil phase. The oil phase was mixed into the aqueous phase by high-speed homogenization using a T25 digital Ultra-Turrax (IKA, Germany) for 5 min (11 400 rpm, 20°C) to produce a coarse emulsion. The obtained mixture was sent in the ultrasonic reactor at

1.7 MHz and treated for 30 min in accordance with Kaci *et al.* initial work on stabilizing emulsions with HFUT [16]. NaOH was added during the process to reach a pH adapted to skin application (around 6). Then, xanthan gum was added into the mixture by using a Silverson® overhead stirrer (Evry-Courcouronnes, France) for 5 min.

Reference emulsion (RE) with ES

Caffeine and polysorbate 80, the hydrophilic ES, were dissolved in water to constitute the aqueous phase. Oleic acid and sorbitan monooleate, the hydrophobic ES, were dissolved in paraffin oil to constitute the oil phase. Both phases were heated to 70°C in a bain-marie. The oil phase was mixed into the aqueous phase by high-speed homogenization using a Turbotest® disperser (VMI, France) for 10 min (2800 rpm, 20°C). To compare both emulsions, the same amount of NaOH as in the HFUT emulsion was added. Xanthan gum was added into the mixture under stirring for 5 min (1500 rpm).

The compositions of the caffeine formulations are summarized in Table 1.

The physical stability of the emulsion was attested by visual observation after 3 months of storage at room temperature.

Viscosity and pH measurement

The viscosity was measured using a DV1 prime viscometer from AMETEK Brookfield (Middleboro, USA). The measurement was done with a LV-2 (63) spindle at 6 rpm speed rotation, for 5 min, at 21 ± 1°C. The pH was measured using a PH2700 pH-meter from EUTECH instruments (Toronto, Canada). Results for viscosity and pH measurement are reported as mean ± SD with $n = 3$ replicates.

TABLE 1 Composition (wt %) of the caffeine formulations studied

	Reference emulsion (RE)	ES-free emulsion
Ultrapure water Elix®	84.1	89.1
Caffeine	1.78	1.78
Polysorbate 80	3	-
Sorbitan monooleate	2	-
NaOH	0.23	0.23
Paraffin oil	8.2	8.2
Oleic acid	0.09	0.09
Xanthan gum	0.6	0.6

Particle size measurement

Particle size distributions were obtained using a FC200S + HR (Occhio, Angleur, Belgium). 1:100 dilution of emulsions prepared in de-ionized water were allowed to flow through the measurement cell while optical images were captured. A 50-μm-thick spacer was used. Before each analysis, a background calibration was performed on ultrapure water. Information about the distribution of particle shape and size for each sample was extracted with the Callisto Software (Occhio, Angleur, Belgium). The Feret diameter, corresponding to the distance between two parallel lines tangent to the particle shape, was used to determine the maximum diameter of particles. For the purpose of the study, the average size (average diameter), D10, D50 and D90 are used to characterize the emulsions. The D10, D50 and D90 indicate particle size corresponding, respectively, to 10%, 50% and 90% of the particles analysed [16].

Reconstructed human epidermis (RHE)

Reconstructed human epidermis (RHE) was purchased from EpiSkin® (Lyon, France). The RHE is epidermal cultures (large model, 1.07 cm^2 diffusional area) consisting of a stratified and totally differentiated epidermis derived from human keratinocytes deposited on a collagen matrix (type I and type IV). The RHEs are shipped in 12-well plates after 13 days of maturation (J13).

RHE were used following the supplier's instructions. At reception, tissues are immediately removed from the nutrient agarose and placed in a 12-well plate containing 2 mL of maintenance medium (supplied by EpiSkin®) in each well. Tissues are incubated overnight at 37°C (5% CO_2, 95% humidity).

Skin permeation experiments

Permeation experiments were performed with RHE membranes directly in their culture inserts placed in the 12-well plates to reduce handling of samples, as in previously published studies [17]. For the purpose of this study, D-PBS was used as the receptor medium. After 18 h of incubation in the maintenance medium, the RHE samples were transferred in 12-well plates filled with 2 mL of D-PBS in each well and were equilibrated for 30 min at room temperature. Then, 200 μL of caffeine formulations were applied directly onto their surfaces. The time-dependent permeation of caffeine was followed over 12 h. At specific time intervals (every 30 min from 0.5 to 2.5 h then every 60 min from 3 h until the

end of the experiment), the 2 mL of receptor medium was collected for analysis by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) (see section 2.7). Following collection of the receptor fluid, each RHE was immediately transferred to a new well filled with 2 mL of fresh receptor medium (D-PBS) [17].

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

The receptor medium was analysed by HPLC to quantify the concentration of caffeine and establish the time-dependent permeation kinetics. The HPLC system (Ultimate 3000, Dionex) consisted of a UHPLC pump; an auto-injector; a diode array detector and an Interchim Kromasil Vintage Series C18 column (4.6 × 150 mm, 5 µm). Detection wavelength for caffeine was 272 nm. The temperature of the column and the auto-injector was set to 25°C and 15°C respectively. The mobile phase used in isocratic mode was methanol 50%: water 50% (v/v) +10 mM of phosphoric acid. The injection volume of samples was 10 µL. The duration of the analysis of each sample was 6 min at a flow rate of 1 mL min^{-1}. The software used was Chromeleon 7.1 (Thermo Scientific, chromatography data system software).

A standard calibration curve was prepared prior to analysis. Standards were obtained in triplicate by dissolving caffeine in PBS at concentrations of 1, 5, 10, 100 and 500 µg min^{-1}. The observed retention time was 2.620 ± 0.008 min.

Data analysis

Results are presented as a plot of the cumulative mass of permeated caffeine per area of skin model (µg cm^{-2}):

$$Q_n = \frac{C_n \times V_{rec} + \sum_{i=1}^{i=n-1} C_i \times V_i}{S} \quad (1)$$

where Q_n (µg cm^{-2}) is the cumulative mass of caffeine at a time n, normalized by the diffusion surface S, C_n (µg cm^{-3}) is the concentration of the receptor medium determined by HPLC, V_{rec} is the volume of the receiving compartment volume of receptor medium = 2 mL), C_i is the concentrations calculated at the previous time interval and V_i is the sample volume (here $V_i = V_{rec}$).

Three additional parameters characterizing caffeine permeation are calculated to compare the results between formulations. The steady-state flux (J_{ss} = dQ/dt, expressed in µg cm^{-2} h^{-1}) is equal to the slope of the cumulative amount profile in the steady-state (linear) portion of the profile. The lag time (t_{lag}, expressed in h) is the delay required for diffusion through the skin to reach a steady state. It is the intercept of the slope (J_{ss}) with the time axis [18, 19]:

$$Q(t) = J_{SS}(t - t_{lag}) \quad (2)$$

The permeability coefficient (Kp, expressed in cm h^{-1}) represents the "speed" of penetration of the active ingredient and is obtained from:

$$K_p = J_{SS}/C_d \quad (3)$$

where C_d is the applied donor concentration in µg cm^{-3}.

All results are reported as mean ± SD (n = 3). The statistical significance of the data was determined using Student's t-test with a level of significance set for p-values ≤ 0.05.

TABLE 2 Viscosity, pH, average particle size, D10, D50 and D90 for the ES-free emulsion and the reference emulsion

Formulation	Reference emulsion (RE)	ES-free emulsion
Viscosity (mPa s)	1253 ± 58[a]	4306 ± 89[a]
pH	5.5 ± 0.2[a]	6 ± 0.1[a]
Average size (µm)	3.25 ± 0.42[a]	1.92 ± 0.18[a]
D10 (µm)	1.13 ± 0.19	0.86 ± 0.07
D50 (µm)	2.36 ± 0.31[a]	1.53 ± 0.17[a]
D90 (µm)	6.61 ± 1.18[a]	3.39 ± 0.33[a]

Note: Data are reported as mean ± SD (n = 3). Significant differences (symbolized by [a]) were determined by a Student t-test ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of samples

To assess the impact of the preparation process and the presence of ES on the penetration of caffeine, a reference emulsion (RE) was prepared. It contains the minimum ingredients found in topical formulations present on the market: an oil phase made of paraffin oil and an emollient (oleic acid), an aqueous phase made of purified water, a thickening agent (xanthan gum) and a pH regulator (sodium hydroxide) to reach a pH tolerated by skin. It is stabilized by the addition of widely used surfactants (sorbitan monooleate and polysorbate 80). The oil phase/water phase ratio is representative of currently commercialized fluid emulsions. Exactly the same emulsion (ES-free emulsion) was prepared without ES using the HFUT process. ES were replaced by the same amount of ultrapure water (Table 2).

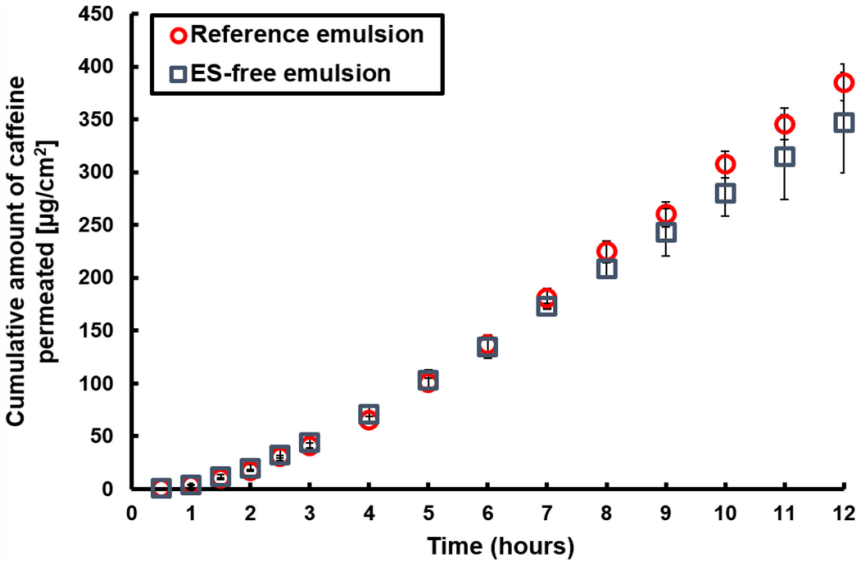


FIGURE 1 Cumulative amount profiles of caffeine permeated through EpiSkin® RHE. As a function of time (Red circles: Reference emulsion. Blue squares: ES-free emulsion). Data shown as means ± SD ($n = 3$) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Viscosity, pH, average particle sizes, D10, D50 and D90 for ES-free emulsions and RE are summarized in Table 2. Both emulsions show a slightly acidic pH that is suitable with topical skin application, although slightly different values were obtained, i.e., pH = 6 (ES-free) and pH = 5.5 (RE). This difference is explained by the decision to maintain the same amount of pH regulator in both emulsions to ensure formulations had exactly the same composition except for the addition or not of ES. It is, therefore, observed that adding 5 g of ES tends to acidify the formulation. However, as caffeine is a non-ionizable molecule, the slight difference in pH is not a critical parameter that can have an impact on its penetration in the skin [20].

It was observed that ES-free emulsions prepared by HFUT display smaller average droplet size (1.92 ± 0.18 µm) compared to RE (3.25 ± 0.42 µm). D10 values indicate that 10% of droplets have diameter below 0.86 µm for ES-free compared to 1.13 µm for RE. Similarly, 50% of droplets are below 1.53 µm and 90% below 3.39 µm for ES-free, while for RE it is found to be, respectively, 2.36 and 6.61 µm. The average droplet size, D50 and D90 exhibit differences that are statistically significant with $p < 0.05$. Effectively, the ultrasound treatment yielded a decrease in droplet size formed due to the deformation and breakage of oil droplet during the propagation of acoustic waves [12].

Regarding the viscosity, both emulsions exhibit different properties with 4306 ± 89 mPa s for the ES-free emulsion compared to 1263 ± 58 mPa s for the RE. The study relies on two different processes to prepare the emulsions studied and therefore protocols can differ in terms of instrumentation required. Presently, mixing tools to add xanthan gum, respectively, used for ES-free and RE emulsions can produce different shearing rates and result in different viscosities. Similar to pH mentioned above, it has been decided for the purpose of the study to prioritize having formulas with only ES content varying while all other ingredients are kept at same concentrations. While smaller droplet size in emulsions is known to increase the penetration of ACI in skin [21], higher viscosity is often associated with an opposite effect [22]. Given that the manufacturing process for ES-free emulsions modifies key formulation characteristics compared to the reference emulsions, it is highly relevant to determine whether this impacts the ACI permeation.

In vitro caffeine permeation

Caffeine is a small hydrophilic compound commonly used for evaluation of ACI permeation in skin samples [23, 24]. It provides a good model for the comparison of permeation kinetics from different topical formulations. RHE are *in vitro* biological systems mimicking the stratified nature of human skin, as well as the lipid and protein contents of the *stratum corneum* [25, 26]. While RHE yield faster transdermal diffusion compared to excised human skin, their main advantage is the significantly lower variability between replicates [21–23]. Despite the weaker barrier function for RHE, there is an increasing number of studies demonstrating that EpiSkin® models are a suitable alternative to human skin for the assessment of cutaneous penetration, especially at the stage of products screening and direct comparison of topical formulations [27, 28]. Figure 1 shows the accumulated amount of caffeine as function of time for RE and ES-free emulsion. Curves have similar patterns for the emulsions.

After 30 min, corresponding to the first interval point of the kinetics, emulsions display cumulated amount of caffeine equal to 0.72 ± 0.25 µg cm^{-2} (ES-free emulsion) and 0.78 ± 0.18 µg cm^{-2} (RE). For the RE, the values increase

to 136.45 ± 9.06 μg cm^{-2} at 6 hours and 384.88 ± 20.25 μg cm^{-2} at 12 h. For ES-free emulsion, cumulative amounts of caffeine equal to 134.48 ± 2.53 μg cm^{-2} at 6 h and 347.21 ± 55.21 μg cm^{-2} at 12 h were obtained.

There are minimal differences observed in cumulative amount of caffeine in the interval 30 min–6 h. This is confirmed by a Student's *t*-test performed for each time point ($0.18 < p < 0.65$). From 7 to 12 h, mean cumulative masses of caffeine tend to be slightly lower for ES-free emulsion; however, a Student's *t*-test performed at each time point confirms that there is no statistically significant differences in values within the range 7–12 h ($0.064 < p < 0.18$).

Figure 2 shows the ratio between mean cumulative amount of caffeine for ES-free emulsion and RE. The ratios comprised between 1.18 (1.5 h) and 0.90 (12 h). In the first 5 h, it is observed that the cumulated amount of caffeine for ES-free emulsion is superior compared to the RE. An inversion of the ratio occurs between 5 h (1.03) and 6 h (0.99). While it suggests that the ES-free emulsion tends to penetrate slightly faster in the first half of the experiment, the trend changes in favour of RE for prolonged application. However, due to the high standard deviation obtained this mean of representation only enables description of trends, without providing statistically relevant difference. Therefore, further insight in the permeation of caffeine for each emulsion was sought using parameters J_{ss} (steady state flux), t_{lag} (lag time) and k_p (permeability coefficient), all calculated from the kinetics of accumulated mass of caffeine shown in Figure 1.

Table 3 presents the values obtained for the three parameters. The steady-state fluxes (J_{ss}) for ES-free emulsion and RE do not display statistically significant differences with, respectively, 33 ± 7 μg cm^{-2} h^{-1} and 41 ± 1 μg cm^{-2} h^{-1} ($p = 0.54 > 0.05$). It confirms that the two formulations yield a similar flux of caffeine through the skin. Both emulsions have comparable t_{lag} with 1.96 ± 0.82 h (ES-free emulsion) and 2.47 ± 0.07 h (RE). Although the mean t_{lag} for ES-free emulsions is lower, the larger standard deviation compared to the RE only allows to point out a trend, but statistically there is no significant differences observed between the two emulsions ($p = 0.59 > 0.05$). Finally, the permeability coefficients (k_p), respectively, 1.65 ± 0.44 cm h^{-1} and 2.03 ± 0.06 cm h^{-1} are not significantly different ($p = 0.54 > 0.05$), suggesting that the stabilization by HFUT does not impair the penetration of the ACI tested.

Although non-ionic surfactants in emulsion formulations are commonly regarded as safe, they are also known to potentially act as penetration enhancers [5]. Enhanced flux of materials permeating through biological membranes due to ES has been reported [29]. The increased penetration of polar/hydrophilic molecules through the SC has been connected to the structural modification of the SC lipids leading to a higher diffusivity of compounds in the tissue [30, 31]. However, the HFUT ES-free emulsion delivers comparable kinetics compared to the reference emulsion. It has been shown by Cross et al., that flux through human epidermal membrane of oxybenzone, a UV filter, applied as an infinite dose, decreases with increasing formulation viscosity [32]. In addition, Kriwet and Müller–Goyman reported that the increased viscosity of Diclofenac formulation decreased drug release and permeation through excised human skin *stratum corneum* [22]. Indeed, the log P of studied molecules and skin models used can deliver slightly different outcomes. Considering that the viscosity of the ES-free emulsion is ~3 times higher compared to that of the RE, results are highly encouraging and suggest that further improvement of efficacy of topical formulations developed by HFUT can be achieved tailoring their physicochemical properties. The reduced droplet size in the ES-free emulsion may

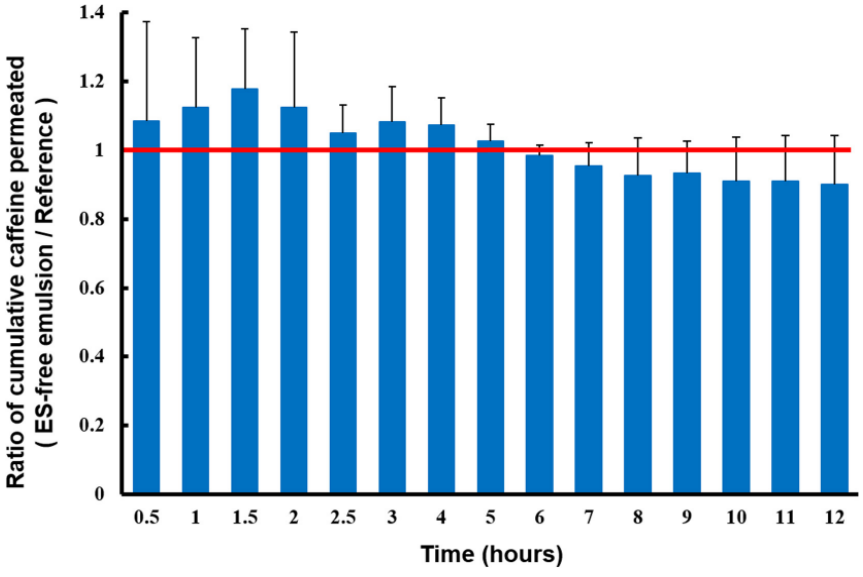


FIGURE 2 Ratio of cumulative amount of caffeine permeated through EpiSkin® RHE (ES-free emulsion/ Reference emulsion). Data shown are means ± SD ($n = 3$). The red line indicates ratio = 1 [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

TABLE 3 Steady-state fluxes (J_{ss}), lag times (t_{lag}) and permeability coefficients (k_p) obtained from cumulative amount profiles of caffeine through EpiSkin® RHE samples

Formulation	J_{SS} [µg cm^{-2} h^{-1}]	t_{lag} [h]	k_p [10^{-3} cm h^{-1}]
Reference emulsion (RE)	41 ± 1	2.47 ± 0.07	2.03 ± 0.06
ES-free emulsion	33 ± 7	1.96 ± 0.82	1.65 ± 0.44

Note: All data are displayed as mean ± standard deviation of $n = 3$ experiments.

counterbalance the effect of increased viscosity on skin absorption. However, more studies are necessary to mechanistically relate differences in physical characteristics rheology between the ES-free and references emulsion, and observed skin permeation. Studies have, however, reported increased skin penetration from emulsions with smaller droplets [21, 33]. Eros et al. demonstrated that a smaller droplet size yields an increase in the specific surface, which in turn enhances the rate of dissolution and increases drug release [34]. Ultimately, the permeation of ACI and efficacy of a formulation are defined by a number of physicochemical and rheological properties. In this study, ES-free and RE emulsions that are chemically as similar as possible (i.e. the composition only differs due to the presence of ES) yield statistically equivalent caffeine permeation kinetics.

CONCLUSION

While customers are increasingly seeking safe and environmentally friendly cosmetic products, simplifying products by removing ingredients issued from chemical synthesis strengthen the natural claim the cosmetic industry is striving to promote. The HFUT reported presently is, therefore, a relevant process to prepare topical cosmetic products that is consistent with current concerns of the field. Our direct comparative permeation study between an emulsion without commonly used emulsifying surfactants (ES-free) and a reference emulsion (RE) containing those shows that the rate of diffusion for caffeine in the skin models does not differ significantly. The results confirm the potential of the technology to yield topical cosmetic products with lower requirements ingredients-wise, without losing efficacy. The trends for natural, green and environmentally friendly products are part of the cosmetic market's dynamics also strongly relying on innovation in the formulation process. In that context, HFUT is a promising tool opening numerous perspectives for future development of new simplified formulations.

ACKNOWLEDGEMENTS

ARD Cosmétosciences – Project BIOACTIS (2017-00118114), ARD Centre Val de Loire – Project MINIONs (2020-00141275) and APR-IR Région Centre Val de loire-project UFO (2020-00138875) are acknowledged for funding. Y.D. thanks Le STUDIUM Institute of Advanced Studies for the research fellowship award.

CONFLICT OF INTEREST

Laurianne Gressin and Guillaume Gillet are employees from GENIALIS (route d'Achères 18250 Henrichemont, France). The other authors have declared no conflict of interest.

ORCID

Hichem Kichou https://orcid.org/0000-0003-1050-2998
Emilie Munnier https://orcid.org/0000-0002-6691-4484

REFERENCES

1. Schmidberger M, Nikolic I, Pantelic I, Lunter D. Optimization of rheological behaviour and skin penetration of thermogelling emulsions with enhanced substantivity for potential application in treatment of chronic skin diseases. Pharmaceutics. 2019;11:361.
2. Okunade OA, Yekeen N, Padmanabhan E, Al-Yaseri A, Idris AK, Khan JA. Shale core wettability alteration, foam and emulsion stabilization by surfactant: Impact of surfactant concentration, rock surface roughness and nanoparticles. J Pet Sci Eng. 2021;207:109139.
3. Pathan IB, Setty CM. Chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery systems. Tropical journal of pharmaceutical research, 8(2). doi:10.4314/tjpr.v8i2.44527
4. Monteiro-Riviere NA. *Toxicology of the Skin*. CRC Press; 2010.
5. Dragicevic N, Maibach HI (eds). Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement. 2015. doi:10.1007/978-3-662-45013-0
6. Bom S, Jorge J, Ribeiro HM, Marto J. A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. J Clean Prod. 2019;225:270–90.
7. Weltfriend S, Ramon M, Maibach HI. *Irritant dermatitis*. Dermatotoxicology; 2004.
8. Yang Y, Fang Z, Chen X, Zhang W, Xie Y, Chen Y, Liu Z, Yuan W. An overview of pickering emulsions: solid-particle materials, classification, morphology, and applications. Front Pharmacol. 2017;8:287.
9. PicÃ Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. Trends Anal Chem. 2013;43:16.
10. Abismaıl B, Canselier JP, Wilhelm AM, Delmas H, Gourdon C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. Ultrason Sonochem. 1999;9:75–83.
11. Lavigne O. Water irradiation by high-frequency ultrasonic wave: Effects on properties of passive film formed on stainless steel. Ultrason Sonochem. 2011;8:1287–94.

12. Kaci M. Emulsification by high frequency ultrasound using piezoelectric transducer: Formation and stability of emulsifier free emulsion. Ultrason Sonochem. 2014;8:1010–7.
13. Kaci M, Arab-Tehrany E, Dostert G, Desjardins I, Velot E, Desobry S. Efficiency of emulsifier-free emulsions and emulsions containing rapeseed lecithin as delivery systems for vectorization and release of coenzyme Q10: physico-chemical properties and in vitro evaluation. Colloids Surf B Biointerfaces. 2016;147:142–50.
14. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. Int J Pharm. 2010;385:113–42.
15. Hong IK, Kim SI, Lee SB. Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. J Ind Eng Chem. 2018;67:123–31.
16. Kaci M, Arab-Tehrany E, Desjardins I, Banon-Desobry S, Desobry S. Emulsifier free emulsion: Comparative study between a new high frequency ultrasound process and standard emulsification processes. J Food Eng. 2017;194:109–18.
17. Dancik Y, Kichou H, Eklouh-Molinier C, Soucé M, Munnier E, Chourpa I, Bonnier F. Freezing weakens the barrier function of reconstructed human epidermis as evidenced by raman spectroscopy and percutaneous permeation. Pharmaceutics. 2020;12:1041.
18. Dancik Y, Jepps OG, Roberts MS. 12 Beyond Stratum Corneum. Dermal absorption and toxicity assessment. 2007;177:209.
19. Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kerscher M. Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. Int J Cosmet Sci. 2013;35:491–501.
20. Elmowafy M. Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. Colloids Surf B Biointerfaces. 2021;203:111748.
21. Ktistis G, Niopas I. A Study on the In-vitro Percutaneous Absorption of Propranolol from Disperse Systems. J Pharm Pharmacol. 2011;50:413–8.
22. Kriwet K, Müller-Goymann CC. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. Int J Pharm. 1995;125:231–42.
23. Küchler S, Strüver K, Friess W. Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013;9:1255–63.
24. Schreiber S, Mahmoud A, Vuia A et al., Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. Toxicol Vitro. 2005;19:813–22.
25. Yun YE, Jung YJ, Choi YJ, Choi JS, Cho YW. Artificial skin models for animal-free testing. J Pharm Investig. 2018;48:215–23.
26. Planz V, Lehr C-M, Windbergs M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. J Controlled Release. 2016;242:89–104.
27. Dreher F, Fouchard F, Patouillet C, Andrian M, Simonnet J-T, Benech-Kieffer F. Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparations containing caffeine or α-tocopherol applied on human skin models or human skin ex vivo at finite doses. Skin Pharmacol Physiol. 2002;15:40–58.
28. Netzlaff F, Lehr C-M, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. Eur J Pharm Biopharm. 2005;60:167–78.
29. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64:128–37.
30. Herman A, Herman AP. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review: Essential oils for transdermal drug delivery. J Pharm Pharmacol. 2015;67:473–85.
31. Kogan A, Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. Adv Colloid Interface Sci. 2006;123–126:369–85.
32. Cross SE, Roberts MS, Jiang R, Benson HAE. Can increasing the viscosity of formulations be used to reduce the human skin penetration of the sunscreen oxybenzone? J Invest Dermatol. 2001;117:147–50.
33. Schwarz JS, Weisspapir MR, Friedman DI. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. Pharm Res. 1995;12:687–92.
34. Eros I, Abu-Eida EY, Csóka I, Sánta Z, Cserne A, Kövér T. Optimization of drug release from dermatological semisolid preparations: drug release from semisolid preparations. Drug Dev Res. 2003;59:316–25.

How to cite this article: Kichou H, Dancik Y, Eklouh-Molinier C, Huang N, Soucé M, Gressin L, Gillet G, Chourpa I, Munnier E, Bonnier F. Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin. Int J Cosmet Sci. 2022;44:262–270. doi:10.1111/ics.12772

II.8 #Article N°2: Efficiency of emulsifier-free emulsions in delivering caffeine and α-tocopherol to human skin

Check for updates

Received: 30 November 2022 | Accepted: 26 December 2022

DOI: 10.1111/ics.12837

International Journal of Cosmetic Science
SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE COSMÉTOLOGIE

ORIGINAL ARTICLE

Efficiency of emulsifier-free emulsions in delivering caffeine and α-tocopherol to human skin

Hichem Kichou[1] | **Amanda C. Caritá**[1] | **Guillaume Gillet**[2] | **Lahcen Bougassaa**[1] | **Xavier Perse**[1] | **Martin Soucé**[1] | **Laurianne Gressin**[2] | **Igor Chourpa**[1] | **Franck Bonnier**[1] | **Emilie Munnier**[1]

[1]EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Université de Tours, Tours, France

[2]GENIALIS, Henrichemont, France

Correspondence
Emilie Munnier, EA6295 NMNS (NanoMédicaments et NanoSondes), Université de Tours, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France.
Email: emilie.munnier@univ-tours.fr

Funding information
Conseil Régional Centre Val de Loire, Grant/Award Number: 2020-00138875 and 2020-00141275

Abstract

Objective: Increasing consumer demand for natural and environmentally friendly products is driving the cosmetic industry to seek greener and safer processes. High-frequency ultrasound technology (HFUT) stabilizes emulsions without adding emulsifying surfactants (ES). In this work, the formulation characteristics of an HFUT-treated emulsion and a Reference emulsion were compared for both caffeine and α-tocopherol.

Methods: A comparison was made between ES-free emulsions and the Reference emulsions based on droplet size, viscosity, pH and rheology behaviour for both active cosmetic ingredients. The permeation of caffeine and the skin retention of α -tocopherol were studied in vitro using Franz diffusion cells on human skin biopsies, considered the gold standard for permeation assays.

Results: The formulations developed were stable and showed suitable droplet size distribution. In the case of ES-free emulsions, the average droplet size was inferior to 1.5 μm regardless of the polarity of the active. All formulations presented a shear-thinning pseudoplastic behaviour, an attribute usually desired for cosmetic products. The skin permeation studies showed that in the case of caffeine (model hydrophilic molecule), the ES-free emulsion presented a delivery capacity similar to that of the Reference emulsion. However, for α-tocopherol (highly lipophilic model molecule), differences were observed in the distribution of the active in the *stratum corneum* with an advantage for the Reference emulsion, probably due to the impact of surfactants on the SC lipids.

Conclusion: This work demonstrates that HFUT is a reliable tool that is able to prepare stable ES-free emulsions loaded with hydrophilic or lipophilic active ingredients. Skin permeation studies confirm that the emulsions produced by HFUT promote the delivery of the actives to the human skin. In the case of α-tocopherol, the delivery efficiency was lower than with the Reference emulsion, especially in the SC layers, due to the absence of surfactants. Nevertheless, the

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2023 The Authors. *International Journal of Cosmetic Science* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Society of Cosmetic Scientists and Societe Francaise de Cosmetologie.

ES-free emulsion still represents a good compromise between efficacy and the need for green cosmetics in the market.

KEYWORDS
caffeine, emulsifier-free emulsion, formulations, human skin, skin permeation, ultrasound stabilization, α-tocopherol

Résumé

Objectif: La demande croissante des consommateurs pour des produits naturels et respectueux de l'environnement encourage l'industrie cosmétique à développer des procédés plus écologiques et plus sûrs. La technologie des ultrasons à haute fréquence (HFUT) permet de stabilizer les émulsions sans ajouter de tensioactifs émulsionnants (ES). Dans ce travail, les caractéristiques d'une émulsion traitée par HFUT et d'une émulsion de référence ont été comparées. La caféine et l'α-tocophérol ont été utilisés comme actifs modèles.

Méthodes: Les émulsions sans ES et les émulsions de référence on été comparées en termes de taille des gouttelettes, de viscosité, de pH et de comportement rhéologique pour les deux actifs. La perméation de la caféine et la rétention cutanée de l'α-tocophérol ont été étudiées in vitro sur des biopsies de peau humaine, en utilisant des cellules de diffusion de Franz, le 'gold standard' des tests de perméation.

Résultats: Les formulations développées sont stables et présentent une distribution appropriée de la taille des gouttelettes. La taille moyenne des gouttelettes des émulsions sans ES est inférieure à 1.5 µm, quelle que soit la polarité de l'actif. Toutes les formulations présentent un comportement rhéofluidifiant adapté à un usage cosmétique. Les études de perméation cutanée montrent que l'émulsion sans ES contenant de la caféine (molécule modèle hydrophile) présente une capacité de délivrance similaire à celle de l'émulsion de référence. Dans le cas de l'α-tocophérol (molécule modèle lipophile), des différences ont été observées dans la distribution de l'actif dans le *stratum corneum* (SC) avec un avantage pour l'émulsion de référence, probablement lié à l'interaction entre les tensioactifs et les lipides du SC.

Conclusion: Ce travail démontre que le traitement par HFUT permet de préparer des émulsions stables sans ES, quelle que soit la polarité des actifs cosmétiques à véhiculer. Les études de perméation cutanée confirment que les émulsions produites par HFUT permettent la diffusion cutanée des actifs dans la peau humaine. Même si dans le cas de l'α-tocophérol la quantité accumulée était plus faible, l'émulsion traitée par HFUT propose un bon compromis entre efficacité et éco-responsabilité.

INTRODUCTION

Emulsions are widely used as topical drug delivery systems for cosmetic and pharmaceutically active ingredients. In skin care, they can be formulated as lotions or creams, for example. They can be designed to deliver hydrophilic and lipophilic active ingredients, protecting them from degradation, while controlling their penetration into and/or through the skin. Besides, emulsions possess moisturizing properties and generally present interesting sensorial characteristics, which contribute to their application acceptability [1, 2].

By definition, emulsions are heterogeneous systems composed of a liquid phase dispersed in another

immiscible phase in the form of fine droplets. In the cosmetic field, the phases are mainly composed of water and oil and are named the aqueous phase and oily phase. Generally, amphiphilic molecules – such as emulsifying surfactants (ES) – are employed to overcome the intrinsic thermodynamic instability of the system [3, 4]. Besides, surfactants are also reported to play a role as skin penetration enhancers. They can modify the lipid structure of the *Stratum Corneum* (SC) through fluidization of the lamellae or extraction of some lipids from the intercellular matrix. Moreover, surfactants can also favour the solubilization of the active ingredient in the lipid channels and produce indirect enhancer effects by increasing the solubility of a poorly soluble active ingredient in the vehicle [5]. However, the literature supports that some surfactants may alter the lipid organization of the skin or interact with skin proteins, resulting in skin dryness, inflammation and cytotoxic effects in vitro [6, 7]. Furthermore, environmental concerns related to the use of these compounds have already been raised [2]. Therefore, to address the rising consumer demands for safer, more natural and sustainable products, the cosmetic sector had to reinvent itself to propose new formulations [8].

Several strategies have already been employed to replace the standard surfactants in the emulsions, such as the utilization of biosurfactants [9], sugar-based surfactants [10], solid particles [11], proteins and polysaccharides [12], among others. Nevertheless, the employment of these compounds does not necessarily represent a guarantee of an eco-friendly or safer product. For instance, nanocellulose is used as a solid particle to stabilize surfactant-free emulsions. However, its production from plant sources generally involves high water and energy consumption together with several chemical processes [13]. Sucrose acid esters, a class of sugar-based surfactants, triggered some allergy cases involving skin sensitization [14, 15]. Hence, stabilizing emulsions through a physical process instead of using chemical interfaces appears as an advantageous strategy to develop greener and safer products [16].

Among the available innovative technologies for emulsion preparation, ultrasound has attracted increasing attention due to its role in environmental sustainability [17]. The ultrasonic process has been used with success in the last decades, especially in the food industry [18, 19]. Since then, several potential advantages such as small droplet size and narrow distribution, long-term stability and low energy consumption have been reported. Usually, ultrasound waves are divided into two regions: high-energy low-frequency (>1 $W.cm^{-2}$, 20–100 kHz) and low-energy high-frequency (<1 $W.cm^{-2}$, 100 MHz) [20]. Low-frequency ultrasounds are very interesting to prepare emulsions with very small droplet sizes, like nanoemulsions. However, the intense disruptive forces generated by the cavitation mechanism may lead to a significant increase in the temperature, inducing the denaturation and/or destruction of molecules. For instance, Liu and co-workers described that the treatment with low-frequency ultrasound degraded the physical structure of chitosan, resulting in a decrease in molecular weight [21]. On the other hand, high-frequency ultrasounds present a non-destructive character and can be used to access physicochemical properties of the materials, such as physical state, composition and structure [19].

High-frequency ultrasound technology (HFUT) has already been used to stabilize emulsions in the food sector. This method, patented by Genialis (N149668A1), uses low-energy emulsification to create emulsions without an emulsifier in a non-destructive way. For this, the aqueous and the oily phase are pre-mixed and then placed in a thermostatic high-frequency ultrasound reactor equipped with 12 piezoelectric transducers which vibrate under influence of an electric field. In 2014, Kaci and co-workers used this method to prepare emulsions varying the oil ratio from 5% to 15% without the addition of an emulsifier. The method was successful since the average particle size decreased significantly for all tested oil ratios. Additionally, the HFUT treatment led to a decrease in pH combined with the accumulation of OH- at the oil/water interface, providing an electrostatic stabilization for the emulsion [22]. Since then, several fundamental aspects of emulsifier-free emulsions have been investigated. The narrow distribution and good stability of the oil droplets over time were demonstrated [23], as well as the biocompatibility of the system with human mesenchymal cells [24].

In a recent study from our research group, the kinetics of penetration of a hydrophilic model active ingredient (caffeine) loaded in an emulsifier-free emulsion prepared by HFUT was investigated on a reconstructed human skin (RHE) model. It was compared to the penetration provided by a common emulsion stabilized by petro-sourced surfactants (polysorbate 80 and sorbitan monooleate). The results showed that the emulsifier-free emulsion exhibits a nearly twofold lower average particle and over threefold greater viscosity compared to the classical emulsion. However, these differences did not alter the permeation profile. The caffeine steady flux, lag time and permeability coefficients between the emulsions differed only by 20%–30%. These data confirm that emulsion stabilization through HFUT does not compromise the emulsion efficacy [16].

Here, in this follow-up study, the objective was to validate the HFUT in the development of emulsions loaded with two types of model molecules (caffeine and α-tocopherol) that present very distinct physicochemical properties. Caffeine is hydrophilic, possesses an octanol/water partition coefficient (logKow) value of −0.07 and a molecular weight of 194.19 g.

mol^{-1}. In cosmetic products, it is mainly used as an anti-cellulite ingredient and a microcirculation improver [25, 26]. On the other hand, α-tocopherol is an antioxidant molecule with anti-ageing properties and presents a lipophilic character, a logKow value of 12 and a molecular weight of 430.72 $g.mol^{-1}$ [27, 28].

The skin permeation profiles of caffeine and α-tocopherol were investigated in human skin, which is considered the gold standard for permeation assays [29]. Although the use of RHE is relevant and well-established in the literature, studies report a greater permeation of active ingredients through these models compared to excised human skin. This could be explained mainly by differences between the lipid composition and organization [30]. Therefore, it is expected that the permeation results obtained here are more representative than the ones gathered in the group's previous work [16]. Besides, the emulsion composition was changed to better suit the market demands for greener products: instead of using paraffin oil (mineral origin) as an emollient, sweet almond oil (vegetable origin) was selected. The emulsions were characterized by means of pH, particle size, viscosity and rheology. Rheological measurements are important to foresee key parameters of the product behaviour during manufacturing, packaging and application [31].

In an attempt to better understand the impact of HFUT treatment on emulsion characteristics and efficacy, the results were compared with those given by formulations differing in composition only by the presence of surfactants (polysorbate 80 and sorbitan monooleate) as stabilizing agents and produced by traditional mechanical stirring only. Finally, this study demonstrates that emulsions stabilized by HFUT are stable, have adequate rheological characteristics for a cosmetic product and are able to deliver both hydrophilic and lipophilic active ingredients to the human skin. These results reinforce the potential of this technology for the cosmetic field.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Caffeine and α-tocopherol were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier), ultrapure water Elix® from Merck (Darmstadt) and NaOH pellets from VWR international (Briare). Oleic acid was purchased from AMI Ingredients (Tauxigny), xanthan gum from SACI-CFPA (Paris, France) and sweet almond oil from Cooper (Melun). Methanol and Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) were purchased from Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden).

ES-free emulsion preparation by HFUT

Caffeine emulsion

Caffeine was dissolved in ultrapure water to constitute the aqueous phase. Oleic acid was dissolved in sweet almond oil to constitute the oil phase. Oleic acid is a monounsaturated fatty acid often used in cosmetic products for its emollient effect [32].

α-tocopherol emulsion

α-tocopherol and oleic acid were dissolved in sweet almond oil to form the oil phase. The aqueous phase, therefore, consisted solely of ultrapure water.

For both caffeine and α-tocopherol emulsions, the oil phase was mixed into the aqueous phase by high-speed homogenization using a T25 digital Ultra-Turrax (IKA) for 5 min (11 400 rpm, 20°C). The emulsions were then treated using an ultrasonic reactor at 1.7 MHz for 30 min as used in our previous publication [16].

The pH was adjusted for topical application by adding NaOH to the process. Xanthan gum was then added to the mixture under continuous stirring for 5 min using a Silverson® overhead stirrer (Evry-Courcouronnes).

Reference emulsion preparation with ES

Caffeine emulsion

Caffeine and polysorbate 80 were dissolved in water to constitute the aqueous phase. Oleic acid and sorbitan monooleate were dissolved in sweet almond oil to form the oil phase.

A-tocopherol emulsion

α-tocopherol, sorbitan monooleate and oleic acid were dissolved in sweet almond oil to form the oil phase. For the aqueous phase, polysorbate 80 was dissolved in ultrapure water.

For both caffeine and α -tocopherol emulsions, the oil phase was mixed into the aqueous phase by high-speed homogenization using a Turbotest® disperser (VMI) for 10 min (2800 rpm, 20°C). To make the two emulsions comparable, the same amount of NaOH as in the ES-free emulsion was added. Xanthan gum was added to the mixture under stirring for 5 min (1500 rpm). The composition of the tested emulsions is summarized in Table 1.

TABLE 1 Composition (wt %) of tested ES-free emulsions

	Caffeine		α-Tocopherol	
Wt %	**ES-free**	**Reference**	**ES-free**	**Reference**
Ultrapure water Elix®	84.35	79.33	86.31	80.33
NaOH 0.1%	2.64	2.64	3.57	3.57
Sweet almond oil	9.93	9.94	7.91	8
Oleic acid	0.10	0.105	0.10	0.106
Active ingredient	1.99	2	1.98	1.98
Polysorbate 80	–	1.26	–	1.25
Sorbitan monooleate	–	3.74	–	3.74
Xanthan	1	1	1	1

The stability of the emulsions was checked by measuring the viscosity and the pH. The measurements were performed 3 days after preparation (D3) and then after 1 month at 40°C, away from light and at 75% humidity (accelerated ageing).

Droplets size measurement

The droplet's size measurement was recorded at D3. The droplet size distributions were obtained using a particle counter, shape and size analysis apparatus FC200S + HR (Occhio). The used method and software are well described in our previous work [16]. The average size (average diameter) D10, D50 and D90 corresponding, respectively, to 10%, 50% and 90% of the size of the particles analysed were used to evaluate both emulsion's quality and stability.

Viscosity and pH measurement

The viscosity was measured using a DV1 prime viscometer from AMETEK Brookfield, equipped with an LV-2 (63) spindle at 6 rpm speed rotation, for 5 min, at 21 ± 1°C. The pH was measured using a PH2700 pH meter from EUTECH instruments. Results for viscosity and pH measurements are reported as mean ± SD with $n = 3$ replicates.

Rheology measurements

Continuous and oscillatory measurements were performed using a rotational rheometer Kinexus PRO + (Netzsch-Gäretebau GmbH), equipped with a parallel plate geometry (PU40, roughened), with a diameter of 40 mm. All the experiments were carried out at 25 ± 0.1°C. A fixed gap between the geometries was pre-set to 0.1 mm and the sample's excess was removed. The software rSpace was used to process the data.

To obtain the flow properties of the emulsions, continuous ramp testing was performed by recording shear stress and viscosity at increasing shear rates, ranging from 0.01 to 10.000 s^{-1} (logarithmic mode) for 860 s.

Viscoelastic behaviour of the samples was studied using oscillatory measurements. To determine the linear viscoelastic region, the amplitude sweep test was performed at a constant frequency of 1 Hz with an increasing strain from 0.1% to 100% of deformation (logarithmic mode). Once this region was established, a frequency sweep ramp was performed within the linear region from 0.1 to 10 Hz. Then, storage (G′) and loss moduli (G″) were obtained.

Human skin biopsies

Dermatomed human skins, 20 mm diameter and ~500 μm thickness, were purchased from Alphenyx (Marseille). The skins were collected during breast skin surgery according to the French law L.1445CSP 'product and element of the human body taken during a surgical procedure and used for scientific research'. The skins exposed to caffeine emulsions were from three Caucasian female donors 55, 40 and 39 years old, named as donor 1, donor 2 and donor 3 respectively. For the α-tocopherol experiments, the skins were from two Caucasian and one North-African donor females of 21, 55 and 51 years old respectively. The donors were named as donor 4, donor 5 and donor 6 respectively. The skins were shipped frozen and were stored at −20°C until the day before the experiment.

Human skin permeation experiments

The permeation test was conducted using static vertical glass Franz diffusion cells (nine-cell setup) with a diffusion area of 0.64 cm^2 and a receptor volume of 5.0 mL (Permagear Inc.). All formulations were tested in three replicates, and the data were reported as mean ± S.D. *Experimental setup*: Human skin biopsies were taken out

of the freezers, on the evening proceeding the day of the experiments and thawed overnight in a cold room (4°C). On the experiment day, biopsies were then mounted on the Franz diffusion cells. The receptor compartment of each cell was filled with degassed PBS (pH 7.4) and was maintained at 37°C. The receptor medium was kept under continuous synchronous stirring using a magnetic stirrer. Before applying the formulations, the skins were placed in contact with the receptor medium (PBS) for 30 min to reach equilibrium hydration. The transepidermal water loss (TEWL) was then checked with a VapoMeter from (Delfin Technologies).

Caffeine permeation experiment

After the equilibrium step, 600 mg of caffeine emulsion (ES-free or Reference) was added to the donor compartment of each Franz diffusion cell. 200 µL of receptor solution was collected every 0.5 h from 0.5 to 6 h and every 1 h from 6 to 12 h. All receptor samples were analysed by HPLC aiming for the quantification of the caffeine amount across the skin. After the experiment, all skins were carefully swabbed with cotton tips to remove the excess formulation. The skins were then cut into small pieces and placed overnight in 2 mL of methanol for extraction. The extracted solutions were analysed using HPLC. The results are reported as Mean ± SD for the three donors (donor 1, donor 2 and donor 3) and expressed as the percentage of the applied dose.

α-Tocopherol penetration experiment

Same as the caffeine protocol, α-tocopherol emulsion (ES-free or Reference) was added to the donor compartment. At the end of the experiment (8 h), several steps were carried out to quantify the amount of α-tocopherol within the skin. The first step is to remove the emulsions from the skin surface and then gently remove the skin from the receptor compartment. In order to remove the excess of emulsions, the skins were swabbed with cotton tips soaked first in ethanol. Secondly, a tape stripping (TS) procedure was performed to determine the distribution of α-tocopherol in the different layers of the SC. Overall, 22 stripping disks (14 mm diameter, Monaderm, Monaco) were used in this study. The first two tapes were used to remove the excess of the formulation, and the rest were used for the stratum corneum stripping. The TEWL was measured before the TS procedure and after each five tapes to assert when the stratum corneum was completely removed.

The stripes were placed into their corresponding tubes containing 600 µL of methanol aiming for the extraction of α-tocopherol. Skin thickness was calculated by dividing the skin mass by SC density (~1 $g.cm^{-3}$) and skin area (0.64 cm^2) [33]. After the TS procedure, the skin samples were placed into a water bath at 62°C for 1 min aiming for the separation of the dermis (DE) from the epidermis (E). The DE and E were then weighed and placed in their corresponding tubes containing 1 mL of methanol for extraction.

The SC penetration profiles for each donor are presented as the average of the amount of the α-tocopherol reported per the diffusion area as a function of the SC depth. For the DE and E, the amount of α-tocopherol is presented as an average of the amount of α-tocopherol per skin weight for each donor. The data are expressed as mean ± standard deviation; $n = 3$.

HPLC analysis

HPLC analyses were performed using an Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Voisins-le-Bretonneux) piloted with Chromeleon 7.1 software. A C18 column with a particle size of 5 µm and length of 4.6 × 150 mm (Interchim) was used and adjusted at 25°C. The software used was Chromeleon 7.1 (Thermo Scientific, chromatography data system software).

For caffeine quantification

The receptor medium was analysed using a DAD UV ultimate 3000 detector. The detection wavelength for caffeine was 272 nm. The mobile phase used in isocratic mode was methanol 50%:water 50% (v/v)+ 10 mM of phosphoric acid. The duration of the analysis of each sample was 6 min at a flow rate of 1 $mL.min^{-1}$. A standard calibration curve was prepared prior to analysis. The observed retention time was 2.62 ± 0.008 min.

For tocopherol quantification

The SC stripes, epidermis and dermis were extracted using methanol. The extracted solutions were analysed using a RF-10AXL Fluorescence detector from Shimadzu. The excitation and emission wavelengths were 292 and 340 nm respectively.

The mobile phase used in isocratic mode was 100% methanol. The duration of the analysis of each sample was 10 min at a flow rate of 1 $mL.min^{-1}$. A standard calibration curve was prepared prior to analysis. The observed retention time was 7.82 ± 0.01 min.

Data analysis

Results are presented as a plot of the cumulative mass of permeated caffeine per area of skin model (μg.cm^{-2}):

$$Q_{\mathrm{n}} = \frac{C_n \times \mathrm{V_{rec}} + \sum_{i=1}^{i=n-1} C_{\mathrm{i}} \times V_{\mathrm{i}}}{S} \quad (1)$$

where Q_n (μg.cm^{-2}) is the cumulative mass of caffeine at a time n, normalized by the diffusion surface S, C_n (μg.cm^{-3}) is the concentration of the receptor medium determined by HPLC, V_{rec} is the volume of the receiving compartment (5 mL), C_i is the concentrations calculated at the previous time interval and V_i is the sample volume (200 μL).

Three additional parameters characterizing caffeine permeation, namely the steady-state flux, lag time and permeability coefficient, were calculated using a mathematical model based on Fick's second law. The calculation method is fully described in our previous works [16, 28].

Presently, the steady-state flux (J_{ss} = dQ/dt, expressed in μg.cm^{-2}.h^{-1}) is equal to the slope of the cumulative amount profile in the steady-state (linear) portion of the profile.

The lag time (t_{lag}, expressed in hours) is the delay required for diffusion through the skin to reach a steady state. It is the intercept of the slope (J_{ss}) with the time axis.

The permeability coefficient (Kp, expressed in cm h^{-1}) represents the skin penetration rate of the active ingredient obtained by dividing the flux by the donor concentration.

All results are reported as mean ± SD (n = 3). The data analysis was performed using Xlstat. The statistical significance was determined using Student's t-test with a level of significance set for $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Emulsions have been widely investigated as potential vehicles for the delivery of drugs to specific sites in the body [34]. Droplet size may influence the pharmacological effect of the formulation [1, 34]. It has been reported that emulsions with droplets of a diameter inferior to 5 μm enhance the penetration of diazepam [35]. A relation between the apparent permeability coefficient of a drug and the droplet size of the formulation has been shown, and attributed to the change in the total area of the dispersed phase that occurs with the change in droplet size [36]. As a result of these studies, it is generally believed that the skin penetration of ACI increases when the droplet size of emulsions, in which the active ingredient is incorporated, is reduced.

In our previous study, it was shown that there was no significant difference between the amount of caffeine permeated through reconstructed human skin between Reference emulsion (with standard ES) and ES-free emulsion (without ES) [16]. In this follow-up study, the aim is to assess the impact of the polarity of the active cosmetic ingredient (ACI) on the ES-free emulsion preparation process, stability and performance compared to Reference emulsion containing ES.

For this purpose, the average particle size D10, D50 and D90 (corresponding, respectively, to 10%, 50% and 90% of the size of the particles analysed) for ES-free emulsions and Reference emulsions for both caffeine and α-tocopherol were measured. The data from Table 2 show that all prepared emulsions (ES-free and Reference) were suitable for cosmetic use with an average particle size of <5 μm. Especially, the ES-free emulsions show a size of 1.357 ± 0.932 μm for caffeine ES-free emulsion and 1.327 ± 0.809 μm for α-tocopherol ES-free emulsion. No significant differences were observed between the ES-free and References emulsions for both caffeine (p = 0.67 > 0.05) and α-tocopherol emulsions (p = 0.31 > 0.05).

Moreover, the ES-free emulsions containing caffeine and α-tocopherol were compared and no significant differences were observed (p = 0.33 > 0.05), with slightly lower values for caffeine ES-free emulsions for D10 to D50. Indeed, D10 values indicate that 10% of particle size

TABLE 2 Average particle size, D10, D50 and D90 for the caffeine and α-tocopherol ES-free emulsions

	Caffeine		α-tocopherol	
	ES-free emulsion	**Reference emulsion**	**ES-free emulsion**	**Reference emulsion**
Average size [μm]	1.357 ± 0.932	1.238 ± 0.865	1.327 ± 0.809	2.054 ± 1.282
D10 [μm]	0.519	0.519	0.561	0.66
D25 [μm]	0.703	0.647	0.734	1.11
D50 [μm]	1.122	0.976	1.165	1.83
D75 [μm]	1.721	1.567	1.704	2.67
D90 [μm]	2.500	2.281	2.321	3.62

Note: Data are reported as mean ± SD (n = 3).

has a diameter below 0.519 µm for caffeine compared to 0.561 µm for tocopherol. Fifty per cent of droplets are below 1.122 µm for caffeine emulsions against 1.165 µm for tocopherol. However, 90% of the droplets are below 2.500 µm for caffeine emulsions while for α-tocopherol it is found to be 2.321 µm. The droplet size and the droplet size distribution are important for the stability and viscosity proprieties of the emulsions. Overall, emulsions (ES-free and Reference) average particle size and distribution in this work were less than 5 µm, indicating, therefore, the good quality of the obtained emulsions for both caffeine and α-tocopherol. The small droplets size observed for both caffeine and α-tocopherol ES-free emulsions is due to the deformation and breakage of oil droplets during the propagation of acoustic waves [22, 24], leading to a robust process for the preparation of HFUT emulsions, including both caffeine, the hydrophilic ACI ($\log K_{OW} = -0.07$, [37]), and α-tocopherol, the lipophilic ACI ($\log K_{OW} = 12$, [38]). The close values of D10, D25 and D50 between the two HFUT-prepared emulsions raise the hypothesis that the droplet size will not be dependent on the properties of the phases but only on the HFUT parameters. Indeed, even if the viscosity of the oily phase is higher when 2 mL of α-tocopherol (a very thick liquid) replaces 2 mL of almond oil, the droplet size does not increase. Comparatively, even if the mean droplet size is not significantly different for the two Reference emulsions obtained by mechanical stirring, the droplet size distribution shows that the droplet size has a tendency to increase when α-tocopherol is added in the oily phase, especially for the D25 and D50 (Table 2).

Rheological behaviour

The rheology technique is widely used by the cosmetic industry. Continuous and oscillatory measurements are usually employed to predict the product behaviour in real-time conditions during manufacturing, packaging and application [31]. Overall, the studied emulsions present a very similar rheological behaviour, regardless of the polarity of the ACI and the presence or absence of surfactant.

Initially, the samples were evaluated by means of a flow test. As can be seen in Figure 1, all formulations exhibited shear-thinning pseudoplastic behaviour, i.e. the viscosity decreased with increasing shear. Shear thinning is very often observed in cosmetic emulsions [39]. It is considered a desirable rheological feature for this category of product because it indicates that the formulation can be spread easily into the skin [2]. Such a pronounced shear-thinning behaviour is often attributed to the presence of xanthan gum in the system [40, 41]. Xanthan gum is an anionic polysaccharide, with high molecular weight, produced by *Xanthomonas campestris* [42]. Due to its natural origin,

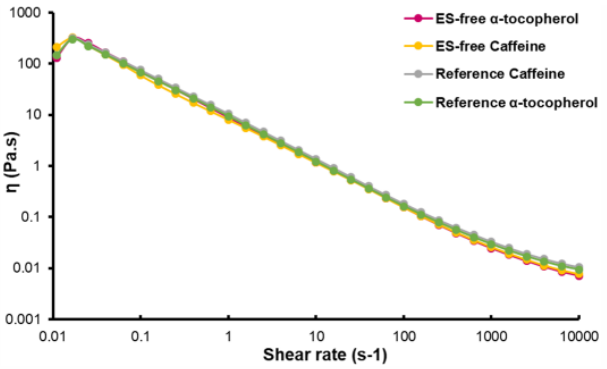


FIGURE 1 Viscosity as a function of shear rate for ES-free α-tocopherol emulsion (represented in pink), ES-free caffeine emulsion (in yellow), Reference caffeine emulsion (in grey) and Reference α-tocopherol emulsion (in green).

high electric potential and pseudo-plasticity, xanthan gum has been extensively used as a thickener agent in the food and cosmetics industries [43].

In Figure 1, one can note that at low shear rates, the emulsions present a higher apparent viscosity as the result of the formation of a cohesive interfacial film around the emulsion droplets. This effect is well documented in the literature and plays an important role in emulsion stability [41]. As the shear rates increase, very low viscosity values are obtained.

The approximate values of apparent viscosity and the shear rate at 0.1, 1, 10, 100 and 1000 s^{-1} were collected and can be seen in Table 3. It is also worth mentioning that the different shear rate ranges may be related to physical operations commonly applied when using a cosmetic emulsion with for instance, draining under gravity for emulsions on hands between 0.01 and 10 s^{-1}; dipping and pouring between 10 and 100 s^{-1} and rubbing application around 1000 s^{-1} [44].

It is possible to observe that all the formulations present similar viscosity values in all ranges of shear rates. This result was expected since the xanthan gum, which has an important contribution to the rheological properties, was added to the formulations after the emulsification process and was not exposed to the ultrasounds. Overall, our results are in agreement with previous works available in the literature. However, the viscosity values obtained here are smaller than the ones found by other authors using the same amount of xanthan gum [40, 41]. On the other hand, in these studies, different emollients and emulsifiers were used and it is known that these ingredients may also impact the rheological parameters of the emulsions [45, 46].

Oscillatory measurements (Figure 2) showed that the storage moduli (G') had higher values than the loss moduli (G") in all samples. The emulsions did not show any crossovers between G' and G" across all tested frequencies

TABLE 3 Values of viscosity (in Pa.s) collected at different shear rates (in s^{-1}) from the shear flow test for the four studied emulsions

Emulsion	η (0.1)	η (1)	η (10)	η (100)	η (1000)
ES-free caffeine	58.97	8.01	1.15	0.15	0.02
Reference caffeine	75.03	10.51	1.37	0.18	0.03
ES-free α-tocopherol	73.00	8.90	1.17	0.15	0.02
Reference α-tocopherol	66.54	9.28	1.21	0. 16	0.02

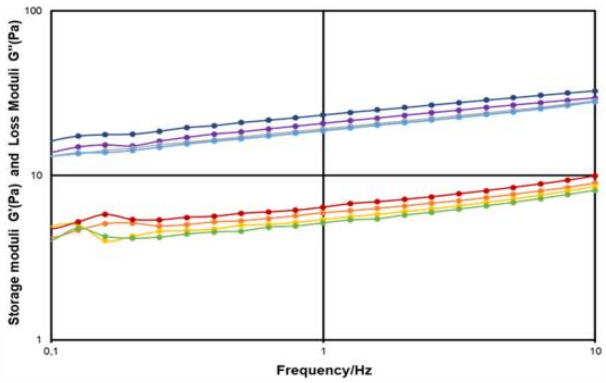


FIGURE 2 Viscoelastic behaviour of the emulsions. Evolution of G′ and G″ moduli as a function of frequency. The G′ of Reference caffeine emulsion is represented in dark blue; in purple, G′ of ES-free α-tocopherol emulsion; in grey, G′ of ES-free caffeine emulsion and in light blue, G′ of Reference α-tocopherol emulsion. The G″ of Reference caffeine emulsion is displayed in red; in orange, G″ of ES-free α-tocopherol emulsion; in yellow, G″ of ES-free caffeine emulsion and in green, G″ of Reference α-tocopherol emulsion.

(0.1–10 Hz). These results indicate a prevalence of the elastic component, generally trended towards gel-like behaviour [47]. This characteristic is often related to better system stability [48]. In a stable formulation, where no creaming process is observed, the droplets do not move despite the gravitational force. This demonstrates that the formulation is behaving elastically rather than as viscous fluid. The presence of thickeners in the system, such as xanthan gum, favours this elastic behaviour, at least over a certain concentration. In 2012, Aben and co-workers showed that emulsions containing at least 0.5% of xanthan gum were stable for at least 8 months due to a formation of a three-dimensional network around the droplets [49].

Emulsion stability

In order to assess the emulsion's stability, viscosity and pH were measured 3 days (D3) after emulsion preparation and then after 1 month of storage at 40°C, away from light and at 75% humidity. The emulsions' stability was also checked visually after 1 month of accelerated ageing conditions and no phase separation between the aqueous and the oil phase was observed. Table 4 summarizes the viscosity, pH and average size of the droplets for caffeine and α-tocopherol ES-free and Reference emulsions.

At D3, the viscosity values at low shearing were 8071 ± 100 mPa.s for ES-free caffeine emulsion and 9891 ± 64 mPa.s for Reference caffeine emulsion. Regarding α-tocopherol formulations, the values were 9318 ± 91 mPa.s for ES-free emulsion and 10 206 ± 37 mPa.s for Reference emulsion. The higher viscosity value observed for α-tocopherol Reference emulsion in comparison to α-tocopherol ES-free emulsion can be attributed to the presence of ES in the formulation. The caffeine ES-free emulsion viscosity was slightly lower than the α-tocopherol ES-free emulsion viscosity due to the hydrophilic/lipophilic character of the ACIs and these values are significantly different with $p = 0.001 < 0.05$. For the pH, both emulsions show a slightly acidic pH which is recommended for topical application [50]. Minimally different values were obtained, i.e. pH = 6.75 (caffeine) and pH = 6.48 (α-tocopherol). These pH values were reached by adding a pH regulator to both emulsions and no statistical differences were found between the two emulsions with $p = 0.48 > 0.05$.

Concerning the emulsion stabilities, after 1 month of storage, the caffeine ES-free emulsion displayed a viscosity value of 8464 ± 430 mPa.s, and therefore, not significantly different ($p = 0.58 > 0.05$) from the value at D3, i.e 8071 ± 100 mPa.s. The same observation concerning ES-free α-tocopherol emulsion with $p = 0.28 > 0.05$. The viscosity values were 9878 ± 206 mPa.s after 1 month of storage and 9318 ± 91 mPa.s at D3. Caffeine Reference emulsion presented a viscosity value of 10 506 ± 126 mPa.s, which demonstrates an increase in viscosity in comparison with the values obtained at D3. A modest decrease in viscosity was observed in α-tocopherol Reference emulsion. The viscosity values passed from 10 206 ± 37 mPa.s to 9578 ± 310 mPa.s after 1 month. The pH values were stable in time as well as the average size of the droplets (see Table 4). The ES-free emulsion showed droplets of 1.337 ± 0.891 µm for caffeine and 1.319 ± 0.775 µm for α-tocopherol, and therefore, not significantly different ($p = 0.56 > 0.05$ for caffeine and $p = 0.25 > 0.05$ for α-tocopherol) from the value at D3. No significant differences were observed for the Reference emulsions ($p = 0.53 > 0.05$ for caffeine and $p = 0.21 > 0.05$ for α-tocopherol). Based on the results above, it can be concluded that the emulsions

TABLE 4 Viscosity, pH and average size of the droplets after 3 days (D3) and one month of storage for the caffeine and α-tocopherol ES-free emulsions and Reference emulsions

	Caffeine				α-Tocopherol			
	Es-free		Reference		Es-free		Reference	
	D3	1 month	D3	1 month	D3	1 month	D3	1 month
Viscosity (mPa.s)	8071 ± 100	8464 ± 430	9891 ± 64	10 560 ± 126	9318 ± 91	9878 ± 206	10 206 ± 37	9578 ± 310
pH	6.79 ± 0.59	5.66 ± 0.12	5.69 ± 0.19	5.22 ± 0.11	6.48 ± 0.17	6.63 ± 0.06	6.51 ± 0.05	6.42 ± 0.06
Average Size (μm)	1.357 ± 0.932	1.337 ± 0.891	1.238 ± 0.865	1.191 ± 0.847	1.327 ± 0.809	1.319 ± 0.775	2.054 ± 1.282	1.987 ± 0.984

Note: Data are reported as mean ± SD ($n = 3$).

are stable for at least 1 month at 40°C, which indicates good long-term stability under normal conditions [51]. These results corroborate the oscillatory rheological measurements previously presented, which indicate the predominance of the elastic component in the system and, consequently, good stability.

Caffeine permeation

Caffeine is a small hydrophilic compound of the methylxanthine class [52–54]. This molecule has been employed in several cosmetic preparations, especially as an anti-cellulite ingredient. According to Herman et al., caffeine can stimulate the degradation of fats during lipolysis through the inhibition of phosphodiesterase activity [55]. More recently, the antioxidant properties and photoprotective capacity of caffeine have also been reported [56]. In addition to its biological properties, caffeine is recognized as a reference substance for in vitro skin absorption tests using Franz diffusion cells by the Organization for Economic and Co-operation and Development (OECD) which makes its utilization routinely adopted [57, 58].

It is recognized that the use of human skin is subject to national and international ethical considerations and conditions. Dermatomed skin (typically 200–500 μm thick) can also be used, provided that the integrity of the skin can be demonstrated [59]. The skin retention of caffeine was measured for both formulations. The average amount of caffeine recovered from the three donors displayed a value of 0.65% ± 0.14% for the skin exposed to ES-free and 0.51% ± 0.04% for Reference emulsions. No significant differences were found between the ES-free and Reference emulsions ($p = 0.22 > 0.05$). Concerning the permeation kinetics, Figure 3 shows the cumulative amount of caffeine ES-free emulsion and Reference emulsion through human skin as a function of time for donor 1, donor 2 and donor 3.

Overall, profiles have a similar trend for all donors for ES-free and Reference emulsions, and a slight increase between 30 min and 6 h is observed first corresponding to the pre-steady-state (non-linear) portion of the profile. A more significant increase is then observed between 6 and 12 h corresponding to the steady-state (linear) portion of the kinetics. In order to compare the efficiency of the ES-free emulsions to deliver the active molecule, the cumulative amounts of caffeine at 12 h were compared to the Reference emulsion (with ES) for the involved donors. *Donor1*: Emulsions display cumulative amounts of caffeine (12 h) equal to 16.17 ± 5.11 $\mu g.cm^{-2}$ (ES-free emulsion) and 22.04 ± 0.15 $\mu g.cm^{-2}$ for the RE. The values were very close, and no statistical differences were found between the two emulsions with $p = 0.18 > 0.05$. For Donor

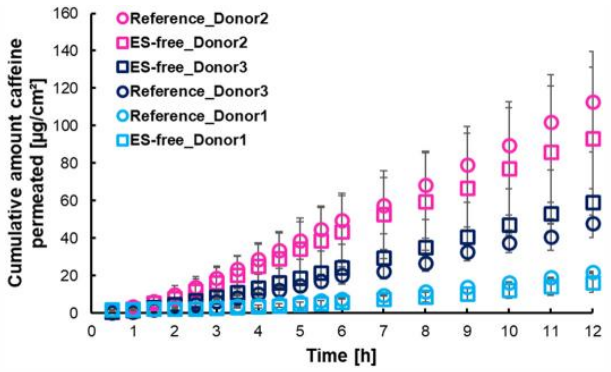


FIGURE 3 The cumulative amount profiles of caffeine ES-free emulsions (Squares) and Reference emulsions (circles) through human skin as a function of time (Turquoise: Donor 1. Blue: Donor 2. Pink: Donor 3). Data are shown as means ± SD ($n = 3$)

2, the 12 h caffeine amounts were equal to 93.06 ± 37.98 µg.cm^{-2} and 112.77 ± 26.95 µg.cm^{-2} for ES-free emulsion and the RE respectively. The values were statistically compared and no differences were found ($p = 0.51 > 0.05$). Concerning donor 3, the quantities of caffeine after 12 h were about 59.34 ± 6.99 µg.cm^{-2} (ES-free emulsion) and 48.00 ± 7.55 µg.cm^{-2} for the RE. The values were quite close and were not statistically different ($p = 0.13 > 0.05$). We observed that the cumulative amount of caffeine after 12 h is donor dependent, for instance, the cumulative amount of caffeine from ES-free emulsion through Donor 1 was 6 times and 4 times lower than Donor2 and Donor3 respectively. However, no statistical differences were found between Donor 2 and Donor 3 (large error bars) with $p = 0.20 > 0.05$. It was expected that the amount of caffeine permeated across a complex biological matrix like skin would display a level of heterogeneity inherent to biological systems [60]. Besides, even though it is well established that human skin is the gold standard for permeation assays, large disparities in human skin permeability have been reported due to inter- and intra-individual variations, such as the skin site selected, age of the donor and the donor's lifestyle [29, 61].

The steady-state fluxes (Jss), lag times (tlag) and permeability coefficients (kp) were calculated for both ES-free emulsion and Reference emulsion from permeation data as previously described [16, 28]. The data are summarized in Table 5. The caffeine steady-state fluxes (Jss) display no significant differences between the ES-free emulsion and Reference emulsion for all donors ($p = [0.07, 0.48] > 0.05$). The caffeine flux through donor 1 skin was equal to 1.80 ± 0.79 µg.cm^{-2}.h^{-1} for ES-free emulsion and 2.20 ± 0.0.17 µg.cm^{-2}.h^{-1} for Reference. For donor 2, the values were about 8.37 ± 3.09 µg.cm^{-2}.h^{-1} (ES-free emulsion) and 10.47 ± 2.48 µg.cm^{-2}.h^{-1} (Reference emulsion). Concerning donor 3, for the Es-free emulsion, the value was 5.80 ± 0.53 µg.cm^{-2}.h^{-1}, and for the Reference emulsion, 4.68 ± 0.62 µg.cm^{-2}.h^{-1}. Moreover, comparing the lag time trends, the steady state is reached sooner through the human skin exposed to ES-free emulsions. For instance, the ES-free emulsion lag time through donor is about 2.45 h, which appears to be lower compared to the Reference emulsion lag time (2.74 h). As the fluxes, the permeability coefficients do not show any statistically significant differences between the ES-free emulsion and Reference emulsion for all donors ($p = [0.07, 0.48] > 0.05$).

In 2017, Musazzi and co-workers studied the skin permeation of caffeine loaded on a conventional emulsion stabilized by Polysorbate 20 (3%) and a commercial mixture of PPG-26-buteth-26 and PEG-40 hydrogenated castor oil (3%). Caffeine was added to the system at a concentration of 0.4%. The permeation assay was performed in a modified Franz cell system, and human skin originating from a single donor was selected as a membrane model. After 24 h of exposition, the authors reported an absorption rate of 0.3% of the applied dose [62].

The approximate absorption rates of caffeine obtained in the present study are, for ES-free emulsion, 0.1%, 0.5% and 0.3%, and for Reference emulsion, 0.1%, 0.6% and 0.3%, for donors 1, 2 and 3 respectively. No difference could be seen between the two formulations. In fact, for donors 2 and 3, the formulations of the present study were even more effective in delivering caffeine to the skin than Musazzi's formulations since the same or even a superior absorption rate was obtained in half of the exposition time. This may be due to the higher concentration of caffeine in the emulsions tested (2% wt/wt). Indeed, in a study published in 2011, Mustapha and co-workers examined the variation in caffeine absorption according to its concentration in the formulation and the amount applied to the human skin. For this end, three identical base gels were used at 1%, 3% and 5% of caffeine, and different amounts of each gel were applied to the skin (1, 2, 5 and 7 mg.cm^{-2}). It was observed that a rise in the caffeine concentration or the deposited amount of formulation led to a bigger accumulation of caffeine, while the absorption rate decreased. Nevertheless, the authors reported that the same amount of 157 µg of caffeine, applied as 5 mg.cm^{-2} of gel 1% or 1 mg.cm^{2} of gel 5%, showed different permeation results. Both diffusion flow and the accumulated amount were bigger from the less concentrated gel [63].

Overall, the results presented here are promising. This study demonstrated that the ES-free emulsion is capable of delivering caffeine to human skin with an efficiency equivalent to that of a conventional emulsion, stabilized by surfactants. Taking into account the long story of caffeine as a model hydrophilic compound, these results may be relevant for other molecules with similar physicochemical properties.

TABLE 5 Steady-state fluxes (J_{ss}), lag times (t_{lag}) and permeability coefficients (k_p) obtained from cumulative amount profiles of caffeine from ES-free and Reference emulsion through human skin samples from three donors

	Donor 1		Donor 2		Donor 3	
	ES-free	Reference	ES-free	Reference	ES-free	Reference
Jss [$\mu g.cm^{-2}.h^{-1}$]	1.80 ± 0.79	2.20 ± 0.17	8.37 ± 3.09	10.47 ± 2.48	5.80 ± 0.53	4.68 ± 0.62
tlag (h)	2.45 ± 0.12	2.74 ± 0.19	0.99 ± 0.59	1.35 ± 0.27	1.82 ± 0.36	1.89 ± 0.28
kp [$cm.h^{-1}$]	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.42 ± 0.16	0.52 ± 0.12	0.29 ± 0.03	0.23 ± 0.03

Note: All data displayed as mean ± standard deviation of $n = 3$ experiments.

α-Tocopherol SC penetration

α-Tocopherol, or vitamin E, is one of the most studied non-enzymatic antioxidants for topical application [64]. When incorporated into cosmetic products, α-tocopherol can also exert relative protection against UV radiation, reducing the appearance of erythema and oedema [65, 66]. In addition, in vivo efficacy tests show an improvement in the visible signs of ageing, with a reduction in the volume of skin wrinkles and an increase in moisture and elasticity [27]. However, to perform all its biological activities, α-tocopherol has to cross the effective skin permeation barrier. α-tocopherol is a lipophilic ACI with an octanol/water partition coefficient log K_{OW} = 12 and a molecular weight of 430.72 $g.mol^{-1}$ [38]. Its physicochemical properties might make its delivery across biological barriers even more challenging. Due to its molecular weight and solubility properties, the assessment of α-tocopherol penetration is generally done using the tape stripping (TS) approach which is widely used to investigate skin penetration of lipophilic active ingredients [67–69]. Several works show the usefulness of the TS to follow the penetration of α-tocopherol within the SC [70, 71].

Figure 4 shows the SC depth profiles of the α-tocopherol ES-free emulsions and Reference emulsions in the SC for donor 4, donor 5 and donor 6 using a tape stripping approach. The two first stripes corresponding to the surface (0 μm) were performed to remove the excess emulsions at the surface [33], therefore, the amount of α-tocopherol at 0 μm was not taken into account for the established SC profiles presented in Figure 4. The profiles show the same trend for all donors including the skin exposed to both ES-free and Reference emulsions. The highest amount of penetrated α-tocopherol was observed at the outermost layers (~8 μm under the surface) and then a decrease in the α-tocopherol amount by skin depth up to the deeper SC layers (~30 μm under the surface) was then observed.

The skin samples exposed to ES-free emulsion from donor 4, donor 5 and donor 6 (Figure 4) show a maximum amount of α-tocopherol at 8 μm and the values were equal to 26.38 ± 4.34 $\mu g.cm^{-2}$ (donor 4), 34.51 ± 3.78 $\mu g.cm^{-2}$ (donor 5) and 26.63 ± 5.90 $\mu g.cm^{-2}$ (donor 6). The

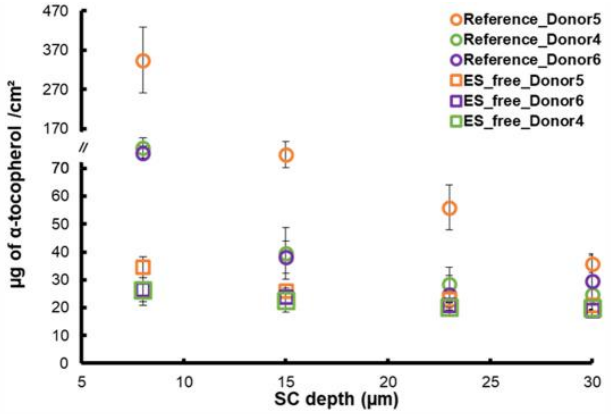


FIGURE 4 Depth profiles of the α-tocopherol ES-free emulsions (squares) and Reference emulsions (circles) in the SC for donor 4 (green), donor 5 (orange) and donor 6 (purple). Data are shown as means ± SD ($n = 3$).

α-tocopherol amounts as a function of depth were compared for all donors and no statistically significant differences were observed from 8 μm to 30 μm ($p = 0.07$ to $0.95 > 0.05$) for the skin samples exposed to ES-free emulsions. However, the skin samples exposed to Reference emulsion display the highest amount of tocopherol compared to ES-free emulsions. Indeed, the amounts at 8 μm depth (the maximum) were equal to 121.49 ± 25.23 $\mu g.cm^{-2}$ (donor 4), 345.01 ± 84.29 $\mu g.cm^{-2}$ (donor 5) and 109.16 ± 16.81 $\mu g.cm^{-2}$ (donor 6). This difference tends to reduce as a function of depth until it becomes very close to the skins exposed to ES-free emulsions at 30 μm (Figure 4).

The accumulation of the α-tocopherol was also investigated in the epidermis and the dermis. Figure 5 represents the amount of α-tocopherol per skin weight for donor 4, donor 5 and donor 6 recovered in (a) the epidermis exposed to ES-free emulsion and Reference emulsion and (b) in the dermis exposed to ES-free emulsion and Reference emulsion.

Statistical comparisons were performed and no statistically significant differences were observed for the recovered amount of α-tocopherol in the epidermis exposed to ES-free and Reference emulsions including all donors

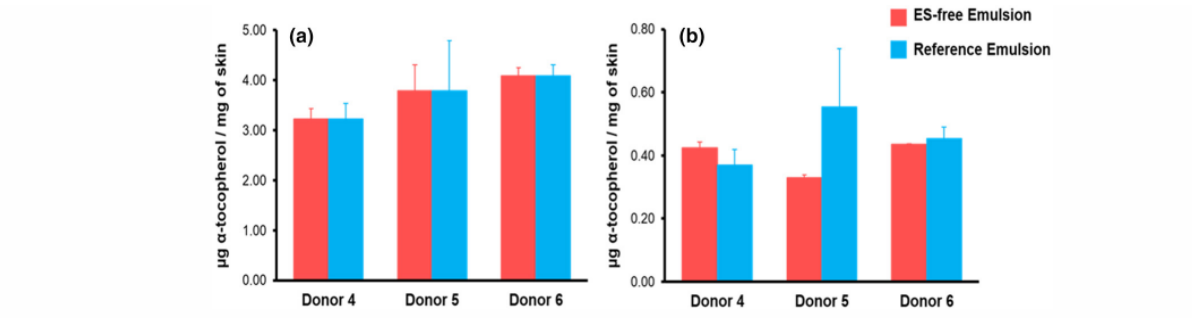


FIGURE 5 Amount of α-tocopherol per skin weight for donor 4, donor 5 and donor 6 recovered in (a) the epidermis exposed to ES-free emulsion (Pink bars) and Reference emulsion (Turquoise bars) and (b) in the dermis exposed to ES-free emulsion (pink bars) and Reference emulsion (Turquoise bars). Data are shown as means ± SD ($n = 3$).

($p = 0.08$ to $0.32 > 0.05$). Same observation was for the amount of α-tocopherol in the dermis exposed to ES-free and Reference emulsions ($p = 0.17$ to $0.65 > 0.05$). These results are relevant to the fact that the calculated flux was similar (Table 4). Unsurprisingly, the epidermis and the dermis contain much lower quantities of α-tocopherol than the SC. This lower accumulation is obviously due to the high water content of the epidermis (40%) and dermis (75%) [72], thus limiting the penetration of α-tocopherol through these hydrated layers due to its high lipophilicity.

Several works about the penetration and the delivery of α-tocopherol through the skin layers used penetration enhancers or sophisticated formulations to promote its penetration into the skin. In order to compare the efficacy of the formulation independently from the applied dose and the used concentration, the amount of α-tocopherol found in the literature was expressed as a percentage of the applied dose/concentration. In the 2000s, Derher et al. demonstrated that the use of different formulations can increase the amount of α-tocopherol in the human SC. Indeed, after 24 h after applying the alcohol-containing hydrogel, a significantly higher amount of α-tocopherol (10.4%) was recovered in the human epidermis as compared to an O/W emulsion (4.4%) and a W/O emulsion (2.5%) [73]. In 2006, Bucchi Alencastre et al. performed in vitro studies using human skin (24 h of exposition) and showed that the O/W emulsion containing α-tocopherol deliver 5.2% of the applied dose in the SC layer [74]. Recently, Branka et al. have studied the distribution of vitamin E in the reconstructed human epidermis and it has been shown that the epidermis distribution of the vitamin E was about 6.5% of the applied dose [64].

In this work, the amounts of α-tocopherol delivered in the SC from the ES-free emulsion were 1% (donor 4 and donor 6) and 1.2% (donor 5). However, the α-tocopherol delivery into the SC using the Reference emulsion was 2.3 times higher (donor 4 and 6) and 4.8 times higher (donor 6) compared to the ES-free emulsion, and this was expected due to the effect of surfactant contained in the Reference emulsion on the skin generally and the SC especially. In fact, surfactants can damage SC lipids in two distinct ways: insertion into the lipid bilayer and lipid extraction. Intercalation of surfactants into the SC induces changes in the lipid bilayer, fluidizing it and leading to an enhanced SC permeability [75]. Surfactants also solubilize and extract SC lipids, which reduces the barrier quality of the SC, leading to skin dryness and dysfunction over time [76–80]. It has been demonstrated in this study that ES-free emulsions stabilized by HFUT allow similar amounts of active ingredients to be delivered through the skin as the Reference emulsions (with surfactants). In the case of caffeine (hydrophilic molecule), no statistically significant difference was observed between the two emulsions. However, for the lipophilic molecule (α-tocopherol), differences were observed in the distribution of the active ingredient in the SC with an advantage for the Reference emulsion, probably due to the impact of surfactants on the SC lipids. The ES-free emulsion studied in this article, however, is a good compromise in relation to the Reference emulsion, since the HFUT technology allows the elimination of surfactants from the formulation, which have long been controversial and poorly evaluated ecologically. In addition, it is expected that better permeation results will be obtained with other lipophilic molecules, which have more favourable physicochemical characteristics than α-tocopherol for skin permeation.

CONCLUSION

The big challenge today in the cosmetic industry is to move towards increasingly safe and environmentally friendly products. In this context, HFUT technology appears as an innovative solution to develop natural and minimalist cosmetic formulations, perfectly responding to the current market trend. Our study demonstrates that HFUT is able to prepare stable ES-free emulsions loaded

with hydrophilic (caffeine) or lipophilic (α-tocopherol) ACI. Also, the rheological measurements reveal a shear-thinning pseudoplastic behaviour on the formulations with a prevalence of the elastic component. These characteristics are often linked to an easier application of the cosmetic product and better stability.

Skin permeation studies confirm that the emulsions produced by the HFUT promote the delivery of the ACI to the human skin. In the case of caffeine, the HFUT treatment did not compromise the emulsion efficacy. However, for α-tocopherol, the skin delivery was higher for the Reference emulsion, especially in the SC layers. Due to its physicochemical characteristics, α-tocopherol has a limited capacity for skin permeation, and in this case, the surfactant present in the formulation can act as a permeation enhancer, increasing its skin retention. However, taking into consideration the potential damage caused by the surfactants on the skin, the ES-free emulsion represents a good compromise between efficacy and the preservation of the integrity of the skin barrier. Finally, this study highlights the versatility of HFUT technology in producing emulsions for the cosmetic and dermatologic fields.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the Conseil Régional Centre Val de Loire for funding (APR-IR – project UFO 2020-00138875 and ARD CVL – Project MINIONs 2020-00141275).

CONFLICT OF INTEREST

Laurianne Gressin and Guillaume Gillet are employees from GENIALIS (route d'Achères 18 250 Henrichemont, France). The other authors have declared no conflict of interest.

ORCID

Hichem Kichou https://orcid.org/0000-0003-1050-2998
Emilie Munnier https://orcid.org/0000-0002-6691-4484

REFERENCES

1. Otto A, du Plessis J, Wiechers JW. Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. Int J Cosmet Sci. 2009;31:1–19.
2. Marto J, Nunes A, Martins AM, Carvalheira J, Prazeres P, Gonçalves L, et al. Pickering emulsions stabilized by calcium carbonate particles: a new topical formulation. Cosmetics. 2020;7:62.
3. Kulkarni C. Lipid self-assemblies and nanostructured emulsions for cosmetic formulations. Cosmetics. 2016;3:37.
4. Venkataramani D, Tsulaia A, Amin S. Fundamentals and applications of particle stabilized emulsions in cosmetic formulations. Adv Colloid Interf Sci. 2020;283:102234.
5. Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. Expert Opin Drug Deliv. 2020;17:145–55.
6. Lémery E, Briançon S, Chevalier Y, Bordes C, Oddos T, Gohier A, et al. Skin toxicity of surfactants: structure/toxicity relationships. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2015;469:166–79.
7. Lemery E, Briançon S, Chevalier Y, Oddos T, Gohier A, Boyron O, et al. Surfactants have multi-fold effects on skin barrier function. Eur J Dermatol. 2015;25:424–35.
8. Dini I, Laneri S. The new challenge of green cosmetics: natural food ingredients for cosmetic formulations. Molecules. 2021;26:3921.
9. Varvaresou A, Iakovou K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. Lett Appl Microbiol. 2015;61:214–23.
10. Geetha D, Tyagi R. Alkyl poly glucosides (APGs) surfactants and their properties: a review. Tenside Surfactant Deterg. 2012;49:417–27.
11. Yang Y, Fang Z, Chen X, Zhang W, Xie Y, Chen Y, et al. An overview of Pickering emulsions: solid-particle materials, classification, morphology, and applications. Front Pharmacol. 2017;8:287.
12. Bouyer E, Mekhloufi G, Rosilio V, Grossiord J-L, Agnely F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? Int J Pharm. 2012;436:359–78.
13. Meftahi A, Samyn P, Geravand SA, Khajavi R, Alibkhshi S, Bechelany M, et al. Nanocelluloses as skin biocompatible materials for skincare, cosmetics, and healthcare: formulations, regulations, and emerging applications. Carbohydr Polym. 2022;278:118956.
14. Darrigade A, Dendooven E, Mangodt E, Vermander E, Hagendorens M, Aerts O. A peculiar case of sensitization to *Candelilla* Cera and sucrose (di)stearate in a toddler. Contact Dermatitis. 2020;82:54–5.
15. Raison-Peyron N, Aerts O, Dereure O. Allergic contact dermatitis to sucrose stearate in a facial moisturizing cream. Contact Dermatitis. 2020;82:245–6.
16. Kichou H, Dancik Y, Eklouh-Molinier C, Huang N, Soucé M, Gressin L, et al. Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin. Int J Cosmet Sci. 2022;44:262–70.
17. Chavan P, Sharma P, Sharma SR, Mittal TC, Jaiswal AK. Application of high-intensity ultrasound to improve food processing efficiency: a review. Foods. 2022;11:122.
18. Picó Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. TrAC Trends Anal Chem. 2013;43:84–99.
19. Natarajan S, Ponnusamy V. A review on the applications of ultrasound in food processing. Mater Today Proc. 2020;10:1–4.
20. Zhou L, Zhang J, Xing L, Zhang W. Applications and effects of ultrasound assisted emulsification in the production of food emulsions: a review. Trends Food Sci Technol. 2021;110:493–512.
21. Liu H, Bao J, Du Y, Zhou X, Kennedy JF. Effect of ultrasonic treatment on the biochemphysical properties of chitosan. Carbohydr Polym. 2006;64:553–9.
22. Kaci M. Emulsification by high frequency ultrasound using piezoelectric transducer: formation and stability of emulsifier free emulsion. Ultrason Sonochem. 2014;8:1010–7.
23. Kaci M, Arab-Tehrany E, Desjardins I, Banon-Desobry S, Desobry S. Emulsifier free emulsion: comparative study between a new high frequency ultrasound process and standard emulsification processes. J Food Eng. 2017;194:109–18.
24. Kaci M, Arab-Tehrany E, Dostert G, Desjardins I, Velot E, Desobry S. Efficiency of emulsifier-free emulsions and

emulsions containing rapeseed lecithin as delivery systems for vectorization and release of coenzyme Q10: physico-chemical properties and in vitro evaluation. Colloids Surf B Biointerfaces. 2016;147:142–50.
25. Herman A, Herman AP, Domagalska BW, Młynarczyk A. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. Indian J Microbiol. 2013;53:232–7.
26. Abd E, Namjoshi S, Mohammed YH, Roberts MS, Grice JE. Synergistic skin penetration enhancer and nanoemulsion formulations promote the human epidermal permeation of caffeine and naproxen. J Pharm Sci. 2016;105:212–20.
27. Yenilmez E, Başaran E, Yazan Y. Release characteristics of vitamin E incorporated chitosan microspheres and in vitro–in vivo evaluation for topical application. Carbohydr Polym. 2011;84:807–11.
28. Dancik Y, Jepps OG, Roberts MS. Beyond Stratum Corneum. 2008:42.
29. Boonen J, Malysheva SV, Taevernier L, Di Mavungu JD, De Saeger S, De Spiegeleer B. Human skin penetration of selected model mycotoxins. Toxicology. 2012;301:21–32.
30. Bouwstra JA, Helder RW, El Ghalbzouri A. Human skin equivalents: impaired barrier function in relation to the lipid and protein properties of the stratum corneum. Adv Drug Deliv Rev. 2021;175:113802.
31. Lukic M, Jaksic I, Krstonosic V, Dokic L, Savic S. Effect of small change in oil phase composition on rheological and textural properties of w/o emulsion. J Texture Stud. 2013;44:34–44.
32. Atef B, Ishak RA, Badawy SS, Osman R. Exploring the potential of oleic acid in nanotechnology-mediated dermal drug delivery: an up-to-date review. J Drug Deliv Sci Technol. 2021;67:103032.
33. Liu Y, Lunter DJ. Profiling skin penetration using PEGylated emulsifiers as penetration enhancers via confocal Raman spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Eur J Pharm Biopharm. 2021;166:1–9.
34. Izquierdo P, Wiechers JW, Escribano E, García-Celma MJ, Tadros TF, Esquena J, et al. A study on the influence of emulsion droplet size on the skin penetration of tetracaine. Skin Pharmacol Physiol. 2007;20:263–70.
35. Sonneville-Aubrun O, Simonnet J-T, L'Alloret F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. Adv Colloid Interf Sci. 2004;108–109:145–9.
36. Ktistis G, Niopas I. A study on the In-vitro percutaneous absorption of propranolol from disperse systems. J Pharm Pharmacol. 2011;50:413–8.
37. Im J-E, Kim HY, Lee JD, Park J-J, Kang K-S, Kim K-B. Effect of application amounts on In vitro dermal absorption test using caffeine and testosterone. Pharmaceutics. 2021;13:641.
38. Yamaga H, Watanabe S, Fujita M, Yamamoto Y, Kasahara T, Kataoka S. Amino acid derivative reactivity assay–organic solvent reaction system: a novel alternative test for skin sensitization capable of assessing highly hydrophobic substances. J Appl Toxicol. 2021;41:1634–48.
39. O'Farrell C, Hall TJ, Grover LM, Cox SC. Formulation of an antibacterial topical cream containing bioengineered honey that generates reactive oxygen species. Mater Sci Eng C. 2022;133:112664.
40. Gilbert L, Picard C, Savary G, Grisel M. Rheological and textural characterization of cosmetic emulsions containing natural and synthetic polymers: relationships between both data. Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2013;421:150–63.
41. Dănilă E, Moldovan Z, Kaya MGA, Ghica MV. Formulation and characterization of some oil in water cosmetic emulsions based on collagen hydrolysate and vegetable oils mixtures. Pure Appl Chem. 2019;91:1493–507.
42. Furtado IF, Sydney EB, Rodrigues SA, Sydney AC. Xanthan gum: applications, challenges, and advantages of this asset of biotechnological origin. Biotechnol Res Innov J. 2022;6:e202204.
43. Terescenco D, Hadj Benali L, Canivet F, Benoit le Gelebart M, Hucher N, Gore E, et al. Bio-sourced polymers in cosmetic emulsions: a hidden potential of the alginates as thickeners and gelling agents. Int J Cosmet Sci. 2021;43:573–87.
44. Barnes HA. A Handbook of Elementary Rheology. Vol. 1. Aberystwyth: University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics; 2000, p. 224.
45. Moravkova T, Filip P. The influence of emulsifier on rheological and sensory properties of cosmetic lotions. Adv Mater Sci Eng. 2013;2013:7.
46. Gore E, Picard C, Savary G. Spreading behavior of cosmetic emulsions: impact of the oil phase. Biotribology. 2018;16:17–24.
47. Huynh A, Garcia AG, Young LK, Szoboszlai M, Liberatore MW, Baki G. Measurements meet perceptions: rheology–texture–sensory relations when using green, bio-derived emollients in cosmetic emulsions. Int J Cosmet Sci. 2021;43:11–9.
48. Isaac VLB, Cefali LC, Chiari BG, Almeida MGJ, Ribeiro HM, Correa MA. Effect of various thickening agents on the rheological properties of oil-in-water emulsions containing nonionic emulsifier. J Dispers Sci Technol. 2013;34:880–5.
49. Aben S, Holtze C, Tadros T, Schurtenberger P. Rheological investigations on the creaming of depletion-flocculated emulsions. Langmuir. 2012;28:7967–75.
50. Proksch E. pH in nature, humans and skin. J Dermatol. 2018;45:1044–52.
51. Kirkbride L, Humphries L, Kozielska P, Curtis H. Designing a suitable stability protocol in the face of a changing retail landscape. Cosmetics. 2021;8:64.
52. Rodrigues F, Alves AC, Nunes C, Sarmento B, Amaral MH, Reis S, et al. Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: is nanoscale in vitro approach an option? Int J Pharm. 2016;513:496–503.
53. Küchler S, Strüver K, Friess W. Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2013;9:1255–63.
54. Schreiber S, Mahmoud A, Vuia A, Rübbelke MK, Schmidt E, Schaller M, et al. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. Toxicol In Vitro. 2005;19:813–22.
55. Herman A, Herman AP. Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review: essential oils for transdermal drug delivery. J Pharm Pharmacol. 2015;67:473–85.
56. Rosado C, Tokunaga VK, Sauce R, De Oliveira CA, Sarruf FD, Parise-Filho R, et al. Another reason for using caffeine in dermocosmetics: sunscreen adjuvant. Front Physiol. 2019;10:519.
57. OECD. Guidance notes on dermal absorption, series on testing and assessment No. 156. OECD. 2011;36:1–72.
58. Pulsoni I, Lubda M, Aiello M, Fedi A, Marzagalli M, von Hagen J, et al. Comparison between Franz diffusion cell and a novel

micro-physiological system for In vitro penetration assay using different skin models. SLAS Technology; 2022, in press.
59. USEPA. In vitro dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to the occupational safety and health administration; final rule. Fed Regist. 2004;69:22402–41.
60. Park S. Biochemical, structural and physical changes in aging human skin, and their relationship. Biogerontology. 2022;23:275–88.
61. Todo H. Transdermal permeation of drugs in various animal species. Pharmaceutics. 2017;9:33.
62. Musazzi UM, Franzè S, Minghetti P, Casiraghi A. Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product? Drug Deliv Transl Res. 2018;8:414–21.
63. Mustapha RB, Lafforgue C, Fenina N, Marty JP. Influence of drug concentration on the diffusion parameters of caffeine. Indian J Pharm. 2011;43:157–62.
64. Rozman B, Gasperlin M, Tinois-Tessoneaud E, Pirot F, Falson F. Simultaneous absorption of vitamins C and E from topical microemulsions using reconstructed human epidermis as a skin model. Eur J Pharm Biopharm. 2009;72:69–75.
65. Lupo MP. Antioxidants and vitamins in cosmetics. Clin Dermatol. 2001;19:467–73.
66. Ribeiro AM, Estevinho BN, Rocha F. The progress and application of vitamin E encapsulation–a review. Food Hydrocoll. 2021;121:106998.
67. Supe S, Takudage P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: a review. Skin Res Technol. 2021;27:299–308.
68. Hughes AJ, Tawfik SS, Baruah KP, O'Toole EA, O'Shaughnessy RFL. Tape strips in dermatology research*. Br J Dermatol. 2021;185:26–35.
69. Escobar-Chavez JJ, Merino-Sanjuán V, López-Cervantes M, Urban-Morlan Z, Piñón-Segundo E, Quintanar-Guerrero D, et al. The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. J Pharm Pharm Sci. 2008;11:104–30.
70. Thomas S, Vieira CS, Hass MA, Lopes LB. Stability, cutaneous delivery, and antioxidant potential of a lipoic acid and α-tocopherol codrug incorporated in microemulsions. J Pharm Sci. 2014;103:2530–8.
71. Ekanayake-Mudiyanselage S, Tavakkol A, Polefka TG, Nabi Z, Elsner P, Thiele JJ. Vitamin E delivery to human skin by a rinse-off product: penetration of α-tocopherol versus wash-out effects of skin surface lipids. Skin Pharmacol Physiol. 2005;18:20–6.
72. Bielfeldt S, Bonnier F, Byrne HJ, Chourpa I, Dancik Y, Lane ME, et al. Monitoring dermal penetration and permeation kinetics of topical products; the role of Raman microspectroscopy. SSRN Electron J. 2022;156:116709. https://doi.org/10.2139/ssrn.4030268
73. Dreher F, Fouchard F, Patouillet C, Andrian M, Simonnet J-T, Benech-Kieffer F. Comparison of cutaneous bioavailability of cosmetic preparations containing caffeine or α-tocopherol applied on human skin models or human skin ex vivo at finite doses. Skin Pharmacol Physiol. 2002;15:40–58.
74. Alencastre JB, Bentley MVLB, Garcia FS, Moragas MD, Viladot JL, Marchetti JM. A study of the characteristics and in vitro permeation properties of CMC/ chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. Rev Bras Ciênc Farm. 2006;42:69–76.
75. Rhein L. In vitro interactions: biochemical and biophysical effects of surfactantson skin. In Rieger M, Rhein L, editors. Surfactants in cosmetics. Surfactant Science Series. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 320–97.
76. Leyden JJ, Rawlings Anthony V, editors. Skin moisturization. London: CRC Press; 2002.
77. Lips A, Ananthapadmanabhan KP, Vethamuthu M, Hua XY, Yang L, Vincent C, et al. Role of surfactant micelle charge in protein denaturation and surfactant-induced skin irritation. Surfactant Sci Ser. 2006;135:177–87.
78. Goffin V, Paye M, Piérard GE. Comparison of in vitro predictive tests for irritation induced by anionic surfactants. Contact Dermatitis. 1995;33:38–41.
79. Morrison BM Jr, Paye M. A comparison of three in vitro screening tests with an in vivo clinical test to evaluate the irritation potential of. J Soc Cosmet Chem. 1995;46:291–9.
80. Imokawa G, Hattori M. A possible function of structural lipids in the water-holding properties of the stratum corneum. J Invest Dermatol. 1985;84:282–4.

How to cite this article: Kichou H, Caritá AC, Gillet G, Bougassaa L, Perse X, Soucé M, et al. Efficiency of emulsifier-free emulsions in delivering caffeine and α-tocopherol to human skin. Int J Cosmet Sci. 2023;00:1–16. https://doi.org/10.1111/ics.12837

III. Approche analytique multi-techniques sur modèles de peau : influence de la formule et du modèle utilisé sur la perméation cutanée

L'étude présentée dans ce chapitre a pour objectif d'utiliser l'approche bio-analytique développée précédemment pour évaluer différents modèles utilisés dans les tests d'efficacité des ingrédients actifs à travers des études de perméation. Elle fait l'objet d'un article (#Article3) soumis à l'International Journal of Pharmaceutics.

Dans un premier temps, nous évaluons l'utilisation d'un modèle de peau synthétique appelé "Strat-M®", développé par Merck dans le but d'effectuer des études de perméation. Ensuite, nous examinons l'impact de différentes formulations (solution aqueuse (PBS), hydrogel et émulsion) sur la perméation de la molécule d'intérêt en fonction du modèle de peau utilisé. Enfin, cette étude utilise diverses techniques analytiques pour caractériser et quantifier la composition moléculaire des différents modèles de peau, en mettant particulièrement l'accent sur la membrane Strat-M®, qui est peu documentée dans la littérature.

L'approche proposée ici combine plusieurs techniques analytiques, notamment :

(i) L'HPLC couplée à un détecteur UV-visible pour quantifier les ingrédients actifs à travers les modèles de peau.

(ii) La Micro-spectroscopie Confocale Raman (CRM) utilisée dans cette étude pour caractériser les modèles de peau à une échelle moléculaire.

(iii) L'HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/corona et HPLC/HR-MS) pour l'analyse qualitative et quantitative des lipides dans les modèles de peau utilisés.

III.1 Contexte :

Lors de la réalisation des travaux expérimentaux dans le cadre du chapitre II (Étude 1 et 2), différentes difficultés ont été rencontrées lors de l'utilisation des modèles biologiques, à savoir le modèle de peau reconstruite (EpiSkin®) et les biopsies de peau humaine. Ces difficultés ont incité à utiliser un modèle de peau synthétique dans cette étude. Comparé aux modèles biologiques, le modèle de peau synthétique présente plusieurs avantages, tels que son caractère économique, sa praticité (absence de nécessité de décongélation ou d'incubation avant les tests de perméation) et sa reproductibilité (moindre variabilité que les modèles biologiques). Cependant, étant d'origine synthétique (polymérique), ce modèle soulève des interrogations quant à sa capacité à reproduire les dynamiques moléculaires complexes observées dans les modèles biologiques.

III.2 Introduction

Les essais de perméation cutanée jouent un rôle essentiel dans l'obtention d'informations précieuses sur l'efficacité et la toxicité potentielles des médicaments dermatologiques et des produits de soin cosmétiques. Ils permettent de déterminer les concentrations appropriées à utiliser dans les produits et contribuent également à l'optimisation de la formulation.

Généralement, ces tests sont réalisés sur des cellules de diffusion de Franz, qui constituent la méthode la plus couramment utilisée pour évaluer la pénétration transcutanée des ingrédients actifs au fil du temps (voir Chapitre I, section I.2.3.2). La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est la méthode la plus fréquemment utilisée pour quantifier la molécule active qui s'accumule dans la peau ou qui la traverse.

En général, ces tests sont réalisés avec la participation de volontaires humains dans le cadre d'études cliniques. Cependant, en raison du fardeau éthique et des coûts associés, il n'est pas possible de réaliser systématiquement des études in vivo. Par conséquent, les tests de perméation in vitro sont plus fréquemment utilisés pour évaluer l'efficacité des produits. De plus, la directive 2010/63/UE sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques encourage fortement l'adoption des principes des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement), conformément au 7e amendement européen à la directive sur les produits cosmétiques 76/768/CEE, qui interdit les tests sur les animaux depuis mars 2013. Par conséquent, il est fortement recommandé d'utiliser des modèles de peau humaine pour les études de perméation in vitro.

En règle générale, les prélèvements cutanés obtenus lors de chirurgies peuvent être utilisés soit immédiatement après l'opération en tant que "peau fraîche", soit être congelés et conservés pendant un an entre -20 °C et -80 °C, conformément aux recommandations des organismes de réglementation.

En raison de considérations éthiques, de disponibilité limitée et de raisons économiques, les Substituts Cutanés Humains (SCH) sont de plus en plus utilisés comme alternative aux biopsies in vitro, notamment pour les tests de pénétration et de perméation des principes actifs cosmétiques. Le modèle d'épiderme humain reconstruit (RHE) d'EpiSkin® est un modèle in vitro qui imite spécifiquement l'épiderme humain et qui est validé par l'OCDE. Cependant, la fonction barrière des modèles reconstruits n'est pas aussi développée que celle de la peau humaine, en particulier en ce qui concerne la composition en lipides du SC. De plus, les RHE doivent être utilisés dès leur réception et ont une durée de stockage très limitée, soit 48 heures après la livraison.

Pour remplacer les modèles de peau biologiques, des membranes synthétiques ont été développées pour les études de perméation, notamment dans le criblage de nouvelles molécules d'intérêt pharmaceutique ou cosmétique. On retrouve des membranes synthétiques poreuses telles que le silicone, la cellulose et les membranes de polysulfone. Récemment, les membranes Strat-M® de chez Merck Millipore ont été introduites pour étudier la perméation d'ingrédients actifs. Le Strat-M® est une membrane polymérique synthétique qui présente peu de variabilité d'un lot à l'autre, ainsi que des problèmes de sécurité ou de stockage limités.

Les études de perméation impliquant les membranes Strat-M® comparent la pénétration/perméation des produits cosmétiques contenant des promoteurs de pénétration qui peuvent altérer la membrane. Les membranes Strat-M® restent donc relativement peu étudiées pour tester la perméation des molécules actives cosmétiques/pharmaceutiques sans la présence de promoteurs de pénétration. De plus, la plupart des études comparatives entre modèles utilisent des solutions. Il convient de souligner que les produits commercialisés dans le domaine pharmaceutique et cosmétique, visant à agir au niveau des couches viables de la peau telles que l'épiderme viable et/ou le derme, adoptent généralement une forme semi-solide. Cette forme présente des avantages notables en termes de praticité d'utilisation et de viscosité, permettant une rémanence prolongée sur le site d'action, favorisant ainsi une diffusion efficace et une libération optimale des molécules actives. Ainsi, l'originalité de notre travail réside également dans l'étude de l'impact de la formulation semi-solide (émulsion) sur l'efficacité et la performance des produits étudiés en fonction du modèle de peau utilisé.

III.3 Objectifs :

Les objectifs de cette étude sont les suivants :

(i) Évaluer la perméation de la résorcine (un composé hydrophile avec un log Kow de 0,78) à travers les membranes Strat-M® et comparer les quantités de résorcine déterminées par HPLC avec celles des modèles établis d'EpiSkin® et des biopsies de peau humaine.

(ii) Étudier l'impact des formulations testées (solution aqueuse (PBS), hydrogel et émulsion) sur la perméation de la résorcine, en fonction de la composition lipidique du modèle utilisé.

(iii) Caractériser la composition moléculaire des membranes Strat-M®, d'EpiSkin® RHE et des biopsies de peau humaine par micro-spectroscopie confocale Raman (CRM), ainsi que réaliser une analyse qualitative et quantitative des lipides dans les

différents modèles en utilisant la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/corona et HPLC/HR-MS^n).

III.4 Développements méthodologiques :

III.4.1 Développements liés à la quantification de la résorcine par HPLC/DAD

Dans le cadre du développement de notre méthode par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour la quantification de la résorcine dans les liquides récepteurs lors des tests de perméation, plusieurs considérations expérimentales ont été prises en compte. La méthode d'HPLC en phase inverse, utilisant une colonne greffée de chaînes alkyles C18, était basée sur les méthodes proposées et validées par la Pharmacopée Européenne, ainsi que sur les méthodes présentées dans la littérature. Cependant, nous avons apporté des améliorations afin d'optimiser les performances de la méthode. Notamment, nous avons modifié le pourcentage de solvant dans la phase mobile pour réduire le temps d'analyse, tout en respectant le principe selon lequel le temps de rétention minimal devait être au moins deux fois le temps mort. Cette pratique permet de garantir une séparation adéquate entre le pic de la résorcine, le bruit de fond et les pics adjacents, tout en assurant une identification claire et une mesure précise du pic (dans notre cas, 2 x 1,5 minutes pour une colonne de 15 cm de longueur avec un débit de 1 ml/min). Pour l'analyse de la résorcine, nous avons utilisé un mélange de 75% de méthanol et de 25% d'eau tamponné avec 10 mM d'acide phosphorique, au lieu d'un mélange de 15% d'acétonitrile et de 85% d'eau. Cela nous a permis d'obtenir un temps de rétention de 3,2 minutes et un temps total d'analyse de 6 minutes. Cette optimisation a permis de réduire le temps d'analyse en raison du grand nombre d'échantillons à traiter, comprenant plusieurs modèles de peau, 3 formulations et plusieurs points de prélèvement. Ainsi, nous avons pu surmonter les limitations liées à la stabilité de l'ingrédient actif, évitant ainsi toute dégradation potentielle.

Après avoir effectué plusieurs recherches bibliographiques, nous avons déterminé que la longueur d'onde maximale d'absorption pour la résorcine était de 275 nm, ce qui était idéal pour la détection de ce composé aromatique. La détection a été réalisée à l'aide d'un détecteur à barrette de diodes (DAD), un spectrophotomètre UV-visible idéal pour détecter de petites molécules composées de cycles aromatiques comme la résorcine.

Une fois la méthode mise au point, nous avons construit une courbe d'étalonnage en utilisant différentes concentrations de résorcine afin d'évaluer les performances de la technique. Plusieurs paramètres ont été calculés, tels que la linéarité, la limite de détection et la limite de quantification. Les résultats ont démontré que la méthode était parfaitement adaptée à la quantification de petites quantités de résorcine, avec un coefficient de régression égal à 1 et une

limite de quantification de l'ordre de $1{,}8 \cdot 10^{-3}$ mg/ml. Toute valeur de concentration inférieure à cette limite a été rapportée comme zéro dans cette étude.

III.4.2 Développements liés à l'analyse des lipides par HPLC/MS^n

Les expérimentations liées à l'analyse des lipides des modèles de peau ont été menées en collaboration avec l'équipe "Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques" (Lip(SyS)^2) de l'Université de Paris-Saclay, spécialisée dans le développement de méthodes analytiques, notamment chromatographiques, pour l'étude des lipides cutanés. Cette équipe a déjà publié plusieurs études portant sur l'analyse des lipides de la peau humaine et des modèles reconstruits tels que les EpiSkin®. Dans le cadre de notre étude, les trois modèles de peau ont été envoyés à l'équipe Lip(SyS)^2 pour analyse. Les lipides totaux de chaque modèle ont été extraits selon la méthode modifiée de Folch, puis soumis à une analyse par HPLC/corona et HPLC/HR-MS afin de déterminer leur composition lipidique respective.

III.4.3 Développements liés à l'analyse par CRM

La Microscopie Confocale Raman (CRM) est fréquemment utilisée pour examiner des coupes de peau in vitro, des biopsies de peau et des volontaires humains in vivo. Grâce à la CRM, il est possible de réaliser des mesures non invasives depuis la surface de la peau jusqu'à ses couches les plus profondes. Ces mesures fournissent des informations précieuses à l'échelle moléculaire sur divers aspects de la peau, tels que la quantité d'eau, la teneur en lipides et en protéines (méthodes semi-quantitatives), l'épaisseur des différentes couches cutanées, l'interaction des formulations avec les lipides intercellulaires du stratum corneum, ainsi que la diffusion des principes actifs dans la peau et la peau reconstruite. De plus, la CRM est largement utilisée pour caractériser et suivre les molécules actives au sein de la peau reconstruite.

Afin de mettre en place l'étude, nous avons pris en considération les aspects liés à la préparation des échantillons de peau. Nous avions deux options : effectuer des profilages en Z ou préparer des coupes transversales soit en bloc de paraffine soit au cryomicrotome avec une épaisseur de 20 µm.

Après plusieurs expérimentations, nous avons opté pour la méthode des coupes transversales de 20 µm au cryomicrotome, en raison de sa haute résolution spatiale, de sa préservation de la structure tissulaire et de sa capacité à permettre une analyse non destructive. Toutefois, il convient de noter que la préparation des coupes de peau nécessite du temps et de l'expertise avant d'obtenir des coupes de qualité préservant les différentes couches. Ce choix a été motivé d'abord par le fait que le profilage en Z présentait certaines limites en termes de profondeur de pénétration, de faible signal et d'interférences spectrales. De plus, les coupes préparées par

inclusion engendraient des artefacts de la paraffine dans les tissus, lesquels perturbent les bandes Raman des constituants biochimiques de l'échantillon. Aussi, le processus de déparaffinage est connu pour altérer la composition lipidique et l'extraction de ces lipides des échantillons, notamment en raison de l'utilisation de solvants tels que le xylène ou l'hexane, étape incontournable du processus de déparaffinage. Ainsi, les coupes réalisées avec un cryomicrotome sont les plus appropriées pour notre étude de caractérisation des modèles de peau.

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé un micro-spectromètre Raman confocal "WITec Alpha 300R" de chez WITec (Ulm, Allemagne), équipé de trois lasers fonctionnant à différentes longueurs d'onde, ainsi qu'un microscope comprenant plusieurs objectifs. Nous avons pris en compte la sélection des longueurs d'onde des lasers et des objectifs utilisés. À cet effet, nous avons testé trois longueurs d'onde différentes : 532 nm, 633 nm et 785 nm, en combinaison avec des objectifs ayant différentes ouvertures numériques et grossissements, à savoir, un objectif 20x/0.5, un objectif 50x/0.8 et un objectif 100x/0.9.

Les trois lasers en combinaison avec les différents objectifs offraient différentes résolutions axiales et latérales (voir Chapitre I, section I.3.3). Après avoir effectué plusieurs tests sur les différents lasers et objectifs, l'analyse graphique a montré que le laser à 532 nm combiné avec l'objectif 100x/0.9 offrait une intensité de signal plus élevée avec moins de distorsions de la ligne de base, ainsi qu'une meilleure résolution axiale et latérale.

De plus, grâce au choix de la capacité du réseau dispersif du détecteur CCD de 600 lignes/mm, nous obtenons une information complète avec une haute résolution sur une plage spectrale allant de 0 à 3600 cm^{-1} (voir Chapitre I, section I.3.2.2.2).

Nous avons effectué des expérimentations pour déterminer les paramètres d'acquisition optimaux. Cela comprenait des essais avec différents temps d'acquisition et différentes puissances laser afin de trouver le bon équilibre entre la qualité des spectres et la préservation de l'intégrité de l'échantillon. Finalement, nous avons opté pour un temps d'acquisition de 60 secondes avec une puissance laser de 10 mW, en réalisant 2 accumulations consécutives pour améliorer le rapport signal/bruit. Cette configuration nous permettait d'obtenir des spectres de haute qualité sans compromettre l'intégrité des échantillons analysés.

III.5 Matériels et méthodes :

Au cours de cette étude, les cinétiques de perméation de la résorcine à 5% (m/m) ou 50 mg/mL, formulée en solution aqueuse (PBS), hydrogel et émulsion, ont été évaluées sur des cellules de Franz pour les modèles Strat-M® et la peau humaine sur une durée de 12 heures.

Pour les EpiSkin®, les essais ont été directement réalisés dans des plaques à 12 puits afin de minimiser la manipulation des inserts contenant les EpiSkin® et de réduire ainsi le risque de lésion tissulaire. Les quantités de résorcine traversant les trois modèles de peau ont été quantifiées par HPLC-DAD.

Les membranes Strat-M®, les échantillons d'EpiSkin® RHE et des biopsies de peau humaine, non exposés à la résorcine pour l'analyse de caractérisation moléculaire, ont été coupés à l'aide d'un cryomicrotome pour obtenir des coupes d'une épaisseur de 20 µm. Ensuite, ces coupes ont été placées sur des substrats en CaF_2 pour l'analyse par spectroscopie Raman.

Les lipides totaux de chaque modèle de peau ont été extraits selon la méthode modifiée de Folch afin de réaliser l'analyse des lipides dans les trois modèles de peau. Ensuite, les lipides extraits ont été analysés par HPLC/corona et HPLC/HR-MS^n afin de déterminer la composition lipidique de chaque modèle.

III.6 Résultats :

Les résultats de l'HPLC révèlent que la résorcine présente une perméabilité intermédiaire dans le Strat-M®, se situant entre celle de l'EpiSkin® RHE et celle des biopsies de peau humaine. Les flux de diffusion (Jss) sont plus faibles pour la solution, l'hydrogel et l'émulsion du Strat-M® par rapport à l'EpiSkin® RHE, mais plus élevés que les biopsies de peau humaine. Les coefficients de perméabilité (Kp) des trois formulations testées montrent que, pour le Strat-M®, les valeurs de Kp ne sont pas significativement différentes entre la solution, l'hydrogel et l'émulsion, montrant ainsi que la formulation utilisée n'impacte pas la perméation de la résorcine. Contrairement à l'EpiSkin® qui montre des différences significatives entre la solution et l'émulsion, mais pas entre la solution et l'hydrogel. Concernant la peau humaine, des différences significatives de perméation sont observées, notamment entre l'émulsion et la solution. Les mêmes observations sont faites entre l'émulsion et l'hydrogel, sauf pour le donneur 1 qui ne montre pas de différences significatives.

Les résultats de la spectrométrie de masse (HPLC/corona et HPLC/HR-MS) révèlent qu'une quantité moindre de céramides est détectée dans l'EpiSkin® RHE par rapport à la peau humaine, bien que des quantités similaires de triglycérides et de cholestérol soient trouvées dans les deux. Cette différence de composition lipidique pourrait expliquer la variation de perméabilité observée entre les deux modèles. Quatre sous-classes de céramides sont identifiées, avec les sous-classes OH/NS/NdS/OS (OH: ω-hydroxy 6-hydroxy-sphingosine, NS: Non-hydroxy Sphingosine, NdS: Non-hydroxy Dihydro-Sphingosine, OS: ω-hydroxy Sphingosine) étant 1,8 fois plus abondantes dans l'EpiSkin® RHE que dans les biopsies de peau humaine. En revanche,

les sous-classes de céramides AP/NP/AS/AdS/OP (AP: α-Hydroxy phytosphingosine, NP: Non-hydroxy Phytosphingosine, AS: α-Hydroxy sphingosine, Ads: α-Hydroxy dihydrosphingosine, OP: ω-hydroxy Phytosphingosine) sont 9 fois plus élevées dans les biopsies de peau humaine, tandis que les sous-classes NH/EOH (NH: Non-hydroxy 6-hydroxy-sphingosine, EOH: ω-hydroxy 6-hydroxy-sphingosin) et AH/NT (AH: α-Hydroxy 6-hydroxysphingosine, NT: Non-hydroxy Dihydroxy-sphinganine) sont également plus élevées dans les biopsies de peau humaine que dans l'EpiSkin® RHE. Par ailleurs, aucun lipide n'est détecté dans le Strat-M®.

Les résultats de la CRM permettent d'observer la caractérisation chimique du stratum corneum (SC) dans les deux modèles biologiques. On observe les principales caractéristiques correspondant aux lipides, aux acides nucléiques et aux protéines, montrant des ratios et des caractéristiques différentes entre la peau humaine et les EpiSkin® RHE. L'ordre de conformation lipidique intercellulaire (ICL) est également calculé et exprimé par les valeurs de Sskelton et de Slat. Les résultats démontrent que les modèles d'EpiSkin® RHE présentent un empaquetage hexagonal moins dense de l'ICL, ce qui compromet la barrière cutanée et permet l'infiltration des composés dans les cornéocytes, influençant ainsi potentiellement la perméation des composés hydrophiles par rapport à la peau humaine.

De plus, les résultats de la CRM permettent, pour la première fois, de caractériser au niveau moléculaire les membranes Strat-M®, confirmant ainsi leur composition polymérique des deux premières couches (A et B) contenant du PolyEtherSulfone (PES), tandis que la troisième couche (C) est composée de polyoléfine. Les résultats de la CRM confirment également les résultats de la spectrométrie de masse, indiquant l'absence de lipides dans la membrane Strat-M®.

III.7 Conclusion

Ce travail présente les résultats de tests de perméation réalisés sur trois formulations différentes en utilisant trois modèles de peau distincts : Strat-M®, EpiSkin® RHE et les biopsies de peau humaine. Les résultats indiquent que les membranes Strat-M® ne reproduisent pas pleinement l'interaction entre les véhicules et la couche superficielle de la peau en raison de l'absence de lipides et d'autres composés biochimiques présents dans la peau. Il est important de noter que ce modèle ne convient pas à la comparaison de la perméation de plusieurs formulations. Cependant, la structure multicouche composée de polymères de différentes densités confère aux membranes Strat-M® des propriétés de barrière similaires à celles de la peau. Leur reproductibilité inter-échantillon et d'un lot à l'autre, ainsi que leur coût relativement

faible, en font un outil précieux pour le criblage de molécules actives potentielles avant d'entamer le processus de formulation. Toutefois, il ne parvient pas à reproduire quantitativement la fonction barrière observée dans les biopsies de peau humaine.

III.8 #Article 3: Strat-M® positioning for skin permeation studies: A Comparative Study including EpiSkin® RHE, and Human Skin

Article soumis à 'International Journal of Pharmaceutics' pour révision.

Hichem Kichou [1], Franck Bonnier [2], Yuri Dancik [3], Joudi Bakar [4], Rime Michael-Jubeli [4], Amanda C. Caritá [1], Xavier Perse [1], Martin Soucé [1], Ali Tfayli [4], Igor Chourpa [1] and Emilie Munnier[1,*]

[1] Université de Tours, EA 6295 NanoMédicaments et NanoSondes, Faculté de Pharmacie, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France.

[2] LVMH Recherche, 185 Av. de Verdun, 45800, Saint-Jean-de-Braye, France.

[3] Certara UK Ltd., Simcyp Division, Level 2-Acero, 1 Concourse Way, Sheffield S1 2B1, UK.

[4] Université Paris-Saclay, Faculté de Pharmacie, Lip(sys)² « Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques », 17 avenue des sciences, 91400, Orsay, France.

[*] Corresponding author e-mail: emilie.munnier@univ-tours.fr

Abstract

The Strat-M® synthetic skin model is polymeric membrane designed to mimic human skin that is proposed as an *in vitro* alternative to biological (i.e. human skin, reconstructed skin) for permeation assays. Nevertheless, its suitability for evaluating the permeation kinetics of active molecules in topical products remains not fully studied, especially using formulations without permeation enhancers that impair the skin barrier function, therefore the permeability of models. Therefore, in the present work, the permeation of resorcinol through Strat-M® membranes, EpiSkin® RHE (Reconstructed Human Epidermis) and excised human skin were compared for three types of formulations (aqueous solution, hydrogel, and an oil-in-water emulsion). The steady state flux (J_{SS}) and the permeability coefficient (Kp) calculated from the permeated accumulated of resorcinol overt time highlighted that Strat-M® membranes and excised human skin are more comparable than EpiSkin® RHE and excised human skin. The variations between the aqueous solutions compared to emulsions found for EpiSkin® RHE and excised human skin, were not observed with the Strat-M® model. The molecular characterisation of skin models studied using HPLC coupled with high-resolution mass spectrometry (HPLC/HR-MS^n), and confocal Raman microscopy (CRM) further supported that the differences in lipid composition and organisation impacted the formulas-skin interactions

while the polymeric nature of Strat-M® membranes failed to accurately mimic the behaviour of topical formulation applied onto biological systems. However, the results collected from the formulations free of penetration enhancer demonstrated that Strat-M®, despite not being quantitatively equals to excised human skin, remain a cost effective and rapid alternative to RHE models that can significantly reduce the use of biological models for the *in vitro* screening of potential penetrating active ingredient at the early stage of the formulation process.

Keywords: Permeation assays, Strat-M®, human skin models, Raman spectroscopy, High-Performance Liquid Chromatography, Lipid analysis, excised human skin, reconstructed human skin, Resorcinol.

1. Introduction

The quantification of skin uptake and permeation is a critical step for the evaluation of topical cosmetic and pharmaceutical products (Franzen et al., 2015). Data generated from skin permeation studies provide information on the efficacy, the potential toxicity of compounds and permits formulation optimization. Ideally, the skin penetration of active ingredients (AI) should be evaluated in clinical studies with human volunteers. However, the ethical burden, the cost of clinical studies and technical limitations to routinely perform protocols involving tape stripping (Escobar-Chavez et al., 2008; Hughes et al., 2021; Supe and Takudage, 2021), prevent from systematically performing studies *in vivo*. Therefore there has been a reliance on *in vitro / ex vivo* permeation assays, especially in the early stages of formulation development for topical products (Krombholz et al., n.d.). Franz diffusion cells are the most used method to determine actives cosmetic/pharmaceutical ingredients (ACI/API) transcutaneous diffusion over time (Franz, 1975). Coupled to analytical techniques such as High Performance Liquid Chromatography (HPLC), the permeation rate of the AI is determined by assessing its amount permeated through excised skin over time. (Supe and Takudage, 2021). The 2010/60/EU directive on the protection of animals used for scientific purposes, strongly advocates the use of the 3Rs principle (Replacement, Reduction, and Refinement) followed by the European 7th Amendment to the Cosmetic Directive 76/768/EEC that has banned animal testing from March 2013. Therefore, the choice for human skin models is strongly encouraged for *ex vivo* permeation studies.

Skin explants recovered from plastic surgery can be used either directly after the procedure as "fresh skin" or can be frozen and stored for up to 1 year between -20 °C and -80 °C, depending on the recommendations of regulatory agencies (European Commission. Directorate-General for Health and Consumers, 2010; USEPA, 2004; World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2008). However, due to ethical, limited availability and economic reasons, Human Skin Equivalents (HSE) are increasingly used for testing the permeation of ACI/API (Agonia et al., 2022; Dancik et al., 2020; Planz et al., 2016). Reconstructed Human Epidermis (RHE) models mimic the human epidermis specifically, that is, the SC and the viable epidermis. Several HSE are commercially available for routine permeation assays (Sabo, 2021). EpiSkin® RHE is a validated *in vitro* model in the OECD guidelines (OECD, 2013; “Test No. 431,” n.d.) that is widely used in pharmaceutic and cosmetic research and development for toxicological (Netzlaff et al., 2005), skin corrosion (Alépée et al., 2014), and irritation assays (Spielmann et al., 2007). EpiSkin® RHE consists of a stratified and fully differentiated epidermis derived from human keratinocytes (Dancik et al.,

2020) that are histologically comparable to human skin. However the barrier function of RHE is not as developed as that of human skin. Schäfer-Korting et al. conducted penetration tests in ten laboratories for 9 active ingredients (Mannitol, Benzoic acid, Caffeine, Nicotine, Digoxin Flufenamic acid Clotrimazole, Ivermectin and testosterone) that systematically showed permeation in RHE models surpassing that of human skin (Schäfer-Korting et al., 2008). Similarly, Marks *et al.* and Netzlaff *et al.* reported 2.5 to 4 times higher caffeine penetration and a permeability coefficient 80 times greater for caffeine in EpiSkin® RHE models compared to excised human skin (Marks et al., 2002; Netzlaff et al., 2005).

Synthetic membranes are also investigated as a substitute for biological skin models. In the past decades, permeation studies were carried out using porous synthetic membranes such as silicone (Uchida et al., 2016), cellulose (Silva et al., 2014), and polysulfone membranes (Jung et al., 2012). Recently, Strat-M® (*Merck Millipore)* membranes were introduced to study drug permeation (Haq et al., 2018; Uchida et al., 2015). Strat-M® is a synthetic polymeric membrane without batch-to-batch variability, safety issues or storage limitations. Permeation studies involving Strat-M® membranes mainly compare the penetration/permeation of chemicals in formulations containing penetration enhancers (Haq et al., 2018; Kaur et al., 2018; Klebeko et al., 2021). Strat-M® membranes remain relatively little studied to test the permeation of ACI/API without the presence of permeation enhancers.

The objective of the present work was to compare the permeation of resorcinol through Strat-M® to its permeation through the established EpiSkin® RHE and through excised human skin. Resorcinol is a small hydrophilic compound (log Kow = 0.78, (Lin et al., 2003)), used for treatment of acne and seborrheic skin (Romagnoli et al., 2016). It has been used as a model molecule for permeation experiments (Dancik et al., 2020; Kichou et al., 2022b; Zhang et al., 2019). We further investigate whether there is an impact of the formulation on relative permeation of resorcinol through the skin models. To this end, three types of formulation (aqueous solution (PBS), hydrogel and [Oil / Water] emulsion) were studied.

Confocal Raman Microscopy (CRM) is a flexible method that can be used routinely to examine skin cross sections *in vitro,* as well as *ex vivo* on biopsies and *in vivo*. The technique operates under confocal conditions, allowing for measurements to be taken non-invasively from the surface of the skin down to its deeper layers. These measurements can provide valuable information regarding various aspects of the skin, such as the amount of water present (Boncheva et al., 2009; Caspers et al., n.d.), the thickness of different skin layers (Dancik et al., 2018; Mateus et al., 2013), the effects of emulsifiers and formulations on intercellular lipids of the stratum corneum (Zhang, 2018), and the diffusion of active ingredients in the skin and

reconstructed skin (Pudney et al., 2007). Furthermore, CRS has been widely used for the characterization as well as the monitoring of active ingredient of the reconstructed skin (Miloudi et al., 2018; Tfayli et al., 2007a). To gain a deeper understanding of the permeation results, the molecular compositions of Strat-M®, EpiSkin® RHE and excised human skin were investigated using High-performance liquid chromatography coupled with universal detector (HPLC/corona) and with High resolution Mass Spectrometry (HPLC/HR-MS^n) and Confocal Raman Microscopy (CRM).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Resorcinol, chloroform, Heptane, ethyl acetate, acetone, acetic acid, 2-propanol, ethanolamine and 1-Eicosanol (internal standard used for MS) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS), methanol, ethanol, phosphoric acid and Sodium carboxymethyl-cellulose were provided by Thermo Fisher Scientific (Illkrich-Graffenstaden, France). Montanov™ 68 and Sepigel™ 305 were purchased from Seppic (La Garenne Colombes, France). Refined sweet almond oil was purchased from Cooper (Melun, France). Ultra-pure water was prepared using a Millipore MilliQ system (Merck Millipore, Molsheim, France).

2.2. Skin models

Strat-M® membranes (25 mm in diameter) were purchased from Merck Millipore (Molsheim, France). The membranes were shipped and stored at room temperature until the day of the experiments. No specific treatment is required.

EpiSkin® RHE (Lyon, France) were shipped in 12-well plates at maturation day 13. At reception each tissue was immediately removed from the nutrient agarose used for transportation and placed in 2 mL maintenance medium (EpiSkin®) followed by an incubation period of 18 hours (overnight) at 37°C, 5% CO_2 and saturated humidity (95%), as recommended by the supplier. All permeation experiments were conducted on the day following reception for better reproducibility in the results, as specified by the supplier.

Dermatomed excised human skin explants, 20 mm in diameter, were purchased from Alphenyx (Marseille, France). The human skin was excised during breast plastic surgery from three Caucasian females, following article L.1245 CSP "Product and element of human body taken during surgical procedure and used for scientific research" of the French public health

code (www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000034079655). All donors signed an informed consent form. Thereafter, skin samples are identified as Donor 1 (57 years old, phototype 2, thickness 511.3 ± 25.5 µm), Donor 2 (17 years old, phototype 2, thickness 496 ± 19.7 µm) and Donor 3 (49 years old, phototype 3, thickness 514.1 ± 18.8 µm). Skin samples were shipped frozen and were kept at -20°C until the day before the experiment. The experiments were performed in triplicate for each donor.

2.3.Formulations

Aqueous solution: a 5% (w/w) resorcinol solution was prepared by dissolving 5g of resorcinol powder in 95 g of PBS.

Hydrogel: a 5% (w/w) resorcinol hydrogel was prepared by dissolving 10g of resorcinol in 186g of ultra-pure water through high-speed homogenization using a Turbotest® disperser (VMI, France) for 2 min (1500 rpm, 20°C). 4g of Sodium carboxymethyl-cellulose was then added to the mixture under stirring for 30 minutes (2500 rpm).

Emulsion: a 5% (w/w) resorcinol emulsion was prepared by dissolving 10g of resorcinol in 159.4g of ultra-pure water to constitute the aqueous phase. 10g of Montanov™ 68 was dissolved in 20g of sweet almond oil to constitute the oil phase. Both phases were heated to 70°C in a water bath. The oil phase was mixed into the aqueous phase by high-speed homogenization with a Turbotest® disperser (VMI, France) for 10 min (1500 rpm, 20°C). 0.6g of Sepigel™ 305 was then added to the mixture under continuous stirring for 5 minutes (3000 rpm). The wt% composition of the resorcinol emulsion is summarised in Table 1.

Table 1: Composition (wt %) of resorcinol emulsion

Emulsion	Wt %
Resorcinol	5
Ultra-pure water	79.7
Sweet almond oil	10
Montanov™ 68	5
Sepigel™ 305	0.3

2.4.Permeation assays

2.4.1. Experimental set up for Strat-M® and excised human skin

The permeation test was conducted using static vertical glass Franz cells (9-cell setup) with a diffusion area of 0.64 cm^2 and a receptor volume of 5.0 mL (Permegear Inc, PA, USA). The receptor compartment of each cell was filled with degassed PBS (pH 7.4) maintained at 37°C. The receptor medium was kept under synchronous continuous stirring (500 rpm) using a magnetic stirrer.

The skin samples were thawed overnight at 4 °C prior to experiments day. They were then mounted in Franz diffusion cells with the dermis facing the receptor chamber, in contact with the receptor medium. Prior to applying the formulations, the skin was equilibrated with the receptor medium for 30 minutes. The integrity of the skin explants was confirmed through measurements of the Trans Epidermal Water Loss (TEWL) using a VapoMeter (Delfin Technologies, Kuopio, Finland). Skin from each of the 3 donors displayed normal values for healthy skin, .i.e., TEWL < 25 $g/m^2 \cdot h$ (Algiert-Zielińska et al., 2017).

Strat-M® membranes were used immediately, without any pre-treatment. The membranes were mounted in Franz diffusion cells and a 30 min equilibration was also performed before application of the formulations.

Permeation experiments

At time zero, formulations were added to the donor compartment of each Franz diffusion cell to have ~10 mg/cm^2 resorcinol (infinite dose). Aliquots of 200 µL of receptor medium were collected every 0.5 h from 0.5 to 3h, then every hour from 3 to 12h. Following each sampling, 200µL of fresh PBS was immediately added to the receptor medium to keep the volume constant for the duration of the experiment. All receptor samples were analysed using validated HPLC methods as described below. All formulations were tested in triplicates, and the data were reported as mean ± standard deviation (SD).

Mass balance analysis

After the 12 h of permeation experiment, formulations were collected; excised human skin and Strat-M® membranes were recovered from the Franz diffusion cells. The two sides of all skin models were carefully swabbed with cotton tips to remove any formulation excess. The cotton tips were then immersed in 2 mL methanol and left for extraction overnight. Skin explants and Strat-M® membranes were cut into small pieces and placed overnight in 2 mL methanol for extraction. Solutions for mass balance were analysed using HPLC analysis using the protocol descried below (*2.4.3 HPLC-DAD for permeation analysis)*.

2.4.2. Experimental set up for EpiSkin® RHE

After overnight incubation (37°C, 95% humidity), the permeation experiment was carried out directly in the 12- well plates to minimize handling of the skin inserts and reduce the risk of tissue damage. On the day of the experiments, EpiSkin® RHE were equilibrated for 30 min with 2 mL of fresh PBS placed in each well. Following the equilibrium step, formulations were deposited onto the surface of each EpiSkin® RHE sample to obtain ~10 mg/cm^2 (infinite dose). Receptor collection times were the same as for the excised skin experiment (*section 2.4.1*). At each collection time point the entire receptor solution (2 mL) in each well was collected. The EpiSkin® RHE were transferred to a new well containing 2 mL of fresh PBS. All receptor samples were analysed using validated HPLC methods as described below (Dancik et al., 2020).

Mass balances analysis

Formulations were removed and set aside for analysis. The EpiSkin® RHE were carefully removed from the inserts using a punch, then both sides were carefully swabbed with cotton tips to remove the excess of formulations. The cotton tips were then immersed in 2 mL of methanol and left for overnight extraction. The epidermis and the polycarbonate support were separated and analysed separately. They were cut into small pieces and immersed in 2 mL methanol for overnight extraction. All mass balances samples were analysed using HPLC analysis using the same protocol descried below (*2.4.3 HPLC-DAD for permeation analysis*) (Dancik et al., 2020).

2.5.HPLC-DAD analysis for permeation assays

HPLC analysis were performed using an Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Voisins-le-Bretonneux, France) piloted with Chromeleon 7.1 software. The system was equipped with a DAD UV ultimate 3000 detector and an C18 column with the particle size of 5 µm and length of 4.6×150mm (Interchim, Montluçon, France). The temperature of the column was adjusted on 25 °C. Absorbance was recorded at 275 nm for detection of resorcinol. Analysis was performed in isocratic mode using a methanol/water (25:75) mobile phase supplemented with Phosphoric acid at 10 µM. 10 µL sample of each experimental solution was injected and a flow rate of 1 mL/min was applied for a total run of 6 min.

To obtain the calibration plot, a stock solution of resorcinol was prepared by dissolving 25mg resorcinol in 40 g PBS. Serial dilutions were performed to obtain the following standard solutions: 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005 and 0.0001 mg / mL. The standard solutions

were then analysed by HPLC. The observed retention time was 4.14 min for resorcinol. For each concentration, the area under the peak was calculated and used for the calibration curve.

2.6.Molecular characterisation of skin models

2.6.1. Confocal Raman Microscopy

Samples preparation

Non-exposed skin models were prepared for CRM. Additional Strat-M® membranes, EpiSkin® RHE and excised human skin replicates were subjected to the same protocol as described for permeation assay, however, after the equilibration step, the membranes were collected and stored at -20°C. Transverse 20 µm slices were prepared using a cryo-microtome (Leica CM 1850 UV, Nanterre, France). The thin sections were placed onto CaF_2 Raman-grade substrates (Crystran, Dorset, UK) for Raman analysis.

Data Acquisition

Raman data were acquired using an Alpha300R Raman microscope (WiTec, Ulm, Germany) equipped with a 532 nm laser source. To avoid photo damaging, the laser power was lowered to 10mW at the samples. A grating 600 lines/mm was selected and the back scattered light was collected on a back illuminated deep depletion CCD detector over the spectral range 0-3600 cm^{-1} with a spectral resolution ~5 cm^{-1}. Spectra were collected using a x100 lens (Olympus, NA=0.9) and the acquisition time was set to 30 sec x 2 accumulations. The instrument was calibrated daily using a 2-step procedure. Firstly, the True Cal function of manufacture's software Project 5 (WITec, Ulm, Germany) was used. It is an automatic multipoint calibration routine performed with a Mercury-Argon (HgAr) light source integrated in the Raman microscope. Secondly, prior to data acquisition, a verification was done using the peak at 520.7 cm^{-1} from a silicon substrate. For each skin model 30 spectra were recorded from the *SC*, the viable epidermis and the dermis that is 90 spectra per skin model and a total 270 spectra for the study.

2.6.2. HPLC/corona and HPLC/HR-MS^n for lipids analysis

Sample preparation

Total lipids of each sample were extracted by the modified methods of Folch (Folch et al., 1957, 1951) and Bligh and Dyer (Bligh and Dyer, 1959), as described by Assi *et al.* in 2020 (Assi et al., 2020). Strat-M® and excised human skin samples were placed directly into 1.5 mL of methanol. For EpiSkin® RHE, the polycarbonate support was removed using pliers before

placing the epidermis into 1.5 mL of methanol. All samples were then mixed for 2 min using a magnetic agitator. 25 µL of 1-Eicosanol (0.3 mg/mL) was added as an internal standard. 3 mL of chloroform was added, followed by 1 h agitation of the whole volume at room temperature, in the dark. For the separation phase, 1.5 mL of water was added and mixed for 10 min at room temperature using a magnetic agitator.

A centrifugation was then performed at 3000 rpm for 10 min at 20 °C, and the organic phase was recovered. 3 mL of chloroform was added to the aqueous phase (H_2O + methanol + skin models) as a washing phase. The whole volume was vortexed and centrifuged for 10 min at 3000 rpm and at 20 °C. The recovered organic phases were mixed together and then evaporated under a stream of nitrogen until dryness. The lipid residue was taken up with 20 µL of chloroform.

Analysis of the lipid extract

The analysis of the extracted lipids was conducted using an HPLC system (Dionex Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with a NPLC system using a (PVA)-Sil column (PVA-bonded column; 5 µm particle size, 150 × 4.6 mm) purchased from YMC (Kyoto, Japan). A solvent gradient of heptane/ethyl acetate (99.8 : 0.2 v/v) (solvent A), acetone and ethyl acetate (2 : 1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v) (solvent B) and 2-propanol/water (85 : 15 v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at 0.025% v/v) (solvent C) was used. The mobile phases and the solvent program are presented in Table 2. The flow rate was set to 1 mL/min and the injected volume was 10 µL. Two detectors were used simultaneously to collect the data, a corona CAD® and a hybrid mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source. The APCI positive ion mode was used to analyse extracted lipids. The mass scan range covered 220–1800 atomic mass units (amu). A full scan detection and fragmentation were performed by the orbital trap at a resolution of 100 000. Details for the analytical conditions used can be found in (Bakar et al., 2021b).

The extracted lipids are named as : **OH**: ω-hydroxy 6-hydroxy-sphingosine, **NS**: Non-hydroxy Sphingosine, **NdS**: Non-hydroxy Dihydro-Sphingosine, **EOP**: ω-hydroxy Phytosphingosine, **EAH**: 1-O acyl α-Hydroxy 6-hydroxysphingosine, **OS**: ω-hydroxy Sphingosine, **ENH**: 1-O acyl Non-hydroxy 6-hydroxy-sphingosine, **ENT**: 1-O acyl Non-hydroxy Dihydroxy-sphinganine, **EAP**: 1-O acyl α-Hydroxy phytosphingosine, **AP**: α-Hydroxy phytosphingosine, **NP**: Non-hydroxy Phytosphingosine, **AS**: α-Hydroxy sphingosine, **Ads**: α-Hydroxy dihydrosphingosine, **OT**: ω-hydroxy Dihydroxy-sphinganine, **NH**: Non-

hydroxy 6-hydroxy-sphingosine, **EOH**: ω-hydroxy 6-hydroxy-sphingosin, **AH**: α-Hydroxy 6-hydroxysphingosine, **NT**: Non-hydroxy Dihydroxy-sphinganine.

Table 2: Composition of the ternary gradient of the mobile phase in NP-HPLC. Phase A: heptane/ethyl acetate (99.8:0.2, v/v), B: acetone/ethyl acetate (2:1 v/v) with acetic acid (0.02% v/v), and C: 2- propanol/water (85:15, v/v) (with acetic acid and ethanolamine each at 0.025% v/v).

Temps (min)	**Phase A%**	**Phase B%**	**Phase C%**
0	100	0	0
3	100	0	0
5	97	3	0
10	94	6	0
15	80	20	0
20	70	30	0
25	60	40	0
30	50	50	0
35	46	39	15
40	40	30	30
50	40	0	60
51	40	0	60
56	0	100	0
61	0	100	0
62	100	0	0
74	100	0	0

2.7.Data analysis

Permeation data

Using the calibration curve (see section 2.4.3), the cumulative mass of permeated resorcinol per area of skin model, Q_n, (mg.cm^{-2}) as a function of time was calculated using equation (1):

$$Q_{\mathrm{n}} = \frac{C_{\mathrm{n}} \times V_{\mathrm{rec}} + \sum_{i=1}^{i=n-1} C_{\mathrm{i}} \times V_{\mathrm{i}}}{S} \quad \textbf{(1)}$$

With Q_n the cumulative mass at a time n, normalized by the diffusion surface S, Cn the resorcinol concentration in the receptor medium, V_{rec} the receptor chamber volume, and Ci the concentrations calculated at the previous time intervals from the sampling volumes V_i.

The flux "*Jss" (*mg.cm^{-2}.h^{-1}) was determined from the slope of the cumulative amount *vs*. time curve in the steady state portion, i.e. when the slope of the cumulative mass of is linear

The lag time t_{lag} *was* determined from the intercept of the cumulative amount curve with the time-axis (Anissimov et al., 2013; Dancik et al., n.d.).

The permeability coefficient Kp ($cm.h^{-1}$) expresses the "speed" of penetration of active ingredients described in Equation (2):

$$K_p = J_{SS}/C_d \quad \textbf{(2)}$$

Where Cd is the applied donor concentration in $mg.cm^{-1}$.

All results are reported as mean ± SD (n = 3). The statistical significance of the data was determined using Student's t-test with a level of significance set for *p*-values ≤ 0.05.

Raman data

The spectra were divided into two regions. The Fingerprint Region (FPR) between (800 - 1800 cm^{-1}) and the High Wavenumber Region (HWR) (2500 - 3700 cm^{-1}). A Lieber baseline correction was applied (Lieber and Mahadevan-Jansen, 2003), using a linear correction function with 10 iterations, followed by a unit vector normalization.

3. Results

3.1.*In vitro* permeation

3.1.1. Resorcinol solution

Figure 1 shows the permeated cumulative amount for the 5 wt% resorcinol aqueous solution using Strat-M® membranes (blue squares), EpiSkin® RHE (orange circles), and excised human skin (red diamonds). After 30 min, which corresponds to the first interval point of the kinetics, the cumulative amounts were very low for the 3 skin models, i.e., 1.0 ± 0.05 $\mu g.cm^{-2}$ for Strat-M®, 1.174 ± 0.17 $\mu g.cm^{-2}$ for excised human skin and 0.691 ± 0. 18 $\mu g.cm^{-2}$ for EpiSkin® RHE. A student's t-test ($0.06 < p < 0.54$) confirmed no significant difference in these values. Cumulative amounts of resorcinol permeated between 30 min and 3 h following application to Strat-M® EpiSkin® RHE ($0.07 < p < 0.79$) and the excised skin ($0.05 < p < 0.35$) were not statistically different. At 4 h, cumulative amounts results started to differ, with 110 ± 27 $\mu g.cm^{-2}$ for Strat-M® membranes, 231 ± 58 $\mu g.cm^{-2}$ for EpiSkin® RHE and 190 ± 12 $\mu g.cm^{-2}$ for excised human skin. Differences in cumulative amounts permeated were significant at all-time points between 4 and 12 h ($2.6 \cdot 10^{-6} < p < 0.018$). The final cumulative amounts at 12 h were 450 ± 56 $\mu g.cm^{-2}$ for Strat M®, 89 ± 45 $\mu g.cm^{-2}$ for excised human skin (5-times lower than Strat-M®), and 1319 ± 80 $\mu g.cm^{-2}$ for EpiSkin® RHE (3-times greater than Strat-M®).

Table 3 shows significant differences in the steady state flux Jss, with 410 ± 5 $\mu g.cm^{-2}.h^{-1}$ for Strat-M®, which is 8-times greater than the flux through excised human skin (5 ± 3

µg.cm^{-2}.h^{-1}, p = 8.87·10^{-4} < 0.05), and 3.5 times lower than the flux through EpiSkin® RHE (138 ± 5 µg.cm-2.h^{-1}, p = 2.78·10-6 < 0.05). The lag time to steady-state (t lag) was found to be 1.27 ± 0.70 h for Strat-M®, which is 1.6 and 1.8 times shorter compared to excised human skin (tlag= 2.08 ± 0.84 h) and EpiSkin® RHE (tlag=2.34 ± 0.49 h), respectively. For t lag, no significant differences were found between Strat-M® and excised human skin (p = 0.28 > 0.05), between Strat-M® and EpiSkin® RHE (p = 0.09 > 0.05) and between excised human skin and EpiSkin® RHE (p = 0.66 > 0.05). The permeability coefficient (Kp) for Strat-M® is 4.381 ± 0.498 cm.h^{-1} that is 5-times greater than excised human skin (0.834 ± 0.393 cm.h^{-1}) and 3.5-times lower than EpiSkin® RHE (14.699 ± 0.588 cm.h^{-1}). Significant differences were found (1.70·10-6 < p < 8.51·10-4).

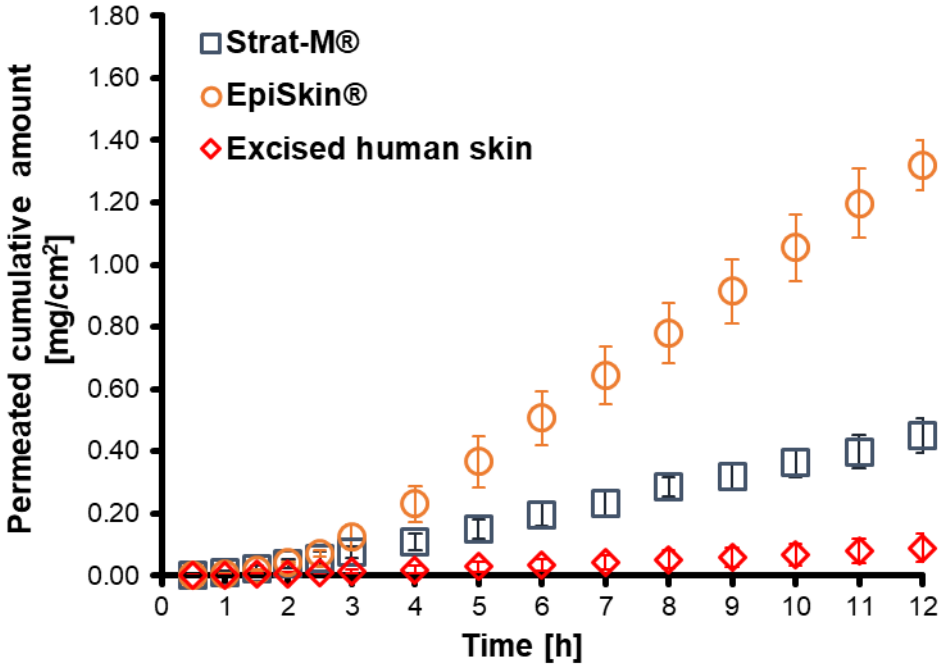


Figure 18: *Permeated cumulative amount (mean ± standard deviation) for 5 wt% resorcinol solution through Strat-M® (blue Squares, n = 3), EpiSkin® RHE (orange circles, n = 3) and excised human skin (red diamonds, n = 9).*

Table 3: Steady-state fluxes (Jss), lag times (tlag) and permeability coefficients (kp) obtained for Strat-M® membrane, EpiSkin® RHE and excised human skin.

		J_{ss} [µg.cm^{-2}.h^{-1}]	**tlag [h]**	**Kp·10^3 [cm.h-1]**
Solution	Strat-M®	41 ± 5 *	1.27 ± 0.70	4.381 ± 0.498*
	EpiSkin® RHE	138 ± 5 *	2.34 ± 0.49	14.699 ± 0.588*
	Excised human skin	5 ± 3 *	2.08 ± 0.84	0.834 ± 0.393*

(n = 3 for Strat-M® and EpiSkin® RHE and n=9 for human skin; mean ± standard deviation)

** p < 0.05.*

3.1.2. Resorcinol hydrogel

Figure 2 shows the permeated cumulative amounts for 5 wt% resorcinol hydrogels with Strat-M®, EpiSkin® RHE, and excised human skin. At 30 min, the permeated cumulative amounts were 0.0025 ± 0.0003 mg.cm^{-2} for excised human skin and 0. 7 ± 0. 4 µg.cm^{-2} for EpiSkin®), $p < 0.05$. For Strat-M® membrane, no resorcinol was detected in receptor medium. Values increased to reach, at 4h, 103 ± 17 µg.cm^{-2} for Strat-M®, 21 ± 8 µg.cm^{-2} for excised human skin and 254 ± 24 µg.cm^{-2} for EpiSkin®. Significant differences were observed at this time point ($0.002 < p < 0.006 < 0.05$). At 12h cumulative amounts were 438 ± 25 µg.cm^{-2} for Strat-M®, 93 ± 22 µg.cm^{-2} for excised human skin, and 1389 ± 73 µg.cm^{-2} for EpiSkin® RHE. Resorcinol permeation through Strat-M® membranes was 4.7 times greater than excised human skin and 3-times lower than EpiSkin® RHE. Significant differences were observed between the 3 skin models ($6.16 \cdot 10^{-5} < p < 0.0007$).

Table 4 presents values for Jss, tlag, and Kp. It is noticed that values of Jss are statistically different between models. The Jss through Strat-M® is equal to 42 ± 6 µg.cm^{-2}.h^{-1}, which is 4.7 times greater than excised human skin (9 ± 2 µg.cm^{-2}.h^{-1}) with $p = 5.14 \cdot 10^{-5} < 0.05$, and 3.4 times lower than EpiSkin® RHE (142 ± 6 µg.cm^{-2}.h^{-1}) with $p = 0.01 < 0.05$. However, no significant difference was found for the tlag, with 1.46 ± 0.87 h for Strat-M®, 1.88 ± 0.50 h for excised human skin ($p = 0.52 > 0.05$) and 2.20h for EpiSkin® RHE ($p = 0.28 > 0.05$). The permeability coefficient Kp was 4.466 ± 0.726 cm.h^{-1} for Strat-M®, which is 5-times greater than excised human skin (0.901 ± 0.175 cm.h^{-1}) and therefore, significantly different ($p = 0.01 < 0.05$). The Kp values that were 3.4-times lower for Strat-M® than EpiSkin® RHE (15.178 ± 0.638 cm.h^{-1}) are significantly different ($p = 4.90 \cdot 10^{-5} < 0.05$).

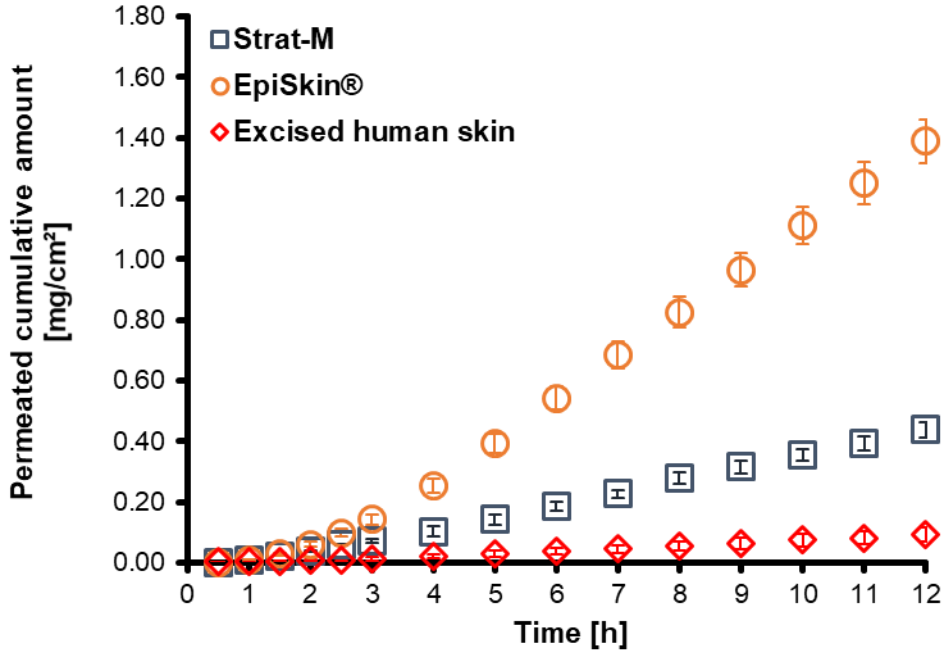


***Figure 19**: Permeated cumulative amount for **resorcinol** in 5 wt% **hydrogel** through Strat-M® (blue Squares), EpiSkin® RHE (orange circles) and excised human skin (red diamonds), (n = 3 for Strat-M® and EpiSkin® RHE and n=9 for human skin; mean ± standard deviation).*

Table 4: Steady-state fluxes (Jss), lag times (tlag) and permeability coefficients (kp) obtained from cumulative amount of resorcinol in 5 wt% hydrogel for Strat-M®, EpiSkin® RHE and excised human skin (n = 3 for Strat-M® and EpiSkin® RHE and n=9 for human skin; mean ± standard deviation). * Significantly different ($p < 0.05$).

		J_{ss} [µg.cm^{-2}.h^{-1}]	tlag [h]	Kp·10^3 [cm.h^{-1}]
Hydrogel	Strat-M®	42 ± 6 *	1.46 ± 0.87	4.466 ± 0.726*
	EpiSkin® RHE	142 ± 6 *	2.20 ± 0.11	15.178 ± 0.638*
	Excised human skin	9 ± 2 *	1.88 ± 0.50	0.901 ± 0.175*

3.1.2. Resorcinol emulsion

In Figure 3 it is observed that the cumulative amount of resorcinol 5 wt% emulsion in Strat-M® (blue squares), at 30 min, is 2 ± 0.36 µg.cm^{-2}, 2.6 ± 0. 03 µg.cm^{-2} for excised human skin (red diamonds) and 1.5 ± 0.13 µg.cm^{-2} for EpiSkin® RHE (orange circles). No statistical difference was observed at this time point, which is confirmed by the Student's t-test ($0.06 < p < 0.21$). The curves for the 3 skin models shown a similar trend between 30 min and 2.5h with a slow increase in resorcinol concentration observed up to 2h, however, resorcinol amounts through Strat-M® remain not significantly different compared to excised human skin ($p = 0.06$), and EpiSkin® RHE ($p=0.07$). At 2.5h, a significant difference was observed between Strat-M®

(62 ± 17 µg.cm^{-2}) and EpiSkin® RHE (117 ± 26 µg.cm^{-2}) (p=0.03 <0.05). However, no significant difference between Strat-M® and excised human skin (17 ± 12 µg.cm^{-2}) (p= 0.11 > 0.05) was found. In the time interval between 3h to 12h, cumulative amounts of resorcinol continued to increase, reaching at the end point respective values equal to 454 ± 78 µg.cm^{-2} for Strat-M®, 201 ± 11 µg.cm^{-2} for excised human skin (2.2-times lower than Strat-M®), and 1607 ± 132 µg.cm^{-2} for EpiSkin® RHE (3.5-times greater than Strat-M®). Significant differences were observed between Strat-M® and excised human skin (p=0.03 < 0.05) and between Strat-M® and EpiSkin® RHE (p=7.02 ·10^{-5} < 0.05).

Table 5 highlights that Jss displays significant differences with 40 ± 6 µg.cm^{-2}.h^{-1} for Strat-M®, that is 3-times greater than excised human skin (13 ± 6 µg.cm^{-2}.h^{-1}) with p = 0.007 < 0.05, and 4-times lower than EpiSkin® RHE (162 ± 11 µg.cm^{-2}.h^{-1}) with p = 1.12·10^{-5} < 0.05. For the lag time to steady-state (t lag), no significant difference was found between Strat-M® (tlag= 0.88 ± 0.52 h) and excised human skin (tlag=1.79 ± 0.71 h), with p=0.15 > 0.05, however, significant differences were found between Strat-M® and EpiSkin® RHE (tlag=2.05h), with p=0.048 < 0.05.

Kp= 4.272 ± 0.671 cm.h^{-1} for Strat-M® was found significantly different to excised human skin (Kp= 1.413 ± 0.623 cm.h^{-1}) (p= 0.006 < 0.05) and to EpiSkin® RHE (Kp= 17.345 ± 1.170 cm.h^{-1}) (p= 1.12·10^{-5} < 0.05).

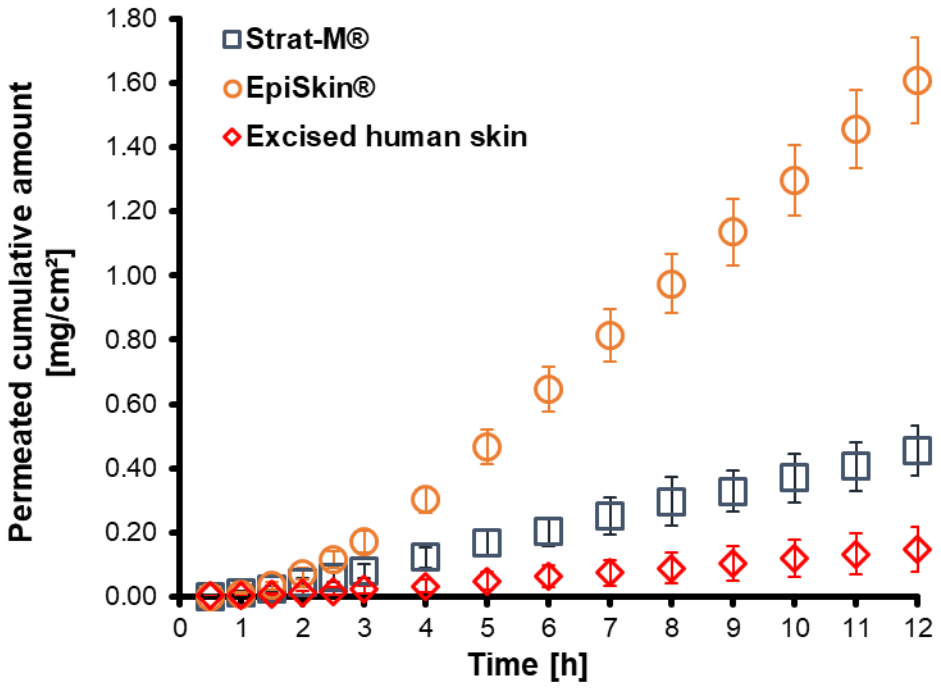


Figure 20: *Permeated cumulative amount of* ***resorcinol emulsion*** *through Strat-M® (blue Squares), EpiSkin® RHE (orange circles) and excised human skin (red diamonds), (n = 3 for Strat-M® and EpiSkin® RHE and n=9 for human skin; mean ± standard deviation).*

Table 5: Steady-state fluxes (Jss), lag times (tlag) and permeability coefficients (kp) obtained from cumulative amount of **resorcinol 5 wt% emulsion** for Strat-M®, EpiSkin® RHE and excised human skin

		J_{ss} [$\mu g.cm^{-2}.h^{-1}$]	tlag [h]	$Kp \cdot 10^3$ [$cm.h^{-1}$]
Emulsion	Strat-M®	40 ± 6*	0.88 ± 0.52	4.272 ± 0.671*
	EpiSkin® RHE	162 ± 11*	2.05 ± 0.19	17.345 ± 1.170*
	Excised human skin	13 ± 6*	1.79 ± 0.71	1.413 ± 0.623*

(n = 3 for Strat-M® and EpiSkin® RHE and n=9 for human skin; mean ± standard deviation).

** Significantly different ($p < 0.05$).*

3.2.Mass Spectrometry

The higher permeability of RHE models compared to human skin is commonly explained by the different composition and organisation of lipids in the epidermis and SC that plays a key role in the skin barrier function (Andrews et al., n.d.; Baroni, n.d.). The literature supports that, in most of RHE skin models, the ceramides profile is different from that found in human native skin. Generally, in the RHE skin models, the Ceramides subclasses EO, NS and AS are increased while the fraction of Ceramides NP is strongly reduced (Bouwstra, 2021).

Presently, analysis of the lipid composition by NP-HPLC/HR-MS (Tfayli et al., 2013), enabled to detect subclasses like triglycerides (12.18–13.59 min), cholesterol (15.86–16.16 min), diglycerides (16.33–16.76 min), and ceramides (between 19 and 32 min), glucosylceramides (36 min), and finally, phospholipids and sphingomyelins (40 and 45 min) (figure 4).

Overall, the chromatograms show that similar profiles of triglycerides and cholesterol were found in the excised human skin and EpiSkin® RHE. However, a smaller ceramides content was found in EpiSkin® RHE compared to excised human skin.

The ratio between peak 1 corresponding to subclasses OH/NS/NdS/OS and the overall ceramide content (Peak 1+2+3+4) showed that esterified and double esterified ceramides were 1.8 times more abundant in EpiSkin® RHE (ratio = 0.540 ± 0.023) than excised human skin (ratio = 0.294 ± 0.022) (Figure 5-B and 5-D).

For excised human skin ceramide subclasses AP/NP/AS/AdS/OP (Peak 2) were 9 times higher (ratio = 0.150 ± 0.020), NH/EOH (Peak 3) 1.25 times higher (ratio = 0.388 ± 0.016) and AH/NT (Peak 4) 1.30 times higher (ratio = 0.166 ± 0.018) compared to EpiSkin® RHE (respective ratios equal to 0.017 ± 0.005, 0.312 ± 0.342 and 0.131 ± 0.009, Figure 5). The

variations in lipids contents observed directly influenced the functionality of the barrier function. This is concomitant with the study by Bakar and co-workers in 2021 that demonstrated, using the same ratio for peak 01, Peak 02, Peak 03 and Peak 04, that EpiSkin® RHE do not have a fully functional barrier function at maturation day 14 (Bakar et al., 2021a).

This result is also in agreement with the report of Van Smeden *et al*, that have identified with LC/MS that 12 ceramides subclasses were present in EpiSkin® similar to excised human skin (van Smeden et al., 2011). Here, the results on the ceramides subclasses corroborate with the work from Pappinen *et al*, which showed that the Ceramides profile on EpiSkin® is different from that found in native human skin, especially, for the ceramides subclasses EOH, NS and AS that are increased, while the fraction of Ceramides NP is strongly reduced (Pappinen et al., 2008).

The differences in the permeability of models to AI is largely explained by the SC function barrier. Although EpiSkin® RHE contains the same lipids classes compared to excised human skin, amount differences found in Ceramides subclasses directly impact the lipid packing. The literature supports RHE models present a predominant less dense hexagonal packing instead of the orthorhombic organization found in human skin (Bouwstra et al., 1995). Simard *et al* reported that the esterified ω-hydroxy-ceramide EOS is essential for the organization of the *stratum corneum* lipid matrix, contributing to the formation of the orthorhombic packing (Simard et al., 2019). On the other hand, a low level of free fatty acids and the shorter chain lengths of Ceramides can contribute to the formation of hexagonal packing, which leads to an impaired skin barrier. This would facilitate the partition of the compounds into the corneocytes, making the trans-cellular pathway more prominent in skin permeation, affecting the hydrophilic compounds (Bouwstra, 2021). Therefore the differences observed for resorcinol diffusion in this work between the excised human skin and EpiSkin® RHE is consistent established behaviour of each model (Thakoersing et al., 2012).

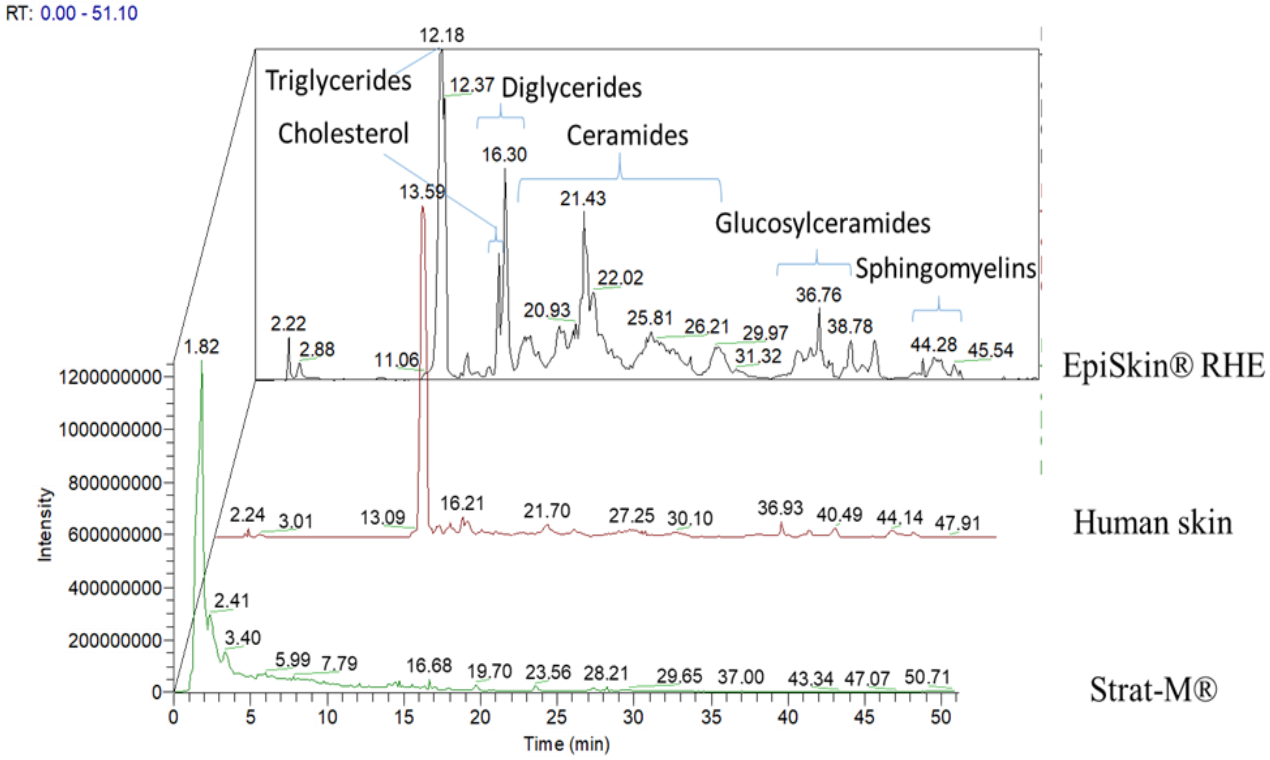


Figure 21: *NP-HPLC/HR-MS chromatographic profile of lipid classes obtained for the EpiSkin® RHE, excised human skin and Strat-M®.*

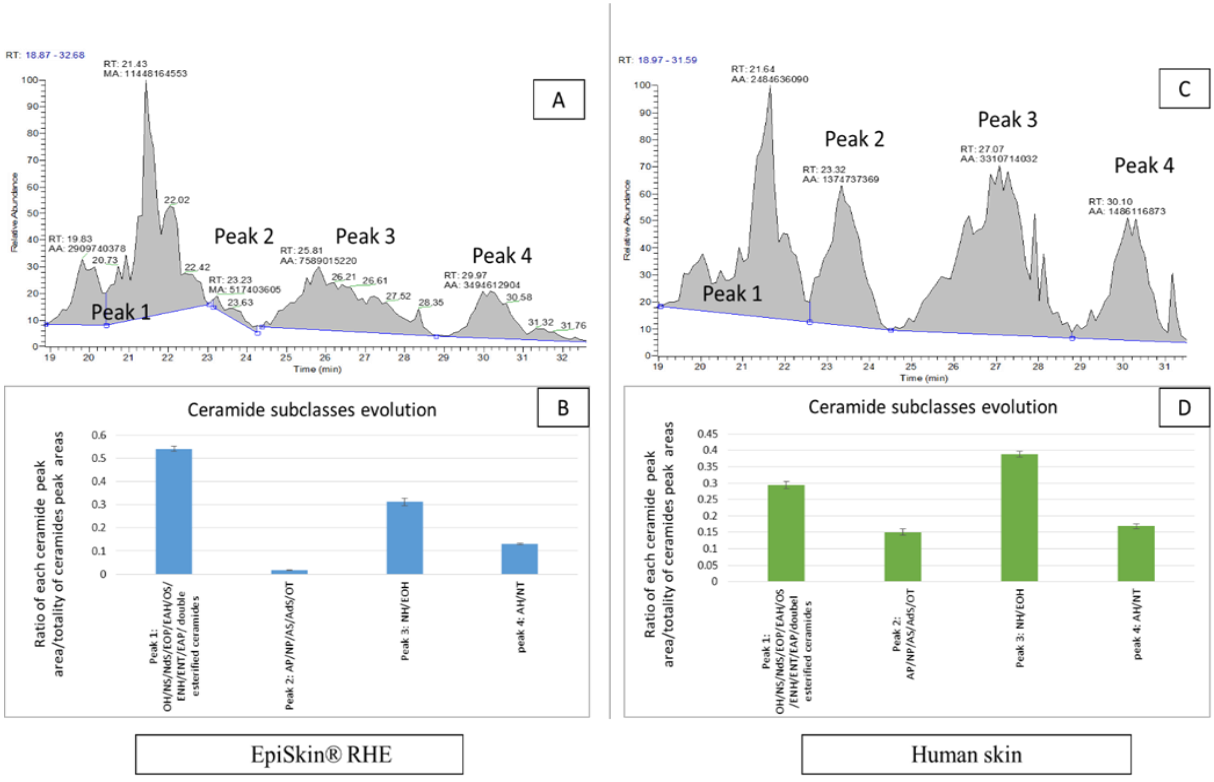


Figure 22: *The evolution of ceramide subclasses in the EpiSkin® RHE and Excised human skin models. A and C present the chromatographic profile of ceramide zone (eluted 19 and 32 min into 4 chromatographic peaks) obtained for EpiSkin RHE and Excised human skin respectively. B and D present the evolution of each ceramide subclasses chromatographic peak into the EpiSkin RHE and Excised human skin samples respectively, n=3.*

3.3.Raman spectroscopy

3.3.1. Human skin versus EpiSkin® RHE

Raman spectroscopy is now well established for the chemical characterisation of skin layers and many examples for band assignment for reconstructed and human skin samples can be found in the literature (Tfaili et al., 2012; Tfayli et al., 2007a).

Active ingredients that are intended to reach specific cellular targets within the skin need to first penetrate and permeate the SC, which acts as a highly efficient physical barrier. The SC consists of closely packed corneocytes, forming a cellular phase, surrounded by a dense lipid matrix often referred to as the "bricks and mortar" structure. Lipids play a crucial role in the barrier function and have been extensively studied for their conformation and composition using confocal Raman spectroscopy (CRM) (Assi et al., 2020; Choe et al., 2018, 2017; Tfayli et al., 2012).

Mean Raman spectra for the SC of excised human skin and EpiSkin® RHE are shown in figure 6A and 6B. Similar features were observed for both human skin samples and EpiSkin® RHE (Caspers et al., 2001; Rigal et al., 2021; Tosato et al., 2012). In the FPR (figure 6-i), features attributed to lipids can be identified at 958 cm^{-1} for CH_2 bending, 1302 cm^{-1} assigned to CH_2 twisting. The bands at 1160 cm^{-1}, 1130 cm^{-1} are associated with *trans* C-C stretching while the band around 1080 cm^{-1} is assigned to C-C stretching in *gauche* conformation. The position and shape of the band around 1450 cm^{-1} associated to CH_2 scissoring and CH_3 bending is a good indicator of the protein/lipid proportion. Presently, the maximum found at 1444 cm^{-1} and the presence of a shoulder at 1465 cm^{-1} suggests a relatively high lipid content in the SC (Tfaili et al., 2012; Tfayli et al., 2007b). The band at 1655 cm^{-1} is associated to N–C = O deformation for the Amide I. In the HWR (Figure 6-ii) the intense features 2850 cm^{-1} and 2880 cm^{-1} are assigned to CH_2 symmetric and asymmetric vibration, respectively. The band at 3300 cm^{-1} corresponded to OH stretching.

Despite the qualitative similarities and the numerous common spectral features between EpiSkin® RHE and excised human skin, variations in bands intensities suggested quantitative differences. For instance, the ratio I_{1444} (CH_2 scissoring and CH_3 bending) / I_{1655} (Amide I) suggested that the lipid content in the SC of EpiSkin® RHE (R = 1) is lower than that in the SC of excised human skin (R = 1.3).

Furthermore, CRM provides additional information about the conformational order and the lateral packing order in lipids state (Choe et al., 2018, 2017). The intercellular Lipids (ICL) conformational order can be expressed by the '$S_{skelton}$' and 'S_{lat}' (Choe et al., 2018, 2017; Tfayli

et al., 2012). $S_{skelton}$ is calculated from Raman intensities from the SC spectra, as follows: $S_{skeleton} = I_{1080}/ (I_{1130} + I_{1060})$. I_{1080} is the peak intensity at 1080 cm^{-1}, which results from the gauche conformation of the ICL (more disordered packing-Hexagonal state tendency), as well as the peak intensities at 1130 cm^{-1} (I_{1130}) and 1060 cm^{-1} (I_{1060}), which correspond to the all trans conformation (more ordered packing- Orthorhombic state tendency). Thus, a higher $S_{skeleton}$ value represents a tendency towards a disordered state of ICL, while lower values represent a tendency towards a more ordered state of ICL in the SC (Choe et al., 2018, 2017; Tfayli et al., 2012).

Similarly to the FPR, the features were observed for both human skin samples and EpiSkin® RHE (Caspers et al., 2001; Rigal et al., 2021; Tosato et al., 2012), however the ratio I_{2880} (phospholipids) / I_{2950} (proteins) suggested that the lipid content is lower in the SC for EpiSkin® RHE (R=0.8) than excised human skin (R = 1.1).

The ICL packing order 'S_{lat} is calculated as $S_{lat} = I_{2880}/I_{2850}$. I_{2880} and I_{2850} are the lipid-related Raman peak intensities measured at around 2880 and 2850 cm^{-1} in SC of EpiSkin® RHE and human skin samples. A higher S_{lat} represents a more ordered state of ICL packing, while lower Slat represents the more disordered state of ICL packing order from the viewpoints of the C-H vibration mode (Choe et al., 2018, 2017; Tfayli et al., 2012). the results found here corroborate the literature with a higher $S_{skelton}$ for RHE (0.50) indicating a more disordered state of ICL compared to human skin (0.45). The lower S_{slat} for the RHE (1.6) than for human skin (1.8), confirmed the disordered state of ICL of the RHE models. The literature supports that the intercellular lipid conformation of RHE models present a predominant hexagonal state instead of the orthorhombic state found in human skin (Bouwstra et al., 1995). A hexagonal lipids packing would result in a compromised skin barrier, which would allow compounds to infiltrate into the corneocytes, therefore increasing the significance of the transcellular pathway for skin permeation. This could specifically influence hydrophilic compounds and possibly account for the differences in permeation observed between excised human skin and EpiSkin® RHE in this study (Thakoersing et al., 2012).

3.3.2. Strat-M®

Strat-M® is a polymeric membrane composed of 3 layers (Figure 7-i). The presence of polyether sulfone (PES) in the two first layers (A and B) was confirmed by the existence of specific Raman bands (Figure 7- ii) at 794 cm^{-1} (stretching C-S) and 1073 cm^{-1} (symmetric C-O-C stretching), 1111 cm^{-1} (asymmetric C-O-C stretching), 1149 cm^{-1} (symmetrical stretching S=O), 1584 cm^{-1} (C=C stretching in aromatic rings), 1604 cm^{-1} (overtone of CH bending), 2908

cm^{-1} and 2968 cm^{-1} (CH_3)C-H stretching) and 3076 cm^{-1} (=CH stretching in aromatic rings) (Mushtaq et al., 2014). The presence of a layer of polyolefin (layer C) was also confirmed by specific Raman bands at 1039 cm^{-1} (C-C stretching), 1170 cm^{-1} (CH_2 rocking) crystalline, 1331 cm^{-1} (CH_2 rocking) amorphous, 1363 cm^{-1} (wagging (*ω)* CH_2) crystalline + amorphous, 1440 cm^{-1} (δ CH_2 bending) amorphous-trans and 1464.6 cm^{-1} (bending CH_2) amorphous (Rodríguez-Pérez et al., 2005). Besides, the bright field image (Figure 7- i) corroborates that membrane layers are increasingly more porous and open in an attempt to create a diffusion gradient similar to the one found in human skin layers. Uchida *et al,* confirmed the density of each layer differed and gradually decreased from the top of the membrane using Scanning and Transmission Electron Microscopy (Uchida et al., 2015). However, contrary to the literature reports claiming that membranes are impregnated with a blend of synthetic lipids (Haq et al., 2018; Karadzovska, 2013), Raman spectra of the Strat-M® membrane (Figure 6- ii) do not display lipid bands. This was confirmed by NP-HPLC/HR-MS technique that did not detect any lipid bands either (see figure 4-Strat-M®), despite the high sensitivity of this technique (Tfayli et al., 2013).

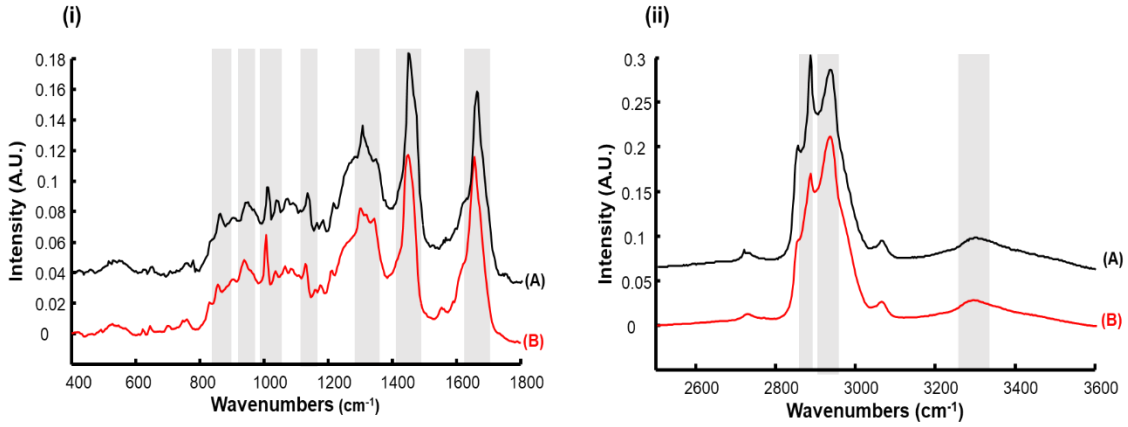


Figure 23: *(i) Representative fingerprint spectra (400-1800cm^{-1}) of excised human skin SC (A) and EpiSkin® RHE SC (B). (ii) Representative high wavenumbers spectra (2500-3600 cm^{-1}) of excised human skin SC (A) and EpiSkin® RHE SC (B).*

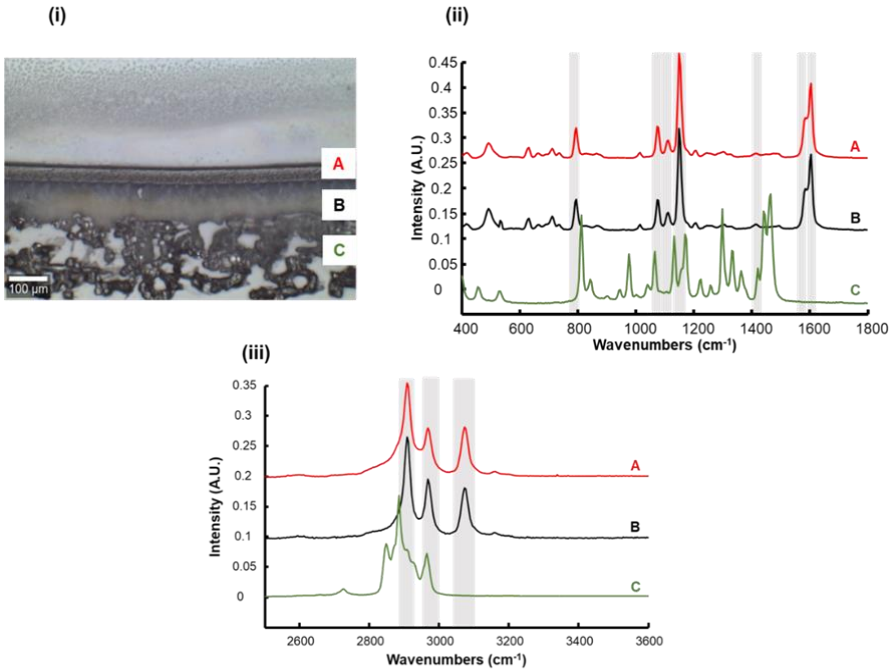


Figure 7: *(i) Bright field image of a representative section of Strat-M® with 10x magnification showing the layers A, B and C. (ii) Representative fingerprint spectra (400 -1800cm-1) of Strat-M® layers. (iii) Representative high wavenumbers spectra (2500 -3600cm-1) of Strat-M® layers: layer A, layer B and layer C.*

4. Discussion

Permeation assays conducted for the 3 formulations show that permeability of resorcinol in Strat-M® falls between that in EpiSkin® RHE and in excised human skin. Jss values for Strat-M® are 3.5-times lower for solution and hydrogel (tables 3 and 4) and 4-times lower for emulsion (table 5) compared to EpiSkin® RHE. Jss were, however, 8-times greater for the solution (table 3), 4.7-times greater for the hydrogel (table 4), and 2.2-times greater for the emulsified system (table 5) compared to excised human skin.

The fact that Strat-M® membranes reproduce a skin barrier function closer to that of human skin compared to EpiSkin® RHE can be attributed to the density of the PES in the two first layers of the model and the hydrophobicity of the polymers. Several works show that the lipophilic nature of the membrane and its porous structure modulates the permeation through the Strat-M® (Haq et al., 2018; Karadzovska, 2013; Uchida et al., 2015). However, the inert attribute of the synthetic polymers does not reproduce the complex interaction that occurs between the skin and formulation. The comparison of the speed of the penetration expressed as a permeability coefficient (Kp) for the 3 tested formulations, i.e, solution, hydrogel and emulsion, showed that for Strat-M® (figure 8 –a), Kp values were not significantly different between the solution and hydrogel, solution and emulsion, and hydrogel and emulsion. The addition of surfactants in the emulsion did not increase the diffusion rate compared to the other

two formulations. However, there were significant differences in Kp values between the solution and emulsion in EpiSkin® RHE (figure 8 –b), but not between the solution and hydrogel. For excised human skin (figure 8 –c), Kp was significantly higher for the emulsion compared to the solution for all donors, but only significantly higher than the hydrogel for donor 2 and 3, but not for donor 1.

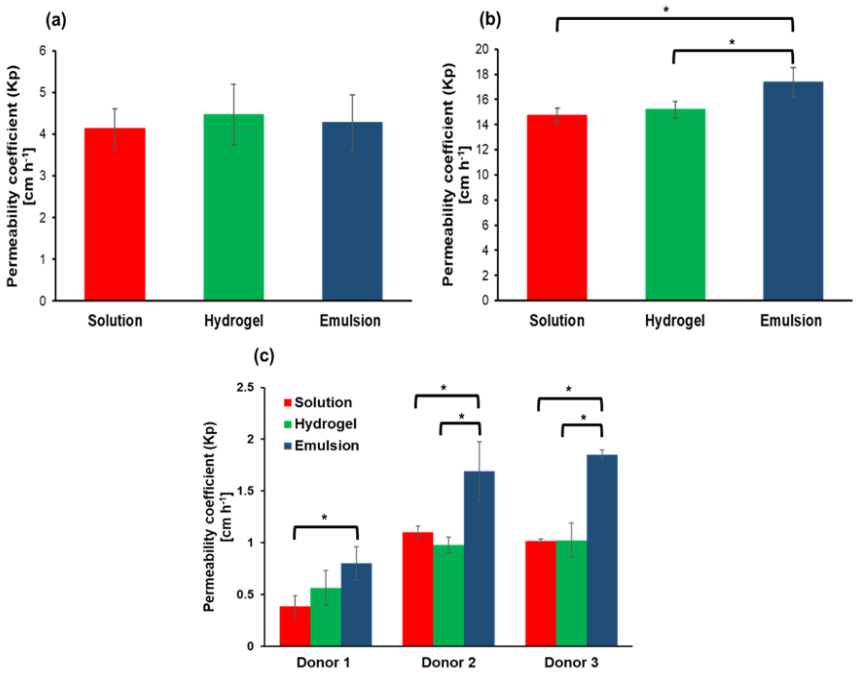


Figure 8: *Permeability coefficients of tested formulations (Solution, hydrogel and emulsion) through: (a) Strat-M®, (b) EpiSkin® RHE and (c) excised human skin: donor1, donor2 and donor3, (red bars: solution; green bars: hydrogel; blue bars: emulsion. (n = 3 for Strat-M® and EpiSkin® RHE and n=9 for human skin; mean ± standard deviation). * Significantly different (p < 0.05).*

Both EpiSkin® RHE and human skin explants show an increase in resorcinol permeation for emulsions due to two reasons. Firstly, the surfactants present in the emulsion can destabilize the skin barrier by disrupting the structural lipid organization and increasing solubilisation of the ACI into the intercellular lipid space (Kichou et al., 2022a; Monteiro-Riviere, 2010). This can lead to alterations in the morphology of the SC and the living layers of the reconstructed epidermis, resulting in higher chemical permeability (Dragicevic and Maibach, 2015). Secondly, the ceramides content in EpiSkin® RHE is smaller compared to human skin explants, leading to a weaker barrier function (Bakar et al., 2021a). Additionally, according to the results obtained from CRM in this study, the intercellular lipid conformation in EpiSkin® RHE is more disordered than in human skin, which weakens the skin barrier and allows the tested substance to penetrate the corneocytes, resulting in increased skin permeation (Thakoersing et al., 2012).

From the permeation studies perspective, the data reported here are in agreement with an increasing number of studies that demonstrate the suitability of EpiSkin® RHE to assess cutaneous penetration and to compare complex topical formulations (Dreher et al., 2002; Netzlaff et al., 2005) with significantly lower variability between replicates compared to human skin (Küchler et al., 2013; Yun et al., 2018). However, there are still important differences between the RHE and the human skin, especially concerning lipid composition and organization (Bouwstra, 2021). Despite all the progress that has been made, currently no established RHE model reproduces quantitively the barrier function found in excised human skin.

The cumulative amounts of resorcinol recovered after 12h for the 3 formulations studied, i.e., 450 µg.cm^{-2} (solution); hydrogel 430 µg.cm^{-2} (hydrogel) and emulsion 450 µg.cm^{-2} (emulsion) (Figures 1, 2 and 3) suggested that Strat-M® membranes were not sensible to the vehicle used for topical applications. It can be inferred that the polymeric membrane acted as a physical barrier that modulates the AI diffusion based on its physico-chemical properties (logP and molecular mass).

Although the Strat-M® model is not representative of the interaction of vehicles with the superficial layer of the skin due to the absence of lipids and other biochemical compounds of the skin, the multilayer structure with polymers of different densities provided a skin-like barrier property. Their relatively low-cost and negligible batch-to-batch variability could justify using this model as a screen tool for potential actives molecules prior to initiate the formulation process [45].

In the literature, a few examples of studies can be found, nevertheless results from comparative studies are not necessarily convincing. Three articles reported a good correlation between Strat-M® and human skin for the permeation of nicotine, amphotericin B and ibuprofen. However formulations studied contained permeation enhancers such as polyols (Haq et al., 2018; Kaur et al., 2018; Klebeko et al., 2021). Arce *et al.* demonstrated through electrical impedance that high concentrations of polyol can breach the barrier integrity of Strat-M® (Arce et al., 2020), and most likely of the human skin. Therefore, the correlation reported can be controversial when considering that models both had impaired barrier function.

Haq *et al.* investigated the skin permeation behaviour of transdermal formulations on Strat-M® membrane and human cadaver skin. To this end, five formulations containing 1% of nicotine were prepared in propylene glycol with or without 5% of an additional enhancer (Azone, Tween 80, Eucalyptol, or N-methyl pyrrolidone). The results showed that the amount of nicotine permeated from the formulation containing Azone was significantly greater ($p < 0.05$) than the other formulations. The authors also reported that the Strat-M® membrane had

a high correlation to human skin for nicotine flux with a R^2 value of 0.99. However, propylene glycol can alter the skin barrier (Mohammed et al., 2014), and it is therefore difficult to conclude if the correlation is relevant or due to the study of propylene glycol-based formulations that induced barrier impairment for both human skin and Strat-M® membrane.

Kaur *et al.* studied the permeation and deposition effect of amphotericin B in different types of biological membranes (human, rat, and porcine skin) versus the Strat-M® membrane (Kaur et al., 2018). The authors compared the skin permeation of a market gel (Fungisome™) with a developed nanoethogel (containing 30% of ethanol) and a nanogel formulation (with 42% of surfactant). The nanocarriers-based formulations presented better permeation results and among all the skin models tested, a better permeability correlation (R^2=0.99) was found between Strat-M® and excised human skin. Nevertheless, scanning electron microscopy images showed that the nanoformulations affected the compact structure of the membranes, especially for the Strat-M® membrane. If the barrier is impaired by permeation enhancers, it is not surprising that the results are correlated with human skin, also very sensitive to these molecules at high concentrations. More recently, Klebeko *et al.* evaluated the impact of vehicle on the skin permeation of ibuprofen and its derivatives through Strat-M® and human skin. Formulations based on Celugel®, which is a hydrophilic gel base containing glycerol among other ingredients, enhanced the skin permeation of the active substance in comparison with a commercial preparation. Strat-M® was considered a good model, showing high penetration correlation with human skin (R^2=0.84) (Klebeko et al., 2021).

Strat-M® membrane has been shown to reproduce a skin barrier function closer to that of human skin compared to EpiSkin® RHE. However, it still does not fully reproduce the complex interaction between the skin and formulation. Despite this limitation, the Strat-M® membrane is a relatively low-cost and reproducible model that can be used to screen potential active molecules prior to the formulation process.

5. Conclusion

This work reports the results of permeation assays conducted on three different formulations using three different skin models, namely Strat-M®, EpiSkin® RHE, and excised human skin. The permeated accumulated amounts, the steady-state fluxes and the permeability coefficients obtained from experiments highlighted that the permeability of Strat-M® to resorcinol is closer to excised human skin than Episkin® RHE compared to excised human skin. The permeability coefficient for the 3 tested formulations showed significant differences between the solution and emulsion in EpiSkin® RHE and excised human skin but it was not observed for Strat-M®

membranes. Despite, the synthetic polymers-based model does not reproduce the complex interactions between the skin and formulation due to the absence of lipids and other biochemical compounds of the skin, the multilayer structure with polymers of different densities provided a skin-like barrier property. Strat-M® did not quantitatively reproduce the barrier function found in excised human skin but the results from permeation assays suggested that it could be used as valuable and reproducible cost-effective tool for rapid screening for potential hydrophilic actives molecules at the early stage of the formulation process.

Author Contributions: Conceptualization, F.B., Y.D and E.M.; methodology, H.K, Y.D, F.B and E.M ; software, H.K and F.B.; validation, F.B and E.M; formal analysis, H.K, A.T, R.J, J.B and F.B.; investigation, H.K, A.C and E.M; resources, E.M and I.C; data curation, H.K and F.B; writing—original draft preparation, H.K, F.B, A.C, Y.D, and E.M.; writing review and editing, H.K, A.C, F.B, A.T, R.J, J.B and E.M.; visualization, H.K and F.B.; supervision, F.B, Y.D and E.M.; project administration, F.B and E.M.; funding acquisition, F.B and E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ambition Recherche et Développement Centre Val de Project ARD CVL MINIONs (2020-00141275) and project APR-IR UFO (2020-00138875). Y.D. thanks Le STUDIUM Institute of Advanced Studies for the research fellowship award (years 2018-2019). The Raman microspectrometer used is this study was found by the FEDER *(Fonds Europeen de Developpement Regional)*, grant number 2017-EX003256.

Acknowledgments: Authors thank region Centre Val de Loire, Cosmétosciences and LE STUDIUM Institute of Advanced Studies for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

Agonia, A.S., Palmeira-de-Oliveira, A., Cardoso, C., Augusto, C., Pellevoisin, C., Videau, C., Dinis-Oliveira, R.J., Palmeira-de-Oliveira, R., 2022. Reconstructed Human Epidermis: An Alternative Approach for In Vitro Bioequivalence Testing of Topical Products. Pharmaceutics 14, 1554.

Alépée, N., Grandidier, M., Cotovio, J., 2014. Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin^{TM} reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. Toxicol. In Vitro 28, 131–145.

Algiert-Zielińska, B., Batory, M., Skubalski, J., Rotsztejn, H., 2017. Evaluation of the relation between lipid coat, transepidermal water loss, and skin pH. Int. J. Dermatol. 56, 1192–1197.

Andrews, S.N., Jeong, E., Prausnitz, M.R., n.d. Transdermal Delivery of Molecules is Limited by Full Epidermis, Not Just Stratum Corneum 11.

Anissimov, Y.G., Jepps, O.G., Dancik, Y., Roberts, M.S., 2013. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 169–190.

Arce, F.J., Asano, N., See, G.L., Itakura, S., Todo, H., Sugibayashi, K., 2020. Usefulness of artificial membrane, Strat-M®, in the assessment of drug permeation from complex vehicles in finite dose conditions. Pharmaceutics 12, 173.

Assi, A., Bakar, J., Libong, D., Sarkees, E., Solgadi, A., Baillet-Guffroy, A., Michael-Jubeli, R., Tfayli, A., 2020. Comprehensive characterization and simultaneous analysis of overall lipids in reconstructed human epidermis using NPLC/HR-MSn: 1-OE (EO) Cer, a new ceramide subclass. Anal. Bioanal. Chem. 412, 777–793.

Bakar, J., Michael-Jubeli, R., El Khoury, R., Hamla, S., Assi, A., Baillet-Guffroy, A., Tfayli, A., 2021a. Assessment of the skin barrier function in the reconstructed human epidermis using a multimodal approach at molecular, tissue and functional levels. Analyst 146, 4649–4658.

Bakar, J., Michael-Jubeli, R., Tfaili, S., Assi, A., Baillet-Guffroy, A., Tfayli, A., 2021b. Biomolecular modifications during keratinocyte differentiation: Raman spectroscopy and chromatographic techniques. The Analyst 146, 2965–2973. https://doi.org/10.1039/D1AN00231G

Baroni, A., n.d. Structure and function of the epidermis related to barrier properties 6.

Bligh, E., Dyer, W., 1959. Can. J. Biochem. Physiol. Can J Biochem Physiol 37, 911–917.

Boncheva, M., de Sterke, J., Caspers, P.J., Puppels, G.J., 2009. Depth profiling of Stratum corneum hydration in vivo: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. Exp. Dermatol. 7.

Bouwstra, J.A., 2021. Human skin equivalents: Impaired barrier function in relation to the lipid and protein properties of the stratum corneum. Adv. Drug Deliv. Rev. 16.

Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Weerheim, A., Kempenaar, J., Ponec, M., 1995. Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction. J. Lipid Res. 36, 496–504.

Caspers, P.J., Bruining, H.A., Puppels, G.J., Lucassen, G.W., Carter, E.A., 2001. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. J. Invest. Dermatol. 116, 434–442.

Caspers, P.J., Lucassen, G.W., Wolthuis, R., Bruining, H.A., Puppels, G.J., n.d. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin 9.

Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J., Darvin, M.E., 2018. Age related depth profiles of human Stratum Corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo. Mech. Ageing Dev. 172, 6–12.

Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J., Darvin, M.E., 2017. In vivo confocal Raman microscopic determination of depth profiles of the stratum corneum lipid organization influenced by application of various oils. J. Dermatol. Sci. 87, 183–191.

Dancik, Y., Jepps, O.G., Roberts, M.S., n.d. Beyond Stratum Corneum 42.

Dancik, Y., Kichou, H., Eklouh-Molinier, C., Soucé, M., Munnier, E., Chourpa, I., Bonnier, F., 2020. Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation. Pharmaceutics 12, 1041. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111041

Dancik, Y., Sriram, G., Rout, B., Zou, Y., Bigliardi-Qi, M., Bigliardi, P.L., 2018. Physical and compositional analysis of differently cultured 3D human skin equivalents by confocal Raman spectroscopy. The Analyst 143, 1065–1076. https://doi.org/10.1039/C7AN01675A

Dragicevic, N., Maibach, H.I. (Eds.), 2015. Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45013-0

Dreher, F., Fouchard, F., Patouillet, C., Andrian, M., Simonnet, J.-T., Benech-Kieffer, F., 2002. Comparison of Cutaneous Bioavailability of Cosmetic Preparations Containing Caffeine or α-Tocopherol Applied on Human Skin Models or Human Skin ex vivo at Finite Doses. Skin Pharmacol. Physiol. 15, 40–58. https://doi.org/10.1159/000066680

Escobar-Chavez, J.J., Merino-Sanjuán, V., López-Cervantes, M., Urban-Morlan, Z., Piñón-Segundo, E., Quintanar-Guerrero, D., Ganem-Quintanar, A., 2008. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. J. Pharm. Pharm. Sci. 11, 104. https://doi.org/10.18433/J3201Z

European Commission. Directorate-General for Health and Consumers, 2010. Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. European Commission, BE.

Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J., LeBaron, F., 1951. Preparation of lipide extracts from brain tissue. J Biol Chem 191, 833–841.

Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226, 497–509.

Franz, T.J., 1975. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. J. Invest. Dermatol. 64, 190–195. https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12533356

Franzen, L., Anderski, J., Windbergs, M., 2015. Quantitative detection of caffeine in human skin by confocal Raman spectroscopy – A systematic in vitro validation study. Eur. J. Pharm. Biopharm. 95, 110–116. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.026

Haq, A., Goodyear, B., Ameen, D., Joshi, V., Michniak-Kohn, B., 2018. Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. Int. J. Pharm. 547, 432–437. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.012

Hughes, A.J., Tawfik, S.S., Baruah, K.P., O'Toole, E.A., O'Shaughnessy, R.F.L., 2021. Tape strips in dermatology research*. Br. J. Dermatol. 185, 26–35. https://doi.org/10.1111/bjd.19760

Jung, Y.J., Yoon, J.-H., Kang, N.G., Park, S.G., Jeong, S.H., 2012. Diffusion properties of different compounds across various synthetic membranes using Franz-type diffusion cells. J. Pharm. Investig. 42, 271–277.

Karadzovska, D., 2013. Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays. Eur. J. Pharm. Sci. 8.

Kaur, L., Singh, K., Paul, S., Singh, Sukhprit, Singh, Shashank, Jain, S.K., 2018. A mechanistic study to determine the structural similarities between artificial membrane Strat-M™ and biological membranes and its application to carry out skin permeation study of amphotericin B nanoformulations. AAPS Pharmscitech 19, 1606–1624.

Kichou, H., Dancik, Y., Eklouh-Molinier, C., Huang, N., Soucé, M., Gressin, L., Gillet, G., Chourpa, I., Munnier, E., Bonnier, F., 2022a. Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin. Int. J. Cosmet. Sci. ics.12772. https://doi.org/10.1111/ics.12772

Kichou, H., Munnier, E., Dancik, Y., Kemel, K., Byrne, H.J., Tfayli, A., Bertrand, D., Soucé, M., Chourpa, I., Bonnier, F., 2022b. Estimating the Analytical Performance of Raman

Spectroscopy for Quantification of Active Ingredients in Human Stratum Corneum. Molecules 27, 2843.

Klebeko, J., Ossowicz-Rupniewska, P., Nowak, A., Janus, E., Duchnik, W., Adamiak-Giera, U., Kucharski, Ł., Prowans, P., Petriczko, J., Czapla, N., 2021. Permeability of ibuprofen in the form of free acid and salts of l-valine alkyl esters from a hydrogel formulation through strat-m^{TM} membrane and human skin. Materials 14, 6678.

Krombholz, R., Fressle, S., Nikolić, I., Pantelić, I., Savić, S., Sakač, C., Lunter, D., n.d. ex vivo – in vivo comparison of drug penetration analysis by confocal Raman microspectroscopy and tape stripping 18.

Küchler, S., Strüver, K., Friess, W., 2013. Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 9, 1255–1263. https://doi.org/10.1517/17425255.2013.816284

Lieber, C.A., Mahadevan-Jansen, A., 2003. Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. Appl. Spectrosc. 57, 1363–1367. https://doi.org/10.1366/000370203322554518

Lin, Z., Wu, C., Shi, P., Wang, L., Gao, S., 2003. General Toxicity Prediction Approach for Mixtures Containing Polar Narcotic Chemicals. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 345–353. https://doi.org/10.1007/s00128-003-0170-6

Marks, R., Leveque, J.-L., Voegeli, R., 2002. The Essential Stratum Corneum. CRC Press. https://doi.org/10.1201/b14296

Mateus, R., Abdalghafor, H., Oliveira, G., Hadgraft, J., Lane, M.E., 2013. A new paradigm in dermatopharmacokinetics – Confocal Raman spectroscopy. Int. J. Pharm. 444, 106–108. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.01.036

Miloudi, L., Bonnier, F., Tfayli, A., Yvergnaux, F., Byrne, H.J., Chourpa, I., Munnier, E., 2018. Confocal Raman spectroscopic imaging for in vitro monitoring of active ingredient penetration and distribution in reconstructed human epidermis model. J. Biophotonics 11, e201700221. https://doi.org/10.1002/jbio.201700221

Mohammed, D., Hirata, K., Hadgraft, J., Lane, M.E., 2014. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. Eur. J. Pharm. Sci. 51, 118–122.

Monteiro-Riviere, N.A., 2010. Toxicology of the Skin. CRC Press.

Mushtaq, A., Bin Mukhtar, H., Mohd Shariff, A., 2014. FTIR Study of Enhanced Polymeric Blend Membrane with Amines. Res. J. Appl. Sci. Eng. Technol. 7, 1811–1820. https://doi.org/10.19026/rjaset.7.466

Netzlaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P.W., Schaefer, U.F., 2005. The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. Eur. J. Pharm. Biopharm. 60, 167–178. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004

OECD, 2013. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Pappinen, S., Hermansson, M., Kuntsche, J., Somerharju, P., Wertz, P., Urtti, A., Suhonen, M., 2008. Comparison of rat epidermal keratinocyte organotypic culture (ROC) with intact human skin: lipid composition and thermal phase behavior of the stratum corneum. Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr. 1778, 824–834.

Planz, V., Lehr, C.-M., Windbergs, M., 2016. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. J. Controlled Release 242, 89–104. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.002

Pudney, P.D., Mélot, M., Caspers, P.J., Van Der Pol, A., Puppels, G.J., 2007. An in vivo confocal Raman study of the delivery of trans-retinol to the skin. Appl. Spectrosc. 61, 804–811.

Rigal, A., Michael-Jubeli, R., Nkengne, A., Baillet-Guffroy, A., Bigouret, A., Tfayli, A., 2021. Raman confocal microscopy and biophysics multiparametric characterization of the skin barrier evolution with age. J. Biophotonics 14, e202100107.

Rodríguez-Pérez, M.A., Campo-Arnáiz, R.A., Aroca, R.F., de Saja, J.A., 2005. Characterisation of the matrix polymer morphology of polyolefins foams by Raman spectroscopy. Polymer 46, 12093–12102. https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.08.098

Romagnoli, C., Baldisserotto, A., Vicentini, C.B., Mares, D., Andreotti, E., Vertuani, S., Manfredini, S., 2016. Antidermatophytic action of resorcinol derivatives: ultrastructural evidence of the activity of phenylethyl resorcinol against Microsporum gypseum. Molecules 21, 1306.

Sabo, S., 2021. Poly(dimethylsiloxane): A Sustainable Human Skin Alternative for Transdermal Drug Delivery Prediction. J. Pharm. Sci. 7.

Schäfer-Korting, M., Bock, U., Diembeck, W., Düsing, H.-J., Gamer, A., Haltner-Ukomadu, E., Hoffmann, C., Kaca, M., Kamp, H., Kersen, S., Kietzmann, M., Korting, H.C., Krächter, H.-U., Lehr, C.-M., Liebsch, M., Mehling, A., Müller-Goymann, C., Netzlaff, F., Niedorf, F., Rübbelke, M.K., Schäfer, U., Schmidt, E., Schreiber, S., Spielmann, H., Vuia, A., Weimer, M., 2008. The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study. Altern. Lab. Anim. 36, 161–187. https://doi.org/10.1177/026119290803600207

Silva, N.H., Rodrigues, A.F., Almeida, I.F., Costa, P.C., Rosado, C., Neto, C.P., Silvestre, A.J., Freire, C.S., 2014. Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: in vitro dissolution and permeation studies. Carbohydr. Polym. 106, 264–269.

Simard, M., Julien, P., Fradette, J., Pouliot, R., 2019. Modulation of the lipid profile of reconstructed skin substitutes after essential fatty acid supplementation affects testosterone permeability. Cells 8, 1142.

Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J.H., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., 2007. The ECVAM international validation study on in vitro tests for acute skin irritation: report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the Skin Integrity Function Test. Altern. Lab. Anim. 35, 559–601.

Supe, S., Takudage, P., 2021. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. Skin Res. Technol. 27, 299–308. https://doi.org/10.1111/srt.12968

Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method | en | OECD [WWW Document], n.d. URL https://www.oecd.org/publications/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method-9789264242753-en.htm (accessed 3.14.22).

Tfaili, S., Gobinet, C., Josse, G., Angiboust, J.-F., Manfait, M., Piot, O., 2012. Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. The Analyst 137, 3673–3682. https://doi.org/10.1039/C2AN16292J

Tfayli, A., Guillard, E., Manfait, M., Baillet-Guffroy, A., 2012. Raman spectroscopy: feasibility of in vivo survey of stratum corneum lipids, effect of natural aging. Eur. J. Dermatol. EJD 22, 36–41.

Tfayli, A., Jamal, D., Vyumvuhore, R., Manfait, M., Baillet-Guffroy, A., 2013. Hydration effects on the barrier function of stratum corneum lipids: Raman analysis of ceramides 2, III and 5. Analyst 138, 6582–6588.

Tfayli, A., Piot, O., Draux, F., Pitre, F., Manfait, M., 2007a. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. Biopolymers 87, 261–274. https://doi.org/10.1002/bip.20832

Tfayli, A., Piot, O., Draux, F., Pitre, F., Manfait, M., 2007b. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. Biopolymers 87, 261–274. https://doi.org/10.1002/bip.20832

Thakoersing, V.S., Gooris, G.S., Mulder, A., Rietveld, M., El Ghalbzouri, A., Bouwstra, J.A., 2012. Unraveling barrier properties of three different in-house human skin equivalents. Tissue Eng. Part C Methods 18, 1–11.

Tosato, M.G., Alves, R.S., Dos Santos, E.A., Raniero, L., Menezes, P.F., Belletti, K.M., Praes, C.E.O., Martin, A.A., 2012. Raman spectroscopic investigation of the effects of cosmetic formulations on the constituents and properties of human skin. Photomed. Laser Surg. 30, 85–91.

Uchida, T., Kadhum, W.R., Kanai, S., Todo, H., Oshizaka, T., Sugibayashi, K., 2015. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M^{TM}. Eur. J. Pharm. Sci. 67, 113–118. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.11.002

Uchida, T., Yakumaru, M., Nishioka, K., Higashi, Y., Sano, T., Todo, H., Sugibayashi, K., 2016. Evaluation of a Silicone Membrane as an Alternative to Human Skin for Determining Skin Permeation Parameters of Chemical Compounds. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 64, 1338–1346. https://doi.org/10.1248/cpb.c16-00322

USEPA, 2004. In vitro dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to the occupational safety and health administration; final rule. Fed Regist 69, 22402–22441.

van Smeden, J., Hoppel, L., van der Heijden, R., Hankemeier, T., Vreeken, R.J., Bouwstra, J.A., 2011. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery [S]. J. Lipid Res. 52, 1211–1221.

World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean, 2008. List of basic sources in English for a medical faculty library 117.

Yun, Y.E., Jung, Y.J., Choi, Y.J., Choi, J.S., Cho, Y.W., 2018. Artificial skin models for animal-free testing. J. Pharm. Investig. 48, 215–223. https://doi.org/10.1007/s40005-018-0389-1

Zhang, Y., Sil, B., Kung, C., Hadgraft, J., Heinrich, M., Sinko, B., Lane, M.E., 2019. Characterization and topical delivery of phenylethyl resorcinol. Int. J. Cosmet. Sci. 41, 479–488.

Zhang, Z., 2018. Confocal Raman microspectroscopy as an alternative method to investigate the extraction of lipids from stratum corneum by emulsifiers and formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 11.

IV. Stockage des modèles de peau reconstruits : limitations, conséquences et solution

Dans le cadre de nos projets visant à explorer l'impact de la formulation sur la perméation cutanée, il est important de noter que le modèle Strat-M® n'est pas vraiment adapté. Par conséquent, nous avons décidé de nous tourner vers des modèles biologiques plus appropriés. L'utilisation de l'épiderme humain reconstruit (RHE) de chez EpiSkin® présente plusieurs avantages : il est moins coûteux que les explants de peau humaine, plus facile à manipuler et constitue un outil accepté pour le criblage des formules. Cependant, il convient de souligner que son utilisation est plus délicate en raison de sa nature vivante et de ses limitations liées au stockage. Les travaux présentés dans ce chapitre visent à répondre à une problématique concrète et technique qui explore l'impact des conditions de stockage des EpiSkin®. Ce chapitre se compose de deux études. La première est une étude publiée (#Article 4), et la deuxième (#Article 5) est à soumettre et est présentée dans ce chapitre sous la forme d'un article. Au cours des expériences menées sur le modèle EpiSkin®, qui est utilisé en tant qu'alternative aux explants de peau humaine, nous avons souvent été confrontés à des limitations liées aux délais de livraison (3 semaines) et à la courte durée de stockage après la réception (48 heures). Cette problématique a eu un impact considérable, car elle a prolongé le temps nécessaire pour mener à bien nos projets, notamment ceux visant à tester différentes conditions, telles que des études de perméation avec différentes molécules et formulations à des concentrations variées. Ces contraintes diffèrent grandement de l'utilisation des explants de peau humaine. En effet, les expérimentations in vitro sont généralement réalisées sur des échantillons d'explants de peau humaine issus de chirurgie plastique. En raison de l'accès limité en termes de quantité et de disponibilité des échantillons de peau fraiches, l'utilisation d'explants congelés est autorisée par plusieurs organismes consultatifs et réglementaires internationaux, pour tous les composés qui ne sont pas métabolisés au niveau cutané, conformément aux recommandations de l'OCDE (référence 5, #Article 5). Dans les critères de santé environnementale concernant l'absorption cutanée, le Programme international sur la sécurité chimique (IPCS) indique que la peau humaine peut être conservée à -20 °C pendant une durée maximale d'un an pour des études de perméation (référence 5, #Article 6). Le Comité scientifique de l'Union Européenne pour les produits de consommation recommande un stockage à -20 °C ou inférieur, sans spécifier de durée précise (référence 8, #Article 5). L'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA) recommande un stockage "congelé (-20 °C)" pendant une durée maximale de 3 mois, à condition de confirmer l'intégrité de la barrière cutanée des échantillons avant de réaliser

des études de perméation. Malgré l'intérêt croissant porté aux RHE, les effets des conditions de stockage sur leur fonction barrière restent relativement peu étudiés et des résultats apparemment contradictoires ont été rapportés. À cet effet, la première étude vise à examiner l'impact d'un stockage par congélation sur la fonction barrière du modèle EpiSkin®. Tandis que la deuxième étude complète la première en explorant la possibilité d'une fixation chimique de ce modèle dans le but de le stocker avant les études de perméation.

IV.1 Etude 1 : Impact de la congélation sur la fonction barrière de l'épiderme humain reconstruit Episkin®

IV.1.1 Objectif :

L'étude a pour objectif d'analyser les effets des conditions de stockage (-20 °C, -80 °C et -150 °C pendant 1 semaine et 10 semaines) sur la pénétration de la résorcine à travers les RHE en utilisant à la fois la spectroscopie Raman et un protocole de mesure des cinétiques de perméation cutanée.

IV.1.2 Développements méthodologiques :

IV.1.3 Matériels et méthodes :

Dans cette étude, nous avons examiné l'impact du stockage par congélation sur les modèles RHE d'EpiSkin®. Après la livraison, les inserts contenant les EpiSkin® ont été transférés (dans des conditions aseptiques et à température ambiante) vers une nouvelle plaque 12 puits contenant 2 mL de milieu de culture frais, fourni par le fabricant. Les échantillons ont ensuite été placés dans un incubateur (à 37°C, avec 5% de CO2) conformément aux recommandations du fabricant.

Après l'incubation, les échantillons ont été placés en congélation à des températures de -20, -80 et -150 °C pendant des périodes de 1 et 10 semaines.

Dans le cadre de cette analyse, les EpiSkin® ont été décongelés pendant toute la nuit précédant les expériences de perméation. Ensuite, les EpiSkin® ont été exposés à une solution de résorcine (5%) (m/m) pour l'étude des cinétiques de perméation sur une durée de12 heures. Les cinétiques ont ensuite été comparées à celles réalisées sur des échantillons frais. Il convient de noter que les cinétiques de perméation ont été effectuées directement dans des plaques à 12 puits afin de minimiser la manipulation des inserts contenant les EpiSkin®. Les quantités de résorcine récupérées dans les liquides récepteurs ont été mesurées par HPLC selon la méthode développée précédemment dans le chapitre III (section III.4.2).

Les échantillons d'EpiSkin ont été découpés en coupes transversales d'une épaisseur de 20 µm à l'aide d'un cryomicrotome. Ces coupes ont ensuite été positionnées sur des substrats en CaF_2 en vue de leur analyse par spectroscopie Raman.

La spectroscopie Raman a été utilisée pour étudier les effets de la température et de la durée de congélation sur la fonction barrière des échantillons d'EpiSkin®. Nous avons comparé les spectres du SC (stratum corneum) des échantillons frais à ceux des échantillons congelés.

Enfin, nous avons utilisé l'analyse en composantes principales comme un outil de discrimination. Comme évoqué dans le chapitre I (section I.3.4.1.1), l'Analyse en Composantes Principales (ACP) est une technique statistique largement utilisée pour analyser des ensembles de données multivariées. L'ACP appliquée aux données de cette étude permet de mettre en évidence les différences entre les échantillons d'EpiSkin®, ce qui nous a aidés à déterminer l'effet de la congélation sur la composition ou la structure du SC de l'EpiSkin®.

IV.1.4 Résultats :

Les résultats de cette étude mettent en évidence l'impact significatif de la congélation sur la fonction barrière de l'EpiSkin®. De plus, la température et la durée de congélation altèrent cette barrière de manière différente. L'analyse en composantes principales des spectres Raman des EpiSkin® congelés et frais montre une différenciation entre les spectres en fonction des conditions de stockage, indiquant un effet de la congélation sur la composition ou la structure des EpiSkin® congelés. Toutefois, ces différences, représentant de 7 à 13 % de la variance expliquée (le long des axes PC2), sont moins marquantes que les différences intra-groupes, qui représentent de 19 à 29 % de la variance expliquée (le long des axes PC1), au sein de chaque groupe. Cela souligne l'importance de la variabilité biologique et du chevauchement entre les groupes, probablement dû à l'utilisation de différents lots d'EpiSkin® en raison du nombre élevé de réplicas et des conditions expérimentales de cette étude. Lorsque l'ACP est appliqué sur les spectres d'EpiSkin® congelés et frais après une exposition de 12 heures à la résorcine, les résultats montrent que la quantité de résorcine (décrite à partir des intensités de la bande spécifique de la résorcine à 748 cm^{-1}) était plus élevée dans les EpiSkin® frais que dans les EpiSkin® congelés. Ces résultats sont en accord avec les données des cinétiques de perméation et les bilans de masse correspondants.

Les résultats HPLC révèlent que la quantité de résorcine retrouvée dans les liquides récepteurs des EpiSkin® congelés est de 3 à 6 fois supérieure à celle des EpiSkin® frais, ce qui est cohérent avec les quantités plus faibles dans la peau (exprimées à partir des intensités Raman de la résorcine) représentant la quantité présente dans le SC. De plus, les temps de latence des

EpiSkin® frais étaient plus élevés que ceux des EpiSkin® congelés, indiquant que l'état d'équilibre est atteint plus tardivement dans les tissus congelés. Les résultats de la spectroscopie Raman démontrent que la congélation n'affecte pas l'épaisseur du SC, excluant ainsi l'influence de cette épaisseur sur les cinétiques de perméation. Il est important de souligner que le stockage à -20 °C pendant 10 semaines à un effet notable sur la fonction barrière de l'EpiSkin®, probablement en raison de l'utilisation fréquente du congélateur à -20 °C par le personnel de laboratoire, entraînant d'importantes fluctuations de température par rapport aux autres congélateurs moins utilisés à -80 °C et -150 °C.

IV.1.5 Conclusion

L'EpiSkin® est considéré comme l'un des modèles les plus standardisés et validés en raison de sa ressemblance avec la peau humaine. Cependant, cette étude a révélé que la congélation des EpiSkin® réduit leur efficacité en tant que barrière limitant la pénétration des molécules, ce qui peut avoir des implications significatives dans les études sur la perméation cutanée de molécules d'intérêt ou dans l'optimisation de formulations de produits. Ces considérations n'ont pas été prises en compte lors de la validation des EpiSkin®.

Il est donc important de prendre en compte cet aspect lors de l'utilisation des EpiSkin® comme modèle de peau. Des recherches futures pourraient se concentrer sur des méthodes de préservation alternatives ou sur des techniques permettant de préserver au mieux la fonction barrière des EpiSkin®.

IV.1.6 #Article 4: Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation

pharmaceutics

MDPI

Article

Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation

Yuri Dancik [1,2,*,†], Hichem Kichou [2], Christophe Eklouh-Molinier [2], Martin Soucé [2], Emilie Munnier [2], Igor Chourpa [2] and Franck Bonnier [2,*]

1 Le STUDIUM Institute of Advanced Studies, 1 rue Dupanloup, 45000 Orléans, France
2 Faculté de Pharmacie, Université de Tours, 31 Avenue Monge, EA 6295 NanoMédicaments et NanoSondes, 37200 Tours, France; hichem.kichou@univ-tours.fr (H.K.); chris.eklouh@outlook.fr (C.E.-M.); martin.czok-souce@univ-tours.fr (M.S.); emilie.munnier@univ-tours.fr (E.M.); igor.chourpa@univ-tours.fr (I.C.)
* Correspondence: yuri.dancik@certara.com (Y.D.); franck.bonnier@univ-tours.fr (F.B.)
† Current affiliation: Certara UK Ltd., Simcyp Division, Level 2-Acero, 1 Concourse Way, Sheffield S1 2B1, UK.

Received: 25 September 2020; Accepted: 28 October 2020; Published: 30 October 2020



Abstract: The development and characterization of reconstructed human epidermis (RHE) is an active area of R&D. RHE can replace animal tissues in pharmaceutical, toxicological and cosmetic sciences, yielding scientific and ethical advantages. RHEs remain costly, however, due to consumables and time required for their culture and a short shelf-life. Storing, i.e., freezing RHE could help reduce costs but to date, little is known on the effects of freezing on the barrier function of RHE. We studied such effects using commercial EpiSkin™ RHE stored at −20, −80 and −150 °C for 1 and 10 weeks. We acquired intrinsic Raman spectra in the stratum corneum (SC) of the RHEs as well as spectra obtained following topical application of resorcinol in an aqueous solution. In parallel, we quantified the effects of freezing on the permeation kinetics of resorcinol from time-dependent permeation experiments. Principal component analyses discriminated the intrinsic SC spectra and the spectra of resorcinol-containing RHEs, in each case on the basis of the freezing conditions. Permeation of resorcinol through the frozen RHE increased 3- to 6-fold compared to fresh RHE, with the strongest effect obtained from freezing at −20 °C for 10 weeks. Due to the extensive optimization and standardization of EpiSkin™ RHE, the effects observed in our work may be expected to be more pronounced with other RHEs.

Keywords: reconstructed human epidermis; EpiSkin™; freezing; storage; Raman spectroscopy; skin barrier; permeation; resorcinol

1. Introduction

Human skin equivalent (HSE) models are increasingly recognized as useful substitutes for human or animal tissue-based pharmacological and toxicological assays. HSEs have the potential to yield greater scientific and economic value, while at the same time avoiding ethical issues associated with use of animal tissues [1].

Reconstructed human epidermis (RHE) models are HSEs that recapitulate the epidermis specifically, that is, the stratum corneum (SC) and the viable epidermis of human skin. They are composed of normal human-derived keratinocytes seeded on a semi-permeable polycarbonate support membrane or a collagen or fibrin matrix. After an initial culture phase under liquid-covered conditions, a switch to culture at the air-liquid interface is performed, in which the apical (skin surface) side is exposed to air while the basal side of the culture remains in contact with the culture medium [2]. The exposure

to air drives the corneocytes' differentiation and stratification, and hence the formation of a stratum corneum [3]. Total culture time is in the order of 3 weeks for a mature RHE.

A large number of RHEs are described in the scientific literature. They range from in-house models developed in academic research laboratories to commercial models optimized by industrial groups for over 20 years [1]. Common applications of RHEs mimicking normal human skin include in vitro toxicological assays, efficacy testing of topical actives and skin permeation studies [2]. Several commercially available RHEs are validated for the in vitro testing of skin irritation and corrosion and referenced in the corresponding OECD guidelines [4,5]. Although recognized as possessing a significantly more permeable barrier than excised skin models [6–8], RHEs are useful for screening compounds and/or formulations. Ranking orders of penetration have been shown to be similar between RHEs and excised skin models [9,10]. High-quality RHE models are also useful for studies requiring lower biological variability than excised skin models [8].

From a practical point of view, a drawback of RHEs is the requirement that they be used soon after fabrication. The manufacturer of the commercially available EpiSkin™ RHE recommends use of the skin model within 48 h after reception. For in-house laboratory-grown RHEs with potentially greater intra- and inter-batch variability with respect to the formation of the skin barrier, internal recommendations may be even more stringent. Given the time frame in the order of 3 weeks to synthesize RHEs and, with regard to commercial RHEs, their significant costs, this requirement may severely limit the availability of RHE replicates for the testing or screening of topical compounds and/or formulations. This stands in stark contrast to excised skin, which is often stored at −20 °C for up to 3 months prior to use in permeability experiments.

Despite the increasing prevalence of skin equivalents, the effects of storage conditions on their barrier function have not been extensively studied. Hoffman and Müller-Goymann studied the effect of nitrogen freezing on the permeation of ibuprofen from a commercial cream formulation in an in-house full-thickness skin equivalent [11]. Permeability coefficients of ibuprofen were identical in the tissue frozen in nitrogen for 24 h and 6 months and in the freshly used samples. On the other hand, Pouliot showed an approximately 10-fold increase in the cumulative amount of benzoic acid permeated though an in-house full-thickness skin equivalent stored at −20 °C for 2 months compared to fresh skin equivalents. ATR-FTIR measurements, however, revealed no effect of freezing on the SC lipid conformation of the skin equivalents [12].

Given these apparently contradictory findings, we sought to gain a deeper understanding of the effect of storage temperature and duration on the barrier function of RHEs using the commercially available EpiSkin™ RHE. We subjected the RHE to storage at −20, −80 and −150 °C for periods of 1 week and 10 weeks. Storage at −150 °C is meant to approach conditions of snap-freezing. The 10 week period was selected as a long-term storage condition similar to the 3 month period accepted for excised skin. In a first instance, we studied the intrinsic effects of these conditions on the SC of EpiSkin™ RHE samples by Raman spectroscopy (RS). RS constitutes a now widely accepted non-invasive biophotonic modality for the analysis of skin and percutaneous penetration. With respect to basic skin analysis, RS enables probing of a number of structural and compositional parameters which contribute to the barrier function of skin. These parameters include the lipid conformation and lateral packing order of SC lipids [13,14], skin hydration [15,16], differential water binding [13,17,18], SC keratin conformation, i.e., folding [19,20] and SC thickness [21]. These and other parameters have been investigated to probe differences in skin due to age, cutaneous diseases and the effects of topical formulation excipients. In addition to in vivo and ex vivo skin studies, RS is increasingly being applied to analyze reconstructed human skin equivalents and track chemicals therein [22–27].

We investigated the effects of the storage conditions on the permeation of resorcinol through the RHE using Raman spectroscopy as well as a time-dependent skin permeation protocol. Our results show that the SC barrier function is significantly altered as a function of freezing. Furthermore, different combinations of storage temperature and duration affect the barrier differently.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The permeant used was resorcinol (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Phosphate buffered saline (PBS) was obtained from Hyclone laboratories, USA. For the HPLC assays, the additional chemicals used were methanol, ethanol and phosphoric acid (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Ultra-pure water was obtained directly in the laboratory from a Millipore MilliQ system (Merck Millipore, Molsheim, France).

2.2. EpiSkin™ RHE

EpiSkin™ RHE (large model, 1.07 cm^2 diffusional surface area) replicates were purchased from EpiSkin (Lyon, France). EpiSkin™ RHE is a reconstructed epidermal membrane derived from human epidermal keratinocytes. The RHE are cultured and delivered in 12-well plates. In each well, a RHE replicate is supported by a matrix consisting of type I collagen which is coated with a thin layer of type IV collagen [28]. RHE were purchased at 13 days (J13) of maturity.

2.3. EpiSkin™ RHE Storage

Following EpiSkin's instructions, upon reception in the laboratory, the culture inserts containing the RHE replicates were removed from the 12-well plates and any remaining agarose was removed. The inserts were transferred under aseptic conditions and at room temperature to a new, sterile 12-well plate. Each well of the new plate was filled with 2 mL of fresh culture medium provided by the manufacturer. The RHE samples were then placed in an incubator (37 °C, 5% CO_2) overnight. Raman spectroscopy and the time-dependent resorcinol permeability experiment (see below) were conducted on the next day with the "fresh" RHE. The RHE replicates intended for freezing were equilibrated with 2 mL PBS placed in the receptor compartment of each culture well for 30 min, in order to remove any excess culture medium from the basal side. Following removal of the PBS, the RHE replicates were gently blotted dry and then stored at −20, −80, or −150 °C in their culture plates for either 1 or 10 weeks (Table 1). For spectroscopic characterization, n = 2 EpiSkin™ RHE replicates were used per condition. For the resorcinol time-dependent permeation experiments, n = 3 replicates were used per condition.

Table 1. Investigated storage conditions.

Condition	Temperature [°C]	Duration [Weeks]
1	−20	1
2		10
3	−80	1
4		10
5	−150	1
6		10

2.4. Non-Exposed EpiSkin™ RHE Preparation

After either 1 or 10 weeks of storage, the frozen RHE replicates were taken out of the freezers on the evening preceding the experiments and thawed overnight in a cold room (4 °C). On the next day, the RHE samples were removed from the cold room and equilibrated at room temperature for 30 min with 2 mL fresh PBS in contact with their basal side. Following equilibration, the RHE samples were visually inspected [9,10,29] for any defects. They were then removed from the culture inserts and carefully cut into 4 quarters with a scalpel. Each quarter was sectioned into 20 µm thin slices using a cryo-microtome (Leica CM 1850 UV, Nanterre, France). The slices were placed onto CaF_2 Raman-grade substrates (Crystran, Dorset, UK). These were stored at room temperature until spectroscopic analysis.

2.5. Pemeation of Resorcinol

On the day of the permeation experiment and following overnight thawing at 4 °C, the RHE samples were equilibrated at room temperature for 30 min with 2 mL fresh PBS in contact with the basal side of the RHE. Following equilibration, the integrity of the RHE was verified visually [9,10,29]. Permeation experiments were performed directly in the 12-well culture plates, without any handling of the RHE membranes, as in previously published studies with reconstructed skin equivalents [26,30]. RHE samples in their inserts were transferred to new sterile culture plates with each well containing 2 mL of fresh PBS as receptor solution. Resorcinol dissolved in PBS to a concentration of 5% *w/w* or 50 mg/mL served as the donor solution. Figure 1 schematically depicts the permeation setup in a given culture well. The donor compartment consists of the insert into which the RHE was grown by the manufacturer. A volume of 200 µL of resorcinol donor solution was applied onto each RHE. The receptor compartment consists of the culture well in which the insert rests.

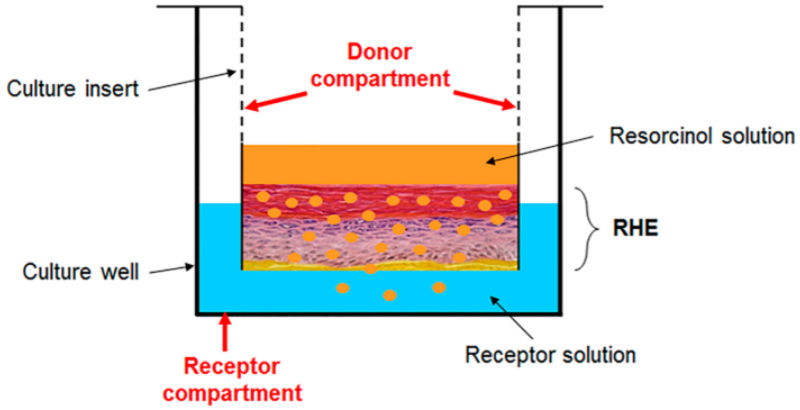


Figure 1. Schematic representation of a well, part of a 12-well culture plate, used as a diffusion cell for the exposure and permeation of resorcinol through the EpiSkin™ reconstructed human epidermis (RHE). The culture insert serves as the donor compartment, whereas the well itself serves as the receptor compartment.

2.5.1. RHE Samples for Raman Spectroscopy

The RHE samples remained exposed to the resorcinol solution for 12 h. At the end of the exposure phase, the donor solution was removed. The RHE and support membranes were carefully separated from the inserts using a punch. The donor (SC) side of the tissue and receptor side of the support membrane were gently swabbed with cotton tips to remove superficial resorcinol solution. The SC side of the tissue was then washed for 30 s with methanol to remove any resorcinol residue. The RHE tissue was then separated from the support membrane using tweezers. Each RHE sample was cut into 4 quarters with a scalpel. Each quarter was sectioned into 20 µm thin slices using a cryo-microtome (Leica CM 1850 UV, Nanterre, France) and the slices were placed onto CaF_2 Raman-grade substrates (Crystran, Dorset, UK). The substrates were stored at room temperature until spectroscopic analysis.

2.5.2. RHE Samples for Time-Dependent Permeation

At pre-determined times (every 0.5 h from 0.5 to 2.5 h and in 1 h intervals from 3 to 12 h) following application of the resorcinol solution, each RHE was transferred to a new well containing fresh receptor solution. After each transfer, the receptor solution in the used wells was collected for HPLC analysis. At the end of the permeation experiment, additional steps were performed for the determination of mass balances. The donor solutions were removed and set aside for analysis. RHE and support membranes were then carefully removed from the inserts using a punch and separated. The SC side of

the RHE and receptor side of the support membrane were gently swabbed with cotton tips which were then immersed in 2 mL methanol for extraction and HPLC analysis. The SC side of the tissue was washed for 30 s with methanol to remove any resorcinol residue. Skin and support membranes were cut into small pieces and likewise immersed in 2 mL methanol for extraction and HPLC analysis.

2.6. Confocal Raman Spectroscopy

Spectroscopic measurements were performed using an Alpha300R confocal Raman microscope (WiTec, Ulm, Germany). Prior to each set of acquisitions, the system was spectrally calibrated to the 520 cm^{-1} spectral band of silica. Line scans perpendicular to the SC surface of the RHE slices were acquired beginning 4 µm above the SC and ending below the SC in the viable epidermis, in increments of 2 µm. Spectra in the fingerprint region (400 to 1800 cm^{-1}) were recorded using the instrument's 785 nm diode laser. The laser power output was 80 mW. The grating was 300 lines/mm, the objective was 100× (NA = 0.75). Acquisition times per spectrum for the RHE unexposed to resorcinol were 3 × 10 s. For the RHE exposed to resorcinol, acquisition times were 1 x 10 s as the differences sought pertained to the intense resorcinol spectral bands.

With 2 RHE replicates per storage condition, 5 to 10 cryo-sections per RHE, and spectra acquired at depths of 2 to 10 µm in increments of 2 µm (line scans), a total of 25 to 55 spectra per storage condition were acquired and analyzed.

2.7. Analysis of Raman Spectra

For each storage condition, spectra from each depth within each cryo-section were pooled and analyzed using the software Unscrambler® v. 11.0 (CAMO Software AS, Oslo, Norway). For each set of spectra from fresh and frozen RHE, following a linear baseline correction, unit vector normalization was applied to remove multiplicative effects usually found in heterogeneous biological samples and arising from differences in the focus positions at which the spectra were acquired [31,32]. Principal components analysis (PCA) was performed on the mean-centered data using the Singular Value Decomposition (SVD) algorithm. In PCA, a data matrix **X** composed of n rows of spectra x p wavenumbers is decomposed in an unsupervised manner into the data structure $\mathbf{TP}^{\mathrm{T}}$ encompassing the major variation within the original data set, and noise or residuals **E** [33]:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^{\mathrm{T}} + \mathbf{E} \quad (1)$$

The matrix $\mathbf{TP}^{\mathrm{T}}$ represents the original data **X** dimensionally reduced along independent principal components (PCs). Each PC is a linear combination of the wavenumbers in **X**, with the first one, PC-1, being the direction of maximal variance, PC-2 being the direction of next largest variance, and so forth. **T** is the matrix of scores, i.e., the coordinates of the n spectra in the PC coordinate system. **P** is the matrix of loadings, the coefficients relating the PCs to the original data in **X**. Visualization of the data in the PC-space is typically done through score plots and loading plots, the latter corresponding to each PC. In the case of spectroscopic data, loading plots highlight the spectral bands (i.e., the wavenumbers) which drive the discrimination of data along the PCs.

Score plots visualizing the discrimination between the RHEs subjected to the various storage conditions were generated. The loadings of the two most significant principal components were studied to identify the molecular components that best explain the discrimination seen in the score plots.

2.8. HPLC Analysis

HPLC was performed to quantify the concentration of resorcinol in the time-dependent permeation and mass balance samples. The HPLC system Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Voisins-le-Bretonneux, France) consisted of a UHPLC pump; an auto-injector; a diode array detector and an InterchimKromasil C18 column (4.6 × 150 mm, 5 µm). The detection wavelength for resorcinol was 275 nm. The temperature of the column and the auto-injector was set to 25 and 15 °C, respectively.

The mobile phase used in isocratic mode was methanol 25%: water 75% (*v*/*v*) + 10 mM of phosphoric acid. A flow rate of 1 mL/min was used. The injection volume was 10 µL. The duration of the analysis of each sample was 6 min. The software used was Chromeleon 7.1 (Thermo Fisher Scientific, chromatography data system software, Voisins-le-Bretonneux, France).

HPLC analyses covering all freezing conditions were performed on four different days. On each day, standard calibration curves were prepared prior to each analysis. Standards were obtained in triplicate by dissolving resorcinol in PBS at concentrations of 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/mL. The standard curve slopes and intercepts averaged over the four days were 0.20 ± 0.09 and 157 ± 6, respectively. LODs and LOQs were calculated from $\mathrm{LOD} = \mathrm{Intercept} + 3.3{\cdot}\mathrm{SD}_{\mathrm{Intercept}}$ and $\mathrm{LOQ} = \mathrm{Intercept} + 10{\cdot}\mathrm{SD}_{\mathrm{Intercept}}$. Over the four days of analysis, LODs and LOQs averaged $4{\cdot}10^{-3} \pm 4{\cdot}10^{-5}$ and $1.1{\cdot}10^{-3} \pm 1{\cdot}10^{-4}$ mg/mL, respectively.

2.9. Analysis of Time-Dependent Permeation Data

Fick's 2nd law of diffusion relates the permeant concentration in the RHE, C_{RHE}, to depth x in the RHE and time after application of the permeant via the permeant diffusion coefficient D_{RHE} [34]:

$$\frac{\partial C_{\mathrm{RHE}}(x,t)}{\partial t} = D_{\mathrm{RHE}} \frac{\partial^2 C_{\mathrm{RHE}}(x,t)}{\partial x^2} \tag{2}$$

The initial condition (Equation (3)) expressing a lack of permeant in the RHE and boundary conditions expressing a constant donor concentration in equilibrium with the concentration in the RHE (Equation (4)) and receptor sink conditions (Equation (5)) are

$$C_{\mathrm{RHE}}(x, t=0) = 0 \tag{3}$$

$$C_{\mathrm{RHE}}(x=0, t) = K_{\mathrm{RHE/D}} C_{\mathrm{D}} \tag{4}$$

$$C_{\mathrm{RHE}}(x=h_{\mathrm{RHE}}, t) = 0 \tag{5}$$

The parameter h_{RHE} designates the RHE thickness and $K_{\mathrm{RHE/D}}$ the RHE/donor equilibrium partition coefficient and C_{D} the donor concentration. Application of Equations (2)–(5) to the analysis of the permeation data assumes the RHE to be a homogeneous membrane. For the purposes of data analysis, the solution to the boundary value problem described by Equations (2)–(5) is often expressed as the cumulative amount of permeant in the receptor, Q_{RHE}, normalized by the diffusion area A:

$$\frac{Q_{\mathrm{RHE}}(t)}{A} = K_{\mathrm{RHE/D}} C_{\mathrm{D}} h_{\mathrm{RHE}} \left[\frac{t}{h_{\mathrm{RHE}}^2 / D_{\mathrm{RHE}}} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} exp\left(- \frac{t}{h_{\mathrm{RHE}}^2 / D_{\mathrm{RHE}}} \pi^2 n^2 \right) \right] \tag{6}$$

The cumulative amount at steady-state is given by the linear part of Equation (6):

$$\frac{Q_{\mathrm{RHE}}(t)}{A} = \frac{K_{\mathrm{RHE/D}} C_{\mathrm{D}} D_{\mathrm{RHE}}}{h_{\mathrm{RHE}}} \left(t - \frac{h_{\mathrm{RHE}}^2}{6 D_{\mathrm{RHE}}} \right) \tag{7}$$

or, in terms of the steady-state flux J_{SS} and the lag time $t_{\mathrm{lag}} = h_{\mathrm{SC}}^2 / 6 D_{\mathrm{SC}}$:

$$\frac{Q_{\mathrm{RHE}}(t)}{A} = J_{\mathrm{SS}} \left(t - t_{\mathrm{lag}} \right) \tag{8}$$

The receptor solution concentrations obtained from the permeation experiments were converted to cumulative amounts using the formula

$$\frac{Q_{\mathrm{RHE}}(t)}{A} = \frac{V_{\mathrm{R}}}{A} \left(C_{\mathrm{t}} + \sum_{\mathrm{i}=0}^{\mathrm{t}-1} C_{\mathrm{i}} \right) \tag{9}$$

where V_R designates the receptor volume in the culture wells, C_t is the resorcinol concentration at each sampling time t, and C_i is the resorcinol concentration at prior samplings times i. Regression of Equation (8) against the linear part of the experimental cumulative amount time profiles obtained from Equation (9) yields J_{SS}, the lag time t_{lag} and the permeability coefficient $K_P = J_{SS}/C_D$.

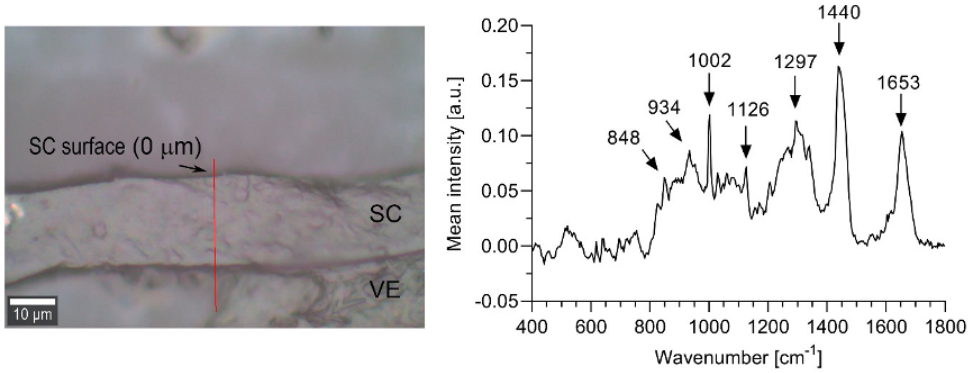
Kinetic and mass balance results were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) for multiple groups. Tukey's test was performed as a follow-up test to the multiple comparisons. The significance level was set at $p = 0.05$. Statistical analyses were conducted in GraphPad Prism v. 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Intrinsic Effects of Freezing on EpiSkin™ RHE

The effects of freezing temperature and duration on the SC of EpiSkin™ RHE were investigated by Raman spectroscopy by comparing spectra from the interior of the SC of fresh, non-frozen RHE to those of RHE stored under the conditions summarized in Table 1.

Figure 2a shows the well-defined SC and viable epidermis of a representative cryo-section of fresh EpiSkin™ RHE. A representative mean fingerprint region spectrum acquired at a depth of 2 µm inside the SC is shown in Figure 2b. The most intense peaks across the investigated depth (2 to 10 µm), occurring around 849, 933, 1002, 1126, 1297, 1440 and 1653 cm^{-1}, correspond to the major lipidic and protein components of human SC (Table 2). The spectra of fresh EpiSkin™ RHE are also in good qualitative agreement with Tfayli et al.'s data of EpiSkin™ RHE [22].



(**a**) (**b**)

Figure 2. (**a**) White light image of a representative section of EpiSkin™ RHE showing the stratum corneum (SC) and part of the viable epidermis (VE). Spectra were acquired in increments of 2 µm along the red line. (**b**) Representative spectrum of SC showing major peaks assigned to SC lipids and proteins (see Table 2).

The SC thickness at the locations at which the spectra were acquired was estimated to range from 16.6 ± 1.42 µm in the non-frozen EpiSkin™ RHE to 19.4 ± 2.08 µm in the EpiSkin™ RHE frozen at −80 °C for 10 weeks (Figure 3), with no statistical significance between the values. For reference, in vivo SC thicknesses measured by 2-photon microscopy in 20 healthy volunteers have been reported as 11.99 ± 2.13 µm in the abdomen, 12.55 ± 1.55 and 13.61 ± 1.43 µm in the volar and dorsal forearm, respectively, and 14.16 ± 1.9 µm in the sural region [35]. The SC thickness of excised human abdominal skin, frequently used in ex vivo permeation studies, has been determined to measure 13.2 ± 3.2 µm from histological sections [36].

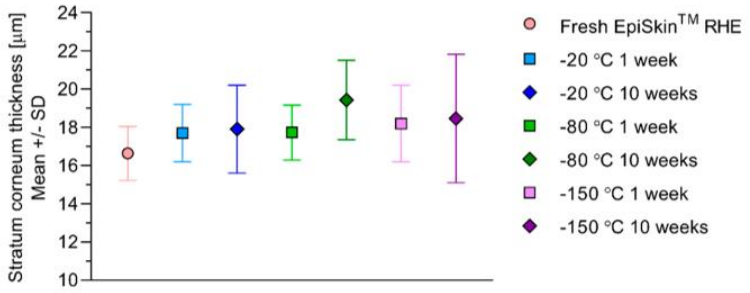


Figure 3. Stratum corneum thicknesses of fresh and frozen EpiSkin™ RHE estimated from the locations in the cryo-sections at which Raman spectra were acquired.

Table 2. Assignments to selected Raman peaks in the stratum corneum of EpiSkin™ reconstructed human epidermis, based on [22] (ρ: rocking, ν: stretching, δ: bending).

Wavenumber [cm^{-1}]	Vibrations and Assigned Components
849	Tyrosine Fermi doublet (ring)
933	ρ(CH_3) terminal; ν(C–C): protein α helix (secondary structure); Phospholipids
1002	Phenylalanine symmetric ring breathing *
1126	Lipids hydrocarbon chains, trans conformation, ceramides
1297	Amide III; CH_2 phospholipids
1440	δ(C–H): proteins and lipids
1653	Amide I

* Urea, a component of the skin natural moisturizing factor (NMF), displays a Raman band at.1003 to 1010 cm^{-1}. However urea is likely of greater preponderance than phenylalanine only in cases of urea-containing products applied to the skin surface [37,38].

We employed PCA to explore whether the investigated storage conditions altered the composition or structure of the RHE's SC. Figure 4 shows the scores and loading plots resulting from PCAs of fresh, non-frozen RHE vs. RHE stored for 1 week and 10 weeks at −20 (Figure 4a,b), −80 (Figure 4c,d) and −150 °C (Figure 4e,f). For each storage condition, these data encompass the totality of the spectra acquired at depths of 2 to 10 µm within the SC of the RHEs. The score plot of the fresh RHE vs. RHE stored at −20 °C show that discrimination based on the storage conditions occurs along the PC-2 axis. This discrimination accounts for 12% of the total explained variance. The loading corresponding to the PC-2 shows that the main peaks driving the discrimination between the fresh and −20 °C RHE spectra are the 1133 and 1435–1473 cm^{-1} peaks corresponding to proteins and lipids within the SC. Comparison of the fresh RHE spectra with that of RHEs stored at −80 °C yields inter-group discrimination along PC-2, accounting for 11% of the total variance (for visualization purposes, PC-2 is plotted against PC-3 in Figure 4c). The loading corresponding to PC-2 indicates that the discrimination is due to a preponderance of lipids and proteins in the fresh RHE compared to the ones frozen at −80 °C. The PCA of the fresh RHE vs. RHE stored at −150 °C resembles the PCA of fresh vs. −20 °C-stored RHE. Inter-group discrimination along PC-2 accounts for 13% of the total variance. The loading for PC-2 shows that this discrimination is driven by a preponderance of the non-specific protein and lipid peak around 1440 cm^{-1}.

From each of the PCAs, it is evident that the fresh RHEs are separate from the frozen ones on the basis of non-specific lipid and protein contents. Aside from the inter-group variance, there is significant intra-group biological variance, seen in the variances associated with PC-1. These variances range from 19% for the fresh RHE vs. the RHE stored at −80 °C to 28 °C and 29% in the comparison of fresh RHE vs. RHE stored at −20 and −150 °C, respectively.

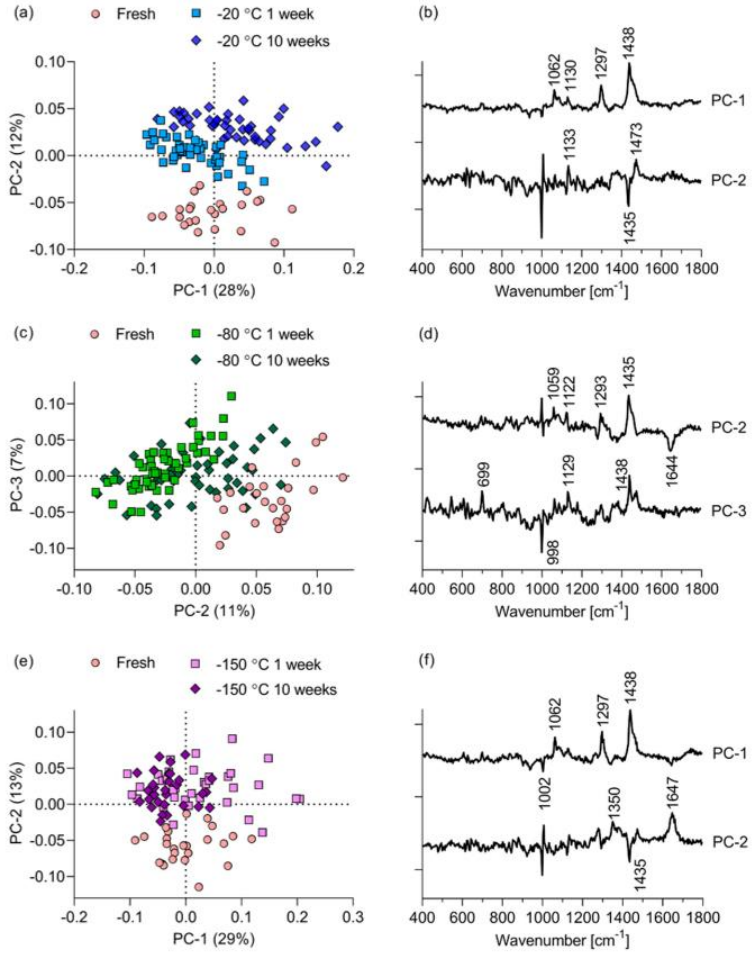
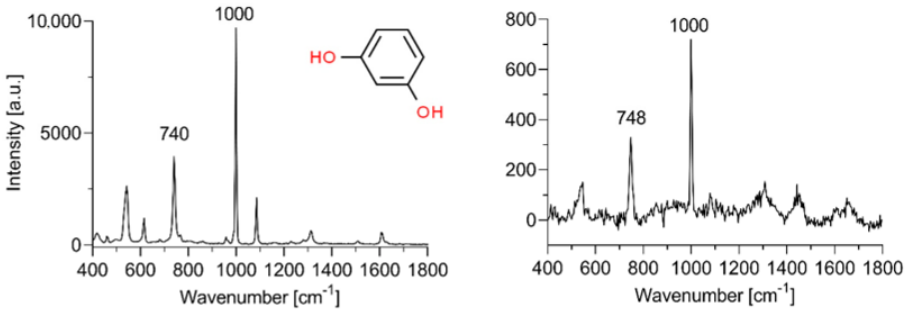


Figure 4. Score and loading plots for the first 2 components obtained from the PCA of fresh EpiSkin™ RHE vs. the RHE stored for 1 and 10 weeks at (**a**,**b**) −20, (**c**,**d**) −80, and (**e**,**f**) −150 °C.

3.2. *Effects of Freezing on Resorcinol Permeation through EpiSkin™ RHE*

To further probe the effect of freezing on the barrier function of EpiSkin™ RHE, we performed PCA on the spectra of EpiSkin™ RHE exposed to a 5% *w*/*w* aqueous PBS solution of resorcinol for 12 h. Resorcinol in aqueous solution displays particularly intense bands centered at 740 and 1000 cm^{-1}, which are associated with the molecule's aromatic ring vibrations (Figure 5a). A representative spectrum of EpiSkin™ RHE exposed to the same resorcinol solution for 12 h is shown in Figure 5b. The 740 cm^{-1} peak of resorcinol in powder form is consistently shifted to 748 cm^{-1} in the RHE tissue.



(**a**) (**b**)

Figure 5. Representative spectra of (**a**) resorcinol in PBS solution (5% *w*/*w*) and (**b**) the stratum corneum of EpiSkin™ RHE following a 12-h topical application of resorcinol in PBS solution (5% *w*/*w*).

For each EpiSkin™ RHE, the Raman line scans yielded resorcinol intensities that were invariant with depth (data not shown). This is attributable to the long exposure (12 h) of the RHEs to the resorcinol solution. As for the non-exposed RHE (Figure 4), PCA was used to explore the effect of storage on the absorption and penetration of resorcinol. For each RHE, the totality of the spectra acquired at depths of 2 to 10 µm within the SC were pooled to perform PCA. Figure 6 shows the scores and loading plots resulting from PCAs of the resorcinol-exposed fresh RHE vs. RHE stored for 1 week and 10 weeks at −20 (Figure 6a,b), −80 (Figure 6c,d), and −150 °C (Figure 6e,f). On account of the overall high amounts of resorcinol contained in the tissues, discrimination between the fresh and frozen RHE along the PC-1 axes occurs due to the relative resorcinol intensities which dominate differences in the intrinsic tissue spectra. The corresponding PC-1 loadings show higher resorcinol intensities, demonstrated by the peaks at 748 and 1000 cm^{-1}, within the fresh RHE tissues compared to the frozen RHE tissues, driving the discrimination. While the 1000 cm^{-1} peak may partially be due to differences in the phenylalanine intensities in fresh vs. frozen RHE, it is likely mostly due to resorcinol, since phenylalanine was is not a major discriminant of fresh vs. frozen non-exposed RHE samples (Figure 4b,d,f). Differences in resorcinol intensities account for the greatest proportion of explained variance (44 to 52%) and are seen along the PC-1 axes. The less significant variance along PC-2 is due to intra-group differences in resorcinol amount and intrinsic tissue differences.

The time-dependent cumulative amount profiles of resorcinol permeated through the EpiSkin™ RHE tissues are summarized in Figure 7. All storage conditions yield a statistically greater cumulative amount of resorcinol permeated through the RHE into the receptor solution, compared to fresh RHE from 5 h after resorcinol application onward. After 12 h the cumulative amount of resorcinol in the RHE stored at −20 °C for 1 week, −80 °C for 1 and 10 weeks and −150 °C for 1 and 10 weeks ranges from 1.2 ± 0.15 to 1.6 ± 0.15 mg/cm^2. Within this group, the differences in the cumulative amount at 12 h are statistically non-significant except between the −20 °C 1 week and −80 °C 10 weeks conditions ($p = 0.0147$). On average, the cumulative amounts for the −20 °C 1 week, −80 °C (1 and 10 weeks) and −150 °C (1 and 10 weeks) conditions are three-fold greater than the cumulative amount in fresh RHE of 0.5 ± 0.11 mg/cm^2 (significantly different with $p \leq 0.0001$). The strongest effect on the permeation of resorcinol is obtained from the −20 °C 10 weeks condition. The cumulative amount for this storage conditions at 12 h is 2.9 ± 0.090 mg/cm^2, six-fold greater than the fresh RHE value (significantly different with $p \leq 0.0001$).

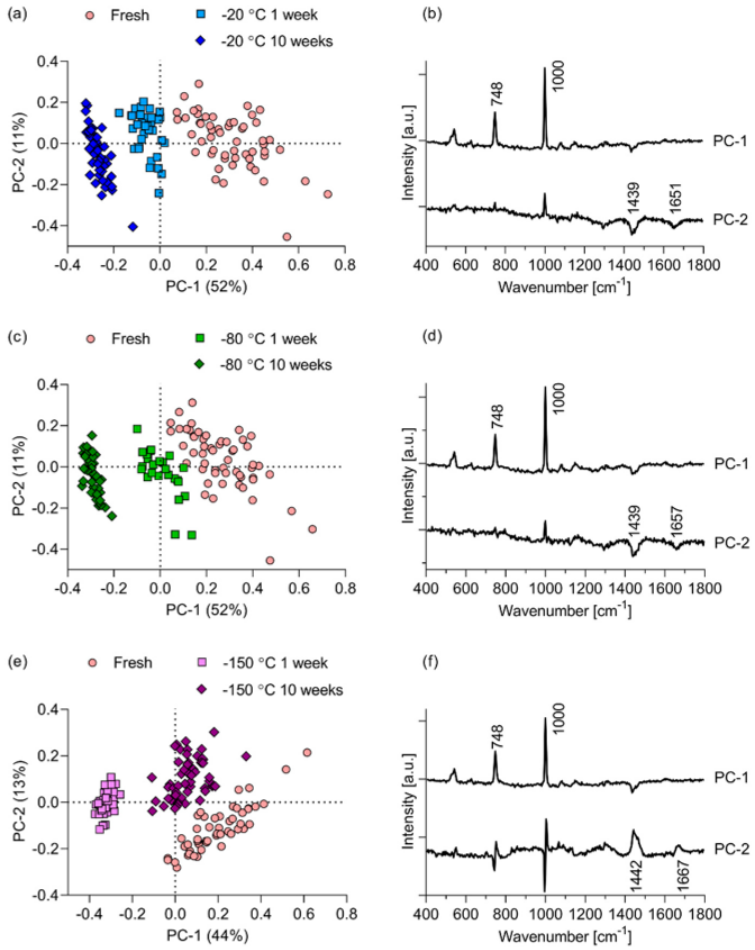


Figure 6. Score and loading plots for the first 2 components obtained from the PCA of resorcinol-exposed fresh EpiSkin™ RHE vs. the RHE stored for 1 and 10 weeks at (**a**,**b**) −20, (**c**,**d**) −80, and (**e**,**f**) −150 °C.

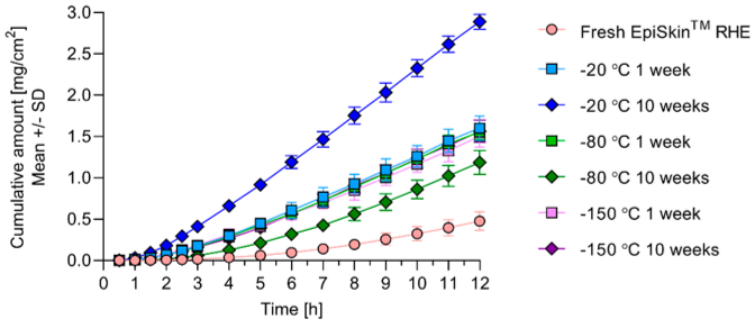


Figure 7. Cumulative amounts of resorcinol permeated through fresh and frozen EpiSkin™ RHE.

Table 3 shows the steady-state flux, permeability coefficient and lag time obtained from fitting Equation (8) to the cumulative amount data. Resorcinol fluxes through RHE stored at −20 °C for 1 week, −80 °C for 1 and 10 weeks and −150 °C for 1 and 10 weeks average 0.17 mg/(cm^2 h), 2.3 times greater

than the mean flux through fresh RHE (significantly different with $p \leq 0.0001$). The −20 °C 10 weeks storage conditions yields a mean flux of 0.29 mg/(cm^2 h), about four times greater than the flux through fresh RHE (significantly different with $p \leq 0.0001$). The lag times to steady-state are consistently smaller in the frozen RHEs compared to the fresh RHE. The mean lag times of the RHE stored at −20 °C for 1 week, −80 °C for 1 week and −150 °C for 1 and 10 weeks range from 2.6 ± 0.48 to 3.0 ± 0.54 h (not statistically different). They are 1.9 to 2.2 times shorter than that in fresh RHE (significantly different with $p \leq 0.0001$). The mean lag time in the tissue stored at −80 °C for 10 weeks is about 20% smaller than in fresh RHE lag time (not statistically different). The −80 °C 10 weeks lag time is also significantly larger than the lag times of the −150 °C 1 week and 10 weeks conditions ($p = 0.0095$ and 0.0018, respectively) and the −20 °C and −80 °C 1 week conditions ($p = 0.0017$ and 0.0031, respectively). The lag time for the −20 °C 10 weeks storage condition is 1.8 ± 0.62 h, over three times shorter than in fresh RHE (significantly different with $p < 0.0001$). It is also statistically different from the lag time in the −80 °C 10 weeks condition ($p < 0.0001$).

Table 3. Steady-state fluxes, permeability coefficients and lag times of resorcinol permeated through fresh and frozen EpiSkin™ RHE (mean ± SD).

	Fresh	−20 °C		−80 °C		−150 °C	
		1 wk.	10 wks.	1 wk.	10 wks.	1 wk.	10 wks.
J_{SS} [mg/(cm^2 h)]	0.073 ± 0.014	0.17 ± 0.0061	0.29 ± 0.0088	0.17 ± 0.0040	0.16 ± 0.015	0.17 ± 0.020	0.17 ± 0.015
$K_P \times 10^3$ [cm/h]	1.5 ± 0.022	3.4 ± 0.12	5.7 ± 0.18	3.4 ± 0.081	3.2 ± 0.31	3.3 ± 0.40	3.3 ± 0.31
t_{lag} [h]	5.6 ± 0.32	2.6 ± 0.56	1.8 ± 0.62	2.7 ± 0.43	4.6 ± 0.20	3.0 ± 0.54	2.6 ± 0.48

Donor solution depletion over the course of the permeation experiments was negligible, as verified during the analysis of the mass balance samples. Table 4 shows the mass balances obtained at the end of the time-dependent permeation experiment. Overall resorcinol recovery ranges from 90 ± 0.4 to 99 ± 4.6% of the applied dose, in agreement with the OECD guideline for in vitro skin absorption experiments [39]. The percentage of applied resorcinol recovered in the fresh RHE tissue and support membrane samples is 1.4 to 3.5 times greater than the percentages recovered in the frozen tissues and membranes (in all cases statistically different with $p \leq 0.0007$).

Table 4. Mass balances expressed as percentages of applied resorcinol (mean ± SD).

Compartment	Fresh	−20 °C		−80 °C		−150 °C	
		1 wk.	10 wks.	1 wk.	10 wks.	1 wk.	10 wks.
Donor solution	83 ± 3.3	71 ± 4.6	63 ± 3.2	73 ± 5.8	80 ± 3.2	75 ± 6.3	69 ± 2.1
Skin swabs	0.89 ± 0.61	0.14 ± 0.12	2.3 ± 1.4	0.094 ± 0.016	0.42 ± 0.73	0.12 ± 0.20	0.0 ± 0.0
Skin and support membrane	9.7 ± 1.0	7.0 ± 1.3	2.8 ± 0.17	5.3 ± 0.11	3.4 ± 0.17	6.5 ± 0.45	4.1 ± 0.50
Receptor solution (permeated)	5.1 ± 1.2	17 ± 1.6	31 ± 0.97	17 ± 0.92	13 ± 1.6	16 ± 1.5	17 ± 1.5
Total recovery	98 ± 1.2	95 ± 2.0	99 ± 4.6	96 ± 5.0	96 ± 2.0	97 ± 4.4	90 ± 0.40

4. Discussion

Skin models constitute increasingly attractive tools for screening and pre-clinical work in pharmaceutical, toxicological and cosmetic sciences. They have the potential to replace animal tissues, yielding greater scientific value as well as avoiding ethical issues associated with the use of animal tissues. They may also help overcome the problem of scarcity of excised human skin, particularly diseased excised skin [40].

Broadly speaking, skin equivalent models can be divided into polymeric or artificial and biological or reconstructed skin models (see [40–42] for comprehensive reviews). Artificial skin models constitute the most economical option for drug and formulation screening and to study drug–formulation interactions, both in terms of upfront cost and ease of long-term storage. However, their biological relevance and their range of applications are limited. Reconstructed skin models encompass not only a variety of healthy human skin models, but also models of dermatological diseases in which the skin's barrier function is impacted. Reconstructed skin models have been shown in some studies to yield lower intra-individual variability in permeability coefficients than excised human skin, an important consideration when the focus is on drug and/or formulation optimization [41–43].

Reconstructed skin models come at a significant cost, all the more given their short shelf-lives. It is therefore natural to investigate the effect of storage, and in particular freezing, on the physical barrier function of reconstructed human skin models. We selected EpiSkin™ RHE as a robustly optimized and widely used commercial RHE. We used Raman spectroscopy and a classical time-dependent skin permeation experiment to assess the effect of freezing temperature and duration on the barrier function of the RHE. As a permeant we used resorcinol, a common ingredient in cosmetic products. In hair dyes it is used as a coupler to primary intermediates such as *p*-phenylenediamine to produce the final hair color [44,45], often in concentrations of 1 to 5% [46]. In skin care, it is an ingredient of anti-acne formulations and peels [47]. From a physico-chemical point of view, with a molecular weight of 110 g/mol and octanol-water partition coefficient (log K_{ow}) of 0.80, it is a suitable model for small, hydrophilic to moderately lipophilic molecules likely to permeate the epidermis from an aqueous solution [48]. The concentration of 5% *w*/*w* employed herein is an infinite dose yielding steady-state transport over the course of the 12 h permeation experiments and facilitates identification of resorcinol's Raman peaks among the intrinsic RHE peaks (Figure 5b).

Our results indicate that storage has a significant effect on the barrier function of EpiSkin^{TM} RHE. Moreover, storage temperature and duration can alter the barrier differently. PCA of the intrinsic Raman spectra discriminate the data on the basis of storage condition (Figure 4). However, these differences, accounting for 7 to 13% of the explained variance (variations along PC-2 axes), are less important than intra-group differences accounting for 19 to 29% of the explained variance (variations along PC-1 axes). Within each group, biological variability and overlap between the groups are large.

Inter-group discrimination on the basis of storage condition prevails when the analysis focuses on resorcinol intensity in exposed RHE (Figure 6). These PCA consistently reveal greater intensities in the fresh RHEs compared to the frozen RHEs. Effects of storage conditions on resorcinol intensities and on the SC barrier function of the RHE are corroborated by the time-dependent permeation data (Figure 7) and associated mass balances (Table 4). The three- to six-fold increase in the cumulative amount of resorcinol permeated through the frozen RHEs compared to the fresh RHE is in qualitative agreement with the smaller Raman intensities of resorcinol measured, i.e., retained, within the SC of the frozen RHEs. The significantly longer mean lag time obtained from the fresh RHE cumulative amount profiles indicate that steady state is achieved later than in the frozen tissues. The significantly greater percentage of applied resorcinol recovered in the fresh RHE tissue and support membrane at the end of the time-dependent permeation experiment corroborate the higher resorcinol intensities revealed by the PCAs. The effects of freezing on the thickness of SC, which might have influenced the relative permeation kinetics of resorcinol upon application, may be ruled out, since freezing did not intrinsically modify the SC thicknesses (Figure 3).

Of note is the pronounced effect of storage at −20 °C for 10 weeks on the RHE's barrier function. A major difference between the freezers is the greater daily frequency with which the −20 °C freezer is accessed by laboratory personnel. Temperature fluctuations within any given week are necessarily greater in the −20 °C freezer. Their cumulative effect over 10 weeks of storage may abrogate the RHE barrier function to a greater extent than short-term storage at −20 °C, as well as compared to storage in the −80 and −150 °C freezers, which are not accessed nearly as frequently. To ascertain this,

however, precise recording of storage temperature fluctuations and investigation of any effects on the SC structure are required.

The majority of published studies on the effects of freezing on the barrier function of skin models focus on excised human and animal skin. Most studies on excised human skin have shown no effect of freezing on the permeation kinetics of topically applied compounds [49–52]. Among those that observed an effect, Swarbrick et al. showed an average 1.6-fold increase in the cumulative amount of chromone acid permeated through excised human epidermis stored at −17 °C for 2.5 days compared to fresh epidermis [53]. Kemppainen et al. found that storage of full-thickness human thigh skin at −60 °C for 10 days yielded a 2.4-fold higher flux of trichothecene mycotoxin compared to fresh skin [54]. Nielsen et al. showed that storing excised abdominal skin at −80 °C for 3 weeks increased the permeability coefficient of caffeine up to four-fold. Storage at −20 °C for the same period of time did not significantly modify the permeation kinetics of caffeine. Using two-photon fluorescence imaging of cells in the SC, they showed that freezing at both temperatures induced a reduction in auto-fluorescence, structural alterations and tissue swelling (increased cell size and layer thickness). The most severe damage was observed in the tissues stored at −80 °C [55].

Contrary to human skin, the barrier of excised animal skin has mostly been found to be significantly affected by freezing (studies reviewed in [49] as well as [56–58]). Sintov and coworkers compared the effect of the storage of rabbit ear, pig ear and rat skin at −20 °C for up to 2 weeks on the permeation of caffeine [58–60]. They observed an order-of-magnitude increase in the permeability of caffeine in frozen vs. fresh pig ear skin. On the other hand, no significant change with rabbit ear skin and a small decrease in permeability through frozen rat skin were reported. The authors attributed these differences to the varying ceramide:cholesterol ratios in the three animal models. They proposed that the higher ceramide:cholesterol ratio of porcine skin, and hence its greater proportion of polar lipids, was more prone to disruption due to the formation of ice crystalline structures within the aqueous phases of the SC lipid bilayer. A similar mechanism was put forward by Abdayem et al., who reported a four-fold increase in the permeability of caffeine in porcine skin stored at −20 °C for 24 h compared to fresh skin [57]. Electron microscopy revealed the presence of ice crystals in the hydrophilic phases of the SC lipid bilayer, as the keratin phase of corneocytes and, to a lesser extent, in corneodesmosomes. Using excised rat skin, Bajza et al. recently suggested that freezing could impact the penetration of compounds whose cutaneous transport is mediated by the P-glycoprotein transporter [61].

With regards to reconstructed skin models, Ponec et al. showed that EpiSkin™ RHE models cultured for 13 days contained a ceramide: cholesterol ratio of 1.1 compared to 0.68 for native human skin [62]. Based on Sintov and coworkers' studies, the preponderance of ceramides in EpiSkin™ RHE plausibly explains the disruption of the barrier function upon freezing. A potential implication is that, similarly to various animal models, storage at a given temperature for a given period of time could weaken the SC barrier of different reconstructed skin models to different extents. Ponec et al.'s data, for instance, indicate a small but significant difference between the ceramide: cholesterol ratios of EpiSkin™ RHE cultured for 13 vs. 20 days ($p < 0.05$) [62]. The difference may be large enough to yield significant variations in SC barrier disruption due to freezing.

Tight junction proteins, located just below the SC in human skin, are of primary importance for the establishment and maintenance of the skin's physical barrier function [63]. Furthermore, their localization is similar in well-formed reconstructed skin models and human skin [64]. Thus, studying the potential impact of freezing on the tight junction functionality of RHEs, as performed by Adbayem et al. with excised porcine skin [57], would help to better understand the effects of freezing on the barrier function of RHEs. Many other features of reconstructed skin equivalents, such as the presence of a biological dermal layer, or additives to the culture medium used to obtain disease phenotypes, alter the molecular composition of the SC and may impact the effect of storage on the model's SC barrier function.

In addition to SC composition, the observed effects of freezing studied via percutaneous permeation depend on the physico-chemical nature of the permeant and the vehicle of interest. Since mainly the

aqueous phases of the lipid bilayer are affected by the storage process, chemicals that preferentially diffuse via aqueous pathways will experience increased transport through frozen tissue compared to lipophilic compounds [59]. Moreover, the permeation of a lipophilic permeant applied in an aqueous vehicle will be enhanced in frozen skin compared to fresh skin, whereas freezing does not affect the permeant's permeability when it is applied in a micro-emulsion [60]. Micro-emulsions enhance partitioning into both the aqueous and lipid phases of the SC, hence circumventing the effect of freezing on the aqueous permeation pathways. These considerations may explain our results and Pouliot's, who showed an approximately 10-fold increase in benzoic acid (log K_{ow} = 1.9) permeation though an in-house full-thickness skin equivalent stored at −20 °C for 2 months compared to fresh samples [12], being contrary to Hoffman and Müller-Goymann's results, who reported no effect of freezing in nitrogen (24 h and 6 months) on the permeation of ibuprofen (log K_{ow} = 3.8) from a commercial cream through a full-thickness skin equivalent [11]. Hence, to fully describe effects of storage conditions on a given reconstructed skin model, a study covering a range of permeant hydro-/lipophilicities and vehicles is necessary.

5. Conclusions

The present study establishes that freezing alters the SC barrier function of the reconstructed human epidermis model EpiSkin™ RHE. Cumulative amounts of an infinite dose of resorcinol applied in aqueous solution are three- to six-fold lower in fresh EpiSkin™ RHE than in the same tissue stored at −20, −80 and −150 °C for 1 and 10 weeks. Among those conditions, storage at −20 °C for 10 weeks produces the most damage to the RHE's SC barrier function. As one of the most standardized and validated models available, it is reasonable to expect the EpiSkin™ RHE to be among the most resistant to external insults. We therefore expect the magnitude of barrier disruption measured herein to represent a lower limit, in particular when compared to most RHEs cultured in-house, for topical compounds exhibiting similar permeation kinetics to resorcinol applied in aqueous solution. Measured effects of freezing on the barrier function of reconstructed skin models depend on the composition of the SC, on the physico-chemistry of permeants of interest, and on the effect of the vehicles or formulations under consideration.

Author Contributions: Conceptualization, Y.D. and F.B.; methodology, Y.D. and F.B.; software, Y.D., H.K., C.E.-M. and M.S.; validation, Y.D., H.K., C.E.-M., M.S. and F.B.; formal analysis, Y.D., H.K. and C.E.-M.; investigation, Y.D., H.K. and C.E.-M.; writing—original draft preparation, Y.D.; writing—review and editing, Y.D., H.K., M.S., E.M. and F.B.; supervision, Y.D., F.B.; project administration, Y.D.; resources, E.M., I.C. and F.B.; funding acquisition, E.M., I.C. and F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Le STUDIUM Institute of Advanced Studies and in part by the Région Centre-Val de Loire (MISTIC project ARD 2020 Cosmétosciences 2017-00118114) and the European Regional Development Fund.

Acknowledgments: The authors thank Françoise Debierre-Grockiego and the team "Immunologie Parasitaire et Vaccinologie, Biothérapies Anti-Infectieuses", Université de Tours-INRAE, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, for access to the cryo-microtome. Y.D. acknowledges the research fellowship awarded by Le STUDIUM Institute of Advanced Studies and Kamilia Kemel for assisting with experiments and for fruitful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. Yuri Dancik is a Senior Research Scientist at Certara UK Ltd. The company had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Gordon, S.; Daneshian, M.; Bouwstra, J.; Caloni, F.; Constant, S.; Davies, D.E.; Dandekar, G.; Guzman, C.A.; Fabian, E.; Haltner, E.; et al. Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology. *ALTEX* **2015**, *32*, 327–378. [CrossRef] [PubMed]
2. Planz, V.; Lehr, C.M.; Windbergs, M. In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. *J. Control. Release* **2016**, *242*, 89–104. [CrossRef] [PubMed]

3. Huet, F.; Severino-Freire, M.; Chéret, J.; Gouin, O.; Praneuf, J.; Pierre, O.; Misery, L.; Le Gall-Ianotto, C. Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *89*, 213–218. [CrossRef] [PubMed]
4. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method*; OECD Publishing: Paris, France, 2019.
5. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*; OECD Publishing: Paris, France, 2019.
6. Schreiber, S.; Mahmoud, A.; Vuia, A.; Rübbelke, M.K.; Schmidt, E.; Schaller, M.; Kandárová, H.; Haberland, A.; Schäfer, U.F.; Bock, U.; et al. Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. *Toxicol. Vitr.* **2005**, *19*, 813–822. [CrossRef]
7. Netzlaff, F.; Kaca, M.; Bock, U.; Haltner-Ukomadu, E.; Meiers, P.; Lehr, C.M.; Schaefer, U.F. Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin®in comparison to various human skin preparations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *66*, 127–134. [CrossRef]
8. Küchler, S.; Strüver, K.; Friess, W. Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2013**, *9*, 1255–1263. [CrossRef]
9. Schäfer-Korting, M.; Bock, U.; Diembeck, W.; Düsing, H.J.; Gamer, A.; Haltner-Ukomadu, E.; Hoffmann, C.; Kaca, M.; Kamp, H.; Kersen, S.; et al. The use of reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the validation study. *ATLA* **2008**, *36*, 161–187. [CrossRef]
10. Schäfer-Korting, M.; Mahmoud, A.; Borgia, S.L.; Brüggener, B.; Kleuser, B.; Schreiber, S.; Mehnert, W. Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: Influence of the vehicles used on steroid permeation. *ATLA* **2008**, *36*, 441–452. [CrossRef]
11. Hoffmann, C.; Müller-Goymann, C.C. Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate. *Pharmazie* **2005**, *60*, 350–353.
12. Pouliot, R. Effects of Freezing on Functionality and Physicochemical Properties of A 3D-Human Skin Model. *J. Dermatol. Cosmetol.* **2017**, *1*, 24–31. [CrossRef]
13. Vyumvuhore, R.; Tfayli, A.; Biniek, K.; Duplan, H.; Delalleau, A.; Manfait, M.; Dauskardt, R.; Baillet-Guffroy, A. The relationship between water loss, mechanical stress, and molecular structure of human stratum corneum ex vivo. *J. Biophotonics* **2015**, *8*, 217–225. [CrossRef] [PubMed]
14. Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M.E. A depth-dependent profile of the lipid conformation and lateral packing order of the stratum corneum in vivo measured using Raman microscopy. *Analyst* **2016**, *141*, 1981–1987. [CrossRef] [PubMed]
15. Caspers, P.J.; Lucassen, G.W.; Puppels, G.J. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 572–580. [CrossRef]
16. Dąbrowska, A.K.; Adlhart, C.; Spano, F.; Rotaru, G.-M.; Derler, S.; Zhai, L.; Spencer, N.D.; Rossi, R.M. In vivo confirmation of hydration-induced changes in human-skin thickness, roughness and interaction with the environment. *Biointerphases* **2016**, *11*, 031015. [CrossRef]
17. Choe, C.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Depth profiles of hydrogen bound water molecule types and their relation to lipid and protein interaction in the human stratum corneum: In vivo. *Analyst* **2016**, *141*, 6329–6337. [CrossRef]
18. Sdobnov, A.Y.; Darvin, M.E.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Tuchin, V.V. Hydrogen bound water profiles in the skin influenced by optical clearing molecular agents—Quantitative analysis using confocal Raman microscopy. *J. Biophotonics* **2019**, *12*, 1–11. [CrossRef]
19. Choe, C.S.; Schleusener, J.; Lademann, J.; Darvin, M.E. Age related depth profiles of human Stratum Corneum barrier-related molecular parameters by confocal Raman microscopy in vivo. *Mech. Ageing Dev.* **2018**, *172*, 6–12. [CrossRef]
20. Verzeaux, L.; Vyumvuhore, R.; Boudier, D.; Le Guillou, M.; Bordes, S.; Essendoubi, M.; Manfait, M.; Closs, B. Atopic skin: In vivo Raman identification of global molecular signature, a comparative study with healthy skin. *Exp. Dermatol.* **2018**, *27*, 403–408. [CrossRef]
21. Mahrhauser, D.S.; Nagelreiter, C.; Gehrig, S.; Geyer, A.; Ogris, M.; Kwizda, K.; Valenta, C. Assessment of Raman spectroscopy as a fast and non-invasive method for total stratum corneum thickness determination of pig skin. *Int. J. Pharm.* **2015**, *495*, 482–484. [CrossRef]
22. Tfayli, A.; Piot, O.; Draux, F.; Pitre, F.; Manfait, M. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. *Biopolymers* **2007**, *87*, 261–274. [CrossRef]

23. Ali, S.M.; Bonnier, F.; Ptasinski, K.; Lambkin, H.; Flynn, K.; Lyng, F.M.; Byrne, H.J. Raman spectroscopic mapping for the analysis of solar radiation induced skin damage. *Analyst* **2013**, *138*, 3946–3956. [CrossRef]
24. Tfayli, A.; Bonnier, F.; Farhane, Z.; Libong, D.; Byrne, H.J.; Baillet-Guffroy, A. Comparison of structure and organization of cutaneous lipids in a reconstructed skin model and human skin: Spectroscopic imaging and chromatographic profiling. *Exp. Dermatol.* **2014**, *23*, 441–443. [CrossRef]
25. Miloudi, L.; Bonnier, F.; Bertrand, D.; Byrne, H.J.; Perse, X.; Chourpa, I.; Munnier, E. Quantitative analysis of curcumin-loaded alginate nanocarriers in hydrogels using Raman and attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 4593–4605. [CrossRef] [PubMed]
26. Sriram, G.; Alberti, M.; Dancik, Y.; Wu, B.; Wu, R.; Feng, Z.; Ramasamy, S.; Bigliardi, P.L.; Bigliardi-Qi, M.; Wang, Z. Full-thickness human skin-on-chip with enhanced epidermal morphogenesis and barrier function. *Mater. Today* **2018**, *21*, 326–340. [CrossRef]
27. Dancik, Y.; Sriram, G.; Rout, B.; Zou, Y.; Bigliardi-Qi, M.; Bigliardi, P.L. Physical and compositional analysis of differently cultured 3D human skin equivalents by confocal Raman spectroscopy. *Analyst* **2018**, *143*, 1065–1076. [CrossRef] [PubMed]
28. Roguet, R. The use of reconstructed human epidermis EPISKIN^{TM} in the assessment of local tolerance of cosmetics and chemicals. *ATLA Altern. Lab. Anim.* **2004**, *32*, 83–91. [CrossRef] [PubMed]
29. Schäfer-Korting, M.; Bock, U.; Gamer, A.; Haberland, A.; Haltner-Ukomadu, E.; Kaca, M.; Kamp, H.; Kietzmann, M.; Korting, H.C.; Krächter, H.U.; et al. Reconstructed human epidermis for skin absorption testing: Results of the German prevalidation study. *ATLA Altern. Lab. Anim.* **2006**, *34*, 283–294. [CrossRef]
30. Alberti, M.; Dancik, Y.; Sriram, G.; Wu, B.; Teo, Y.L.; Feng, Z.; Bigliardi-Qi, M.; Wu, R.G.; Wang, Z.P.; Bigliardi, P.L. Multi-chamber microfluidic platform for high-precision skin permeation testing. *Lab Chip* **2017**, *17*, 1625–1634. [CrossRef]
31. Butler, H.J.; Ashton, L.; Bird, B.; Cinque, G.; Curtis, K.; Dorney, J.; Esmonde-White, K.; Fullwood, N.J.; Gardner, B.; Martin-Hirsch, P.L.; et al. Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nat. Protoc.* **2016**, *11*, 664–687. [CrossRef]
32. Byrne, H.J.; Knief, P.; Keating, M.E.; Bonnier, F. Spectral pre and post processing for infrared and Raman spectroscopy of biological tissues and cells. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1865–1878. [CrossRef]
33. Gautam, R.; Vanga, S.; Ariese, F.; Umapathy, S. Review of multidimensional data processing approaches for Raman and infrared spectroscopy. *EPJ Tech. Instrum.* **2015**, *2*. [CrossRef]
34. Jepps, O.G.; Dancik, Y.; Anissimov, Y.G.; Roberts, M.S. Modeling the human skin barrier—Towards a better understanding of dermal absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 152–168. [CrossRef] [PubMed]
35. Czekalla, C.; Schönborn, K.H.; Lademann, J.; Meinke, M.C. Noninvasive Determination of Epidermal and Stratum Corneum Thickness in vivo Using Two-Photon Microscopy and Optical Coherence Tomography: Impact of Body Area, Age, and Gender. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2019**, *32*, 142–150. [CrossRef] [PubMed]
36. Khiao In, M.; Richardson, K.C.; Loewa, A.; Hedtrich, S.; Kaessmeyer, S.; Plendl, J. Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* **2019**, *48*, 207–217. [CrossRef]
37. Albèr, C.; Brandner, B.D.; Björklund, S.; Billsten, P.; Corkery, R.W.; Engblom, J. Effects of water gradients and use of urea on skin ultrastructure evaluated by confocal Raman microspectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2013**, *1828*, 2470–2478. [CrossRef] [PubMed]
38. Egawa, M.; Sato, Y. In vivo evaluation of two forms of urea in the skin by Raman spectroscopy after application of urea-containing cream. *Ski. Res. Technol.* **2015**, *21*, 259–264. [CrossRef] [PubMed]
39. OECD. *OECD Guideline for Testing of Chemicals. Test Guideline 428: Skin Absorption: In Vitro Method*; OECD Publishing: Paris, France, 2004.
40. Abd, E.; Yousef, S.A.; Pastore, M.N.; Telaprolu, K.; Mohammed, Y.H.; Namjoshi, S.; Grice, J.E.; Roberts, M.S. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **2016**, *8*, 163–176. [CrossRef]
41. Garcia, M.T.J.; de Vasconcellos, F.L.L.; Raffier, C.P.; Roberts, M.S.; Grice, J.E.; Benson, H.A.E.; Leite-Silva, V.R. Alternative Methods to Animal Studies for the Evaluation of Topical/Transdermal Drug Delivery Systems. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 287–299. [CrossRef]
42. Suhail, S.; Sardashti, N.; Jaiswal, D.; Rudraiah, S.; Misra, M.; Kumbar, S.G. Engineered Skin Tissue Equivalents for Product Evaluation and Therapeutic Applications. *Biotechnol. J.* **2019**, *14*. [CrossRef]
43. Flaten, G.E.; Palac, Z.; Engesland, A.; Filipović-Grčić, J.; Vanić, Ž.; Škalko-Basnet, N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *75*, 10–24. [CrossRef]

44. Venkatesan, G.; Dancik, Y.; Sinha, A.; Bigliardi, M.; Srinivas, R.; Dawson, T.; Valiyaveettil, S.; Bigliardi, P.; Pastorin, G. Facile synthesis of oligo anilines as permanent hair dyes: How chemical modifications impart colour and avoid toxicity. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 16188–16199. [CrossRef]
45. Venkatesan, G.; Dancik, Y.; Sinha, A.; Kyaw, H.M.; Srinivas, R.; Dawson, T.L.; Bigliardi, M.; Bigliardi, P.; Pastorin, G. Development of novel alternative hair dyes to hazardous para-phenylenediamine. *J. Hazard. Mater.* **2020**, 123712. [CrossRef]
46. CIR (Cosmetic Ingredients Review) Final report on the safety assessment of 2-methylresorcinol and resorcinol. *J. Am. Coll. Toxicol.* **1986**, *5*, 167–203. [CrossRef]
47. Porras, S.P.; Hartonen, M.; Ylinen, K.; Tornaeus, J.; Tuomi, T.; Santonen, T. Environmental and occupational exposure to resorcinol in Finland. *Toxicol. Lett.* **2018**, *298*, 125–133. [CrossRef]
48. Dancik, Y.; Bigliardi, P.L.; Bigliardi-Qi, M. What happens in the skin? Integrating skin permeation kinetics into studies of developmental and reproductive toxicity following topical exposure. *Reprod. Toxicol.* **2015**, *58*, 252–281. [CrossRef] [PubMed]
49. Barbero, A.M.; Frasch, H.F. Effect of Frozen Human Epidermis Storage Duration and Cryoprotectant on Barrier Function Using Two Model Compounds. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2016**, *29*, 31–40. [CrossRef]
50. Franzen, L.; Vidlářová, L.; Kostka, K.H.; Schaefer, U.F.; Windbergs, M. Freeze-drying as a preserving preparation technique for in vitro testing of human skin. *Exp. Dermatol.* **2013**, *22*, 54–56. [CrossRef]
51. Franzen, L.; Anderski, J.; Planz, V.; Kostka, K.H.; Windbergs, M. Combining confocal Raman microscopy and freeze-drying for quantification of substance penetration into human skin. *Exp. Dermatol.* **2014**, *23*, 942–944. [CrossRef]
52. Jacques-Jamin, C.; Duplan, H.; Rothe, H.; Vaillant, O.; Eilstein, J.; Grégoire, S.; Cubberley, R.; Lange, D.; Ellison, C.; Klaric, M.; et al. Comparison of the Skin Penetration of 3 Metabolically Stable Chemicals Using Fresh and Frozen Human Skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2017**, *30*, 234–245. [CrossRef]
53. Swarbrick, J.; Lee, G.; Brom, J. Drug permeation through human skin: I. Effect of storage conditions of skin. *J. Investig. Dermatol.* **1982**, *78*, 63–66. [CrossRef]
54. Kemppainen, B.W.; Riley, R.T.; Russell, R.B.; Pace, J.G.; Detrick, F. Effects of skin storage conditions and concentration of applied dose on [3H]T-2 toxin penetration through excised human and monkey skin. *Food Chem. Toxicol.* **1986**, *24*, 221–227. [CrossRef]
55. Nielsen, J.B.; Plasencia, I.; Sørensen, J.A.; Bagatolli, L.A. Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent in vitro percutaneous penetration. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2011**, *24*, 93–102. [CrossRef] [PubMed]
56. Payne, O.J.; Graham, S.J.; Dalton, C.H.; Spencer, P.M.; Mansson, R.; Jenner, J.; Azeke, J.; Braue, E. The effects of sulfur mustard exposure and freezing on transdermal penetration of tritiated water through ex vivo pig skin. *Toxicol. Vitr.* **2013**, *27*, 79–83. [CrossRef]
57. Abdayem, R.; Roussel, L.; Zaman, N.; Pirot, F.; Gilbert, E.; Haftek, M. Deleterious effects of skin freezing contribute to variable outcomes of the predictive drug permeation studies using hydrophilic molecules. *Exp. Dermatol.* **2015**, *24*, 972–974. [CrossRef] [PubMed]
58. Sintov, A.C. Cumulative evidence of the low reliability of frozen/thawed pig skin as a model for in vitro percutaneous permeation testing. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *102*, 261–263. [CrossRef] [PubMed]
59. Sintov, A.C.; Botner, S. Transdermal drug delivery using microemulsion and aqueous systems: Influence of skin storage conditions on the in vitro permeability of diclofenac from aqueous vehicle systems. *Int. J. Pharm.* **2006**, *311*, 55–62. [CrossRef]
60. Sintov, A.C.; Greenberg, I. Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. *Int. J. Pharm.* **2014**, *471*, 516–524. [CrossRef]
61. Bajza, Á.; Kocsis, D.; Berezvai, O.; Laki, A.J.; Lukács, B.; Imre, T.; Iván, K.; Szabó, P.; Erdő, F. Verification of p-glycoprotein function at the dermal barrier in diffusion cells and dynamic "skin-on-a-chip" microfluidic device. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 804. [CrossRef]
62. Ponec, M.; Boelsma, E.; Gibbs, S.; Mommaas, M. Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2002**, *15*, 4–17. [CrossRef]
63. Bäsler, K.; Bergmann, S.; Heisig, M.; Naegel, A.; Zorn-Kruppa, M.; Brandner, J.M. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J. Control. Release* **2016**, *242*, 105–118. [CrossRef]

64. Niehues, H.; Bouwstra, J.A.; El Ghalbzouri, A.; Brandner, J.M.; Zeeuwen, P.L.J.M.; van den Bogaard, E.H. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Exp. Dermatol.* **2018**, *27*, 501–511. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

IV.2 Etude 2 : Impact de la fixation à la formaline sur des modèles d'épidermes humains reconstruits pour les études de perméation : Une preuve de concept

IV.2.1 Contexte :

Lors de l'étude précédente, il a été démontré que le stockage par congélation des épidermes humains reconstruits, le modèle EpiSkin®, altère leur fonction barrière, entraînant des quantités de résorcine de 3 à 6 fois plus élevées que dans les EpiSkin® frais.

La présente étude constitue une continuation logique de la précédente et vise à répondre à la problématique soulevée par le stockage des EpiSkin®. Elle a pour objectif de fournir une preuve de concept et d'évaluer l'utilisation d'un procédé chimique de stockage, en l'occurrence la fixation par la formaline, qui est couramment utilisée en histologie et en anatomo-pathologie pour préserver les cellules et les tissus dans un état le plus proche possible de celui in vivo.

Pour cela, nous avons développé une approche analytique multi-techniques, incluant l'HPLC pour comparer les cinétiques de pénétration dans les peaux fraîches et fixées, ainsi que la CRM comme outil de caractérisation afin d'étudier les interactions moléculaires entre l'agent fixateur et les EpiSkin®.

IV.2.2 Introduction

En introduction de ce chapitre, nous avons évoqué les limitations liées à l'utilisation des modèles EpiSkin® et exploré leur stockage par congélation (Etude 1 de ce chapitre). Comme expliqué précédemment, la congélation des biopsies de peau humaine est une pratique courante autorisée par plusieurs agences réglementaires, telles que l'OCDE. Cependant, elle entraîne une augmentation de la perméabilité, perturbant ainsi la fonction barrière de la peau en raison de la formation de petits cristaux de glace. Dans ce contexte, une alternative a été explorée, qui consiste à utiliser des agents cryoprotecteurs tels que le glycérol à 10 % pour empêcher la formation de cristaux de glace. Cependant, ces agents altèrent l'intégrité de l'épiderme et réduisent sa fonction barrière. De plus, ils ont le potentiel d'induire une cytotoxicité, ce qui endommage les cellules cutanées et perturbe leur fonctionnement.

Dans les années 1980, des chercheurs en biologie ont développé des méthodes de fixation des cellules permettant d'obtenir une "image instantanée" afin de mener des investigations dans des conditions aussi proches que possible de l'in vivo, tout en évitant la dégradation et/ou les changements biochimiques des échantillons étudiés. Les protocoles de fixation utilisant des

alcools (éthanol, méthanol), des aldéhydes (formol, paraformaldéhyde, glutaraldéhyde), des agents métalliques (tétroxyde d'osmium, sels de zinc) ou des agents oxydants (tétroxyde d'osmium) sont utilisés en cyto/histopathologie. Les aldéhydes sont les agents de fixation les plus couramment utilisés pour les échantillons biologiques, notamment la formaline qui est largement utilisée dans de nombreuses études, principalement sur différents types de cellules. En histopathologie, le processus de fixation est une technique courante utilisée comme première étape de traitement des tissus, suivie d'une déshydratation de la peau par immersion dans des bains d'alcool à concentrations croissantes. Ensuite, un solvant organique (comme le xylène ou le toluène) est utilisé pour le nettoyage, suivi d'une étape d'inclusion en paraffine (cire de paraffine liquide chaude) permettant de réaliser des coupes fines (de quelques microns) qui peuvent être colorées ou marquées. Les coupes sont ensuite préparées à l'aide d'un microtome à partir de "blocs" de paraffine solide, qui doivent être déparaffinés et nettoyés dans un solvant organique (xylène ou toluène), puis trempés dans des solutions d'éthanol de concentrations décroissantes pour la réhydratation. Cette procédure en plusieurs étapes, incluant des étapes de nettoyage en solvant organique qui entraînent l'extraction des lipides, permet de préserver la morphologie des échantillons, mais altère considérablement leur composition biochimique. Cependant, l'analyse de la littérature indique que l'étape de fixation ne serait pas à l'origine de modifications biochimiques. Il pourrait donc être intéressant d'explorer cette méthode pour conserver les échantillons d'EpiSkin®, à condition que la fonction barrière soit préservée. Dans cette optique, des études de perméation de la caféine, ainsi que des analyses par CRM en tant qu'outils de caractérisation, ont été réalisées sur les échantillons d'EpiSkin® afin de vérifier l'état de leur fonction barrière après le processus de fixation.

IV.2.3 Objectif :

L’objectif de cette preuve de concept est d’évaluer l'utilisation du protocole de fixation à la formaline (solution avec 10% de formaline) pour augmenter le temps de stockage (jusqu'à 21 jours) des EpiSkin® RHE avant les études de perméation cutanée.

IV.2.4 Développements méthodologiques :

IV.2.5 Développements liés au protocole de fixation

Pour fixer les échantillons d'EpiSkin®, nous avons évalué deux protocoles expérimentaux différents. Dans le premier protocole, les tissus ont été complètement immergés dans une solution de formaline à 10% et conservés dans cette solution jusqu'au jour de la cinétique de perméation. Après avoir effectué des recherches bibliographiques approfondies, nous avons

constaté qu'une fixation à la formaline pendant 24 heures était amplement suffisante pour permettre une infiltration complète de la formaline dans l'ensemble du tissu, d'une épaisseur d'environ 300 µm. Ainsi, dans le deuxième protocole, le même processus d'immersion totale dans la formaline a été utilisé avec une durée de 24 heures. Ensuite, les tissus, toujours dans leurs inserts, ont été mis en contact sur leur face inférieure avec du PBS dans des plaques à 12 puits et stockés en chambre froide à 4°C, à l'abri de la lumière.

Les résultats ont révélé que le protocole d'immersion totale jusqu'au jour de la cinétique (fixation prolongée) perturbait la fonction barrière des tissus, avec des masses cumulées de caféine 6 à 7 fois supérieures à celles observées avec des EpiSkin frais. En revanche, le deuxième protocole, avec une immersion de 24 heures suivie d'un stockage à 4°C en contact avec du PBS, donnait des masses cumulées similaires à celles des EpiSkin frais. Cela est probablement dû au rinçage des tissus par le PBS pendant la durée de stockage en chambre froide, ce qui permettait d'éliminer l'excès de formaline dans les tissus.

Ces résultats ont conduit à choisir, pour cette étude, le protocole de fixation en immersion totale pendant 24 heures suivi d'un stockage à 4°C en contact avec du PBS jusqu'au jour de la cinétique. Cette approche permettait de préserver les propriétés des tissus tout en minimisant les perturbations de la fonction barrière.

IV.2.6 Développements liés à l'analyse par CRM

Dans le cadre de notre étude sur l'analyse des EpiSkin® par CRM, nous avons effectué des tests expérimentaux. Tout d'abord, nous avons pris en considération les aspects liés à la préparation des échantillons de peau. Pour les mêmes raisons exposées dans le chapitre III, nous avons opté pour la méthode des coupes transversales par cryomicrotome pour cette étude.

Ensuite, nous avons examiné le choix des longueurs d'onde des lasers et des objectifs utilisés. A cet effet, nous avons testé trois longueurs d'onde différentes : 532 nm, 633 nm et 785 nm. En ce qui concerne les objectifs, nous avons évalué deux niveaux de grossissement avec différentes ouvertures numériques : l'objectif 20x/0.5 et l'objectif 50x/0.5.

Pour les mêmes raisons mentionnées dans l'étude du chapitre 3, nous avons décidé d'utiliser le laser de 532 nm. Cependant, par rapport à l'étude du chapitre 3, nous avons opté pour un objectif offrant un grossissement de 50 fois et une ouverture numérique de 0.5, car cet objectif offre une bonne résolution spatiale (voir chapitre I, section I.3.2.2). Il permet ainsi une observation plus précise des structures et des caractéristiques spécifiques des échantillons. En outre, nous avons procédé à des expérimentations afin de déterminer les paramètres d'acquisition optimaux. Cela a inclus des essais avec différents temps d'acquisition et différentes puissances laser, dans le

but de trouver un équilibre entre la qualité des spectres et la préservation de l'intégrité des échantillons. Un temps d'acquisition de 10 secondes, avec 2 accumulations et une puissance laser de 10 mW, nous a permis d'obtenir des spectres de haute qualité tout en évitant l'exaltation des artefacts liés à la présence de formaline dans les tissus et en préservant l'intégrité des échantillons analysés.

IV.2.7 Matériels et méthodes :

Dans cette étude, les EpiSkin® RHE ont été fixés dans une solution tamponnée de formaline à 10 % pendant 24 heures.

Au jour 14 (D14), soit un jour après réception, neuf des douze inserts de RHE (lot unique) ont été entièrement immergés dans la solution de formaline à 10 % (NBF) pour une fixation à température ambiante pendant 24 heures. Les 3 RHE restants ont été conservés dans l'incubateur pendant 24 heures supplémentaires.

Trois RHE ont été utilisés en tant que groupe témoin, permettant d'évaluer la perméation dans des conditions normales. Trois RHE fixés pendant un jour, 3 RHE fixés pendant 7 jours et 3 autres RHE fixés pendant 21 jours ont été utilisés pour les études de perméation après une durée de stockage correspondant à 1, 7 et 21 jours respectivement.

Lors des expériences de perméation tous les RHE ont été exposés à une solution de caféine à une concentration de 2 % (m/m) ou 20 mg/mL pendant une durée de 12 heures.

Les quantités de caféine ont été déterminées par HPLC suivant la méthode développée dans le chapitre II (voir section II.4.1).

Tous les RHE (fixés et non fixés) non exposés à la caféine ont été préparés pour l'analyse Raman. A cet effet des coupes transversales d'une épaisseur de 20 µm ont été réalisées, déposées sur des substrats en CaF_2 en vue de leur analyse par CRM. La CRM a d'abord été utilisée comme outil de caractérisation des différentes couches des RHE, à savoir le stratum corneum (SC), l'épiderme viable (VE) et le support collagénique inerte (ICS), puis pour étudier l'effet du processus de fixation sur les RHE au niveau moléculaire. Nous avons comparé les spectres enregistrés dans les différentes couches des RHE fixés à ceux des échantillons non-fixés. Enfin, nous avons utilisé l'analyse en composantes principales comme un outil de discrimination entre les RHE fixés et non-fixés.

IV.2.8 Résultats :

La CRM couplée à l'analyse en composantes principales (ACP) montre que la fixation par la formaline induit des modifications structurales dans les régions des protéines et des lipides des EpiSkin®. Ces modifications affectent la conformation des chaînes aléatoires de l'Amide I et

des feuillets β, ainsi que les structures secondaires telles que l'hélice α et la spirale aléatoire dans l'Amide III. Des altérations visibles sont observées au niveau des résidus de phénylalanine, de tryptophane et du doublet de Fermi de la tyrosine. De plus, les lipides subissent des changements dans leur conformation trans-squelettique et de gauche, ce qui se traduit par un déplacement des bandes Raman de l'Amide III et des bandes associées aux vibrations CH. Néanmoins, les résultats des études de perméation ont démontré que la fonction barrière reste fonctionnelle dans les échantillons fixés. Les résultats ont montré que la quantité de caféine qui traverse les EpiSkin® non fixés (témoin) est très similaire (avec une différence de 10 à 15 % après 12 heures de perméation) à celle observée dans les EpiSkin® fixés (T0, T+7 et T+21). La même tendance est observée pour les flux de diffusion (Jss), les temps de latence (tlag) et les coefficients de perméabilité (Kp). De plus, les tests statistiques ne montrent aucune différence significative entre la perméation des EpiSkin® fixés (T0, T+7 et T+21), ce qui indique que les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 21 jours après la fixation. Étant donné que le fabricant de RHE recommande d'utiliser les modèles dans les 48 heures suivant la livraison, ce processus de stockage après fixation est très prometteur par rapport aux processus de stockage par congélation (première étude) qui ont montré une augmentation considérable de la perméabilité (3 à 6 fois) en fonction de la température et de la durée de stockage utilisée.

IV.2.9 Conclusion :

Cette preuve de concept examine les effets du stockage des EpiSkin® après un processus de fixation chimique à la formaline. L'étude démontre que le processus de fixation entraîne des modifications structurales dans les régions protéiques et lipidiques des EpiSkin®. Malgré ces modifications, les résultats des études de perméation montrent que la fonction barrière des EpiSkin®, qui limite la perméation des ingrédients actifs, reste fonctionnelle après 21 jours de stockage. Les différences observées dans la quantité de caféine et dans les paramètres cinétiques (Jss, tlag et Kp) sont d'environ 10 à 15 % après 12 heures de perméation. De plus, lors des travaux expérimentaux de l'article 1 (voir Chapitre II, section II.7) sur la perméation de la caféine à 2 % chargée dans des émulsions sans tensio-actifs à travers les EpiSkin®, il a été observé une variabilité intra-échantillon pouvant atteindre 10 % en ce qui concerne les quantités de caféine après 12 heures. Ces résultats indiquent que les différences trouvées dans cette étude ne sont pas inhabituelles par rapport aux études précédentes et à la variabilité intra-échantillon des EpiSkin®. En comparaison avec un processus classique de congélation qui détériore la fonction barrière et entraîne des quantités d'actifs de 3 à 6 fois plus élevées que les peaux

fraîches, les résultats de cette étude sont nettement meilleurs, ce qui démontre le potentiel de la fixation des EpiSkin® à la formaline comme preuve de concept pour le stockage des EpiSkin®.

IV.2.10 #Article 5:Formalin fixation of reconstructed human epidermis skin models prior to in vitro permeability studies: A proof of concept using caffeine

Hichem Kichou[a], Amanda C. Caritá[a], Hugh J. Byrne[c], Franck Bonnier[b], Igor Chourpa[a] and Emilie Munnier[a*]

[a] Université de Tours, Faculté de Pharmacie, EA6295 NMNS « NanoMédicaments et NanoSondes », France.

[b] LVMH Recherche, 185 Av. de Verdun, 45800, Saint-Jean-de-Braye, France.

[c] FOCAS Research Institute, TU Dublin, City Campus, Camden Row, Dublin 8, D08 CKP1, Ireland

*corresponding author: Emilie Munnier, Université de Tours, UFR sciences pharmaceutiques de Tours, EA6295 NMNS « NanoMédicaments et NanoSondes », 31 avenue Monge, 37200 Tours, France; Tel: +33 2 47367307; E-mail: emiliemunnier@univ-tours.fr

Abstract:

Reconstructed Human Epidermis (RHE) has the potential to replace animal tissues in pharmaceutical and cosmetic sciences, offering both scientific and ethical advantages. It is important to note, however, that commercially available RHE models are typically provided as ready-to-use, living skin inserts that should be utilized within 48 hours of receipt. Freezing RHE samples for storage has been found to compromise the barrier function of the RHE. In this study, we investigated the effect of a formalin fixation protocol on a commercial RHE model (EpiSkin®). The aim was to extend the storage time of RHE before conducting skin permeation studies. To achieve this, RHE samples were fixed with 10% Neutral Buffered Formalin (NBF) for 24 hours and then stored (4°C) for different periods, up to 21 days. The skin permeation of caffeine, used as a model compound, through the fixed tissues was examined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), and the results are compared to those obtained with unfixed (fresh) tissues. Additionally, Confocal Raman Spectroscopy (CRS) combined with Principal Components Analysis (PCA) was employed to investigate the molecular-level effects of the fixation process. The CRS results, along with PCA analysis, revealed that the fixation process induced structural changes in the proteins and lipids of the RHE. These changes were particularly noticeable in the viable epidermis, compared to the stratum corneum and the polymeric support membrane, due to the higher concentration of proteins in this layer.

Nevertheless, the caffeine permeation results indicate that the barrier function of the RHE remains largely intact after fixation. The amount of caffeine permeating through the fresh RHE was very similar to that observed in the fixed RHE samples at days T0, T+7, and T+21, a difference of only 10 to 15% being observable after 12 hours of permeation. This indicates that the fixed samples could be stored for up to 21 days without compromising their performance. Further studies are needed to evaluate the effect of formalin fixation on skin permeation, particularly using other model molecules with different physicochemical properties. Nonetheless, the results presented in this study offer promising insights to address the limited shelf life of RHE models, which is one of their major drawbacks.

Keywords: Permeation studies, Formalin fixation, Reconstructed Human Epidermis, High-Performance Liquid Chromatography, Raman spectroscopy

Introduction

Skin is the largest organ of the human body, acting as a barrier, from the inside out, to prevent excessive trans epidermal loss of body water, but also from the outside in, to protect against external physical, chemical, and biological aggressions [1]. The specific biochemical architecture of the *stratum corneum* (SC), described as "bricks and mortar" [2], provides this efficient barrier function [3], that limits the permeability of the skin to exogenous agents, including to Active Cosmetic and Pharmaceutic Ingredients (ACI/API) released from topically applied formulations. Product efficacy is directly correlated to the ability to overcome this barrier [4], and therefore, for testing new products and for demonstrating the equivalence of generic products to the original product, permeation studies should be conducted *in vivo* according to regulatory guidelines [5]. However, due to technical, economical, and ethical limitations, testing of penetration *in vitro* using Franz diffusion cells [6], has become the gold standard method referenced in international guidelines [7–9]. Most commonly, excised human skin collected from plastic surgery and stored at -20°C or lower for up to one year [8, 10, 11], is considered acceptable for all compounds that are not dermally metabolized (OCDE recommendations) [7]. Although several studies have shown a higher penetration of API and ACI in Human Skin Equivalent (HSE) models compared to excised human skin [12–15], they are increasingly recognized as relevant substitutes to human biopsies. Reconstructed Human Epidermis (RHE) models are matured, fully stratified 3D models which mimic the physical and chemical barrier of human skin [16], and are a viable, reproducible and cost-effective alternative to perform equivalence studies during the development of new topical products [17].

Due to limited access to human samples, the storage of frozen skin biopsies is common practice, although many studies in the literature have reported that excised human skin exposed to negative temperatures (-20°C, -85°C) for varying durations (from 1 week to 1 year) resulted in a significant increase in permeability caused by the formation of small ice crystals [18], disrupting the barrier function [19–23]. While a short period of storage for 2.5 days at -17°C was reported to result in a 1.6-fold increase in the cumulative amount of chromone acid permeating through excised human epidermis [20], prolonged storage for 10 days at -60°C and 3 weeks at -80°C resulted in a 2.4-fold higher flux of trichothecene mycotoxin in full-thickness human thigh skin [24] and a 4-fold increase of permeability coefficient for caffeine to increase in excised abdominal skin [22], respectively. Although less studied for RHE skin models that are usually used upon delivery, the impairment of the skin barrier function for samples stored between -20 °C and -150 °C for up to 10 weeks was associated with a 3- to 6-fold increase in

the permeation of resorcin [25]. Most commonly cryoprotective agents, such as 10% glycerol, are used as preventive method to limit the damaging the skin damaging during freezing [18, 26, 27]. Induced cytotoxicity, dehydration and modification lipid structure may, however, result in compromised integrity of the *stratum corneum* and a reduction in barrier function [26, 28–30]. Since the 80s, fixation methods were developed to provide a "snapshot" of the biological materials, enabling investigations in conditions as close as possible to *in vivo* [31]. Ali *et al.* demonstrated, using Fourier Transformed Infrared spectroscopy (FTIR) and Raman micro-spectroscopy, that drastic alterations in the biochemical composition of skin samples, especially in lipid content, was caused by the typical histopathology protocol of embedding in paraffin, i.e. solid wax "blocks" [32]. However, it is important to dissociate the effects of the fixation itself and the subsequent steps of the tissue processing that involve dewaxing tissue sections using organic solvents (xylene, toluene,…) and successive baths in ethanol prior to histological staining or labelling. There is no reported study in the literature on the effects from the fixation step itself on the skin barrier function from excised human skin samples used for permeation studies. At a cellular level, a study comparing the effects of fixation on C-3-prostate cancer cell line by formalin and glutaraldehyde, Gazi *et al.* used Synchrotron Radiation-Fourier Transformed Infrared spectroscopy to demonstrate that formalin at low concentration preserved the lipids, phosphate and protein content without impacting significantly the spectrum of the cells [33]. Similarly, Meade *et al.* concluded that, in comparison to Carnoy's fixative and a methanol-glacial-acetic mixture, formalin fixation resulted in Raman spectral signatures which were closest to those of live skin, bronchial epithelium and lung adenocarcinoma cells, and consequently, it best preserved their cellular integrity [34]. It was later confirmed by Dorney *et al*. that the fixation of lung adenocarcinoma cell line (A549) by formalin improved sample stability during analysis, while it had negligible effects on Raman spectral features compared to live cells [35]. Moreover, in 2015, Farhane *et al.*, demonstrated that fixation of cells using formalin did not show any effect on the cells, and the discrimination between normal and cancerous cell lines *in vitro* based on the Raman spectra was not impacted [36]. These studies conducted on different cell lines indicate that the fixation of biological materials can be achieved with minimal effects at the biomolecular level.

The present study is the first investigation of the effects of formalin fixation on the skin barrier function of RHE samples at the molecular and functional levels. For this proof of concept, RHE samples were fixed with 10% of Neutral Buffered Formalin (NBF) for 24h and stored in a dark cold room (4°C) for different periods of time (up to 21 days). First, Confocal Raman Spectroscopy (CRS) was used to investigate the effects of the formalin fixation protocol

on the biochemical composition in the different skin layers. Second, the impact of the fixation on the integrity of the barrier function was determined through permeation assays of caffeine, used here as a model compound.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Caffeine was purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), ultrapure water Elix® from Merck (Darmstadt, Germany), and 10 % Neutral Buffered Formalin (NBF) from Leica (Nanterre, France). Methanol and Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) were purchased from Fisher scientific (Illkirch, France).

2.2 Reconstructed Human Epidermis (RHE)

Reconstructed human epidermis (RHE) samples were purchased from EpiSkin® (Lyon, France). The RHE are epidermal cultures (large model, 1.07 cm^2 diffusional area) consisting of a stratified and totally differentiated epidermis derived from human keratinocytes deposited on a collagen matrix (type I and type IV). The RHEs are shipped in 12-well plates after 13 days of maturation. Upon delivery, RHE were deployed following the supplier's instructions. The inserts were transferred under aseptic conditions and at room temperature to a new, sterile 12-well plate. Each well of the new plate was filled with 2 mL of fresh culture medium provided by the manufacturer. The RHE were then placed in an incubator (37 °C, 5% CO_2) overnight.

2.3 RHE fixation, permeation studies and sample preparation for Raman spectroscopy

The day after receiving the RHE samples, 9 out of the 12 inserts were removed from the incubator and then fully immersed in 10% NBF for fixation at room temperature for 24 hours. The formalin fixation protocol is a slow process taking 2 to 24 h, since the coefficient of diffusability of formalin is approximately 1 mm of tissue thickness for each hour of fixation [37], as formaldehyde must dissociate from methylene glycol (the hydrated form of formalin) to form covalent bonds with the molecular components of the sample [31].

All Fixed-RHE were placed in a dark cold room (4°C) until the day of the permeation experiment. The remaining 3 RHE samples (hereafter identified as 'FRESH') were kept in the incubator for 24h to synchronise all samples for the permeation experiments. At T0, T+7 days and T+21 days, permeation experiments were carried out, in triplicate, on FRESH T0, FIXED T0, FIXED T+7 and FIXED T+21. Un-fixed (FRESH) samples were used as control only for the T0.

Additional RHE samples dedicated to CRS analysis, not exposed to caffeine, were prepared at T0 (FRESH, n=1 and FIXED T0, n=1), T+7 days (FIXED T+7, n=1) and at T+21 days (FIXED T+21, n=1). The samples were taken out of the cold room (4 °C) and placed at -20°C until analysis using CRS.

2.4 Caffeine permeation assay

Permeation experiments were performed with RHE samples directly in their culture inserts placed in the 12-well plates, as previously reported by Dancik *et al.* [25]. FRESH T0, FIXED T0, FIXED T+7 or FIXED T+21 samples were transferred in 12 well plates and equilibrated for 30 min at 37 °C. 2 mL of D-PBS was used as the receptor medium. A 2% w/w (20mg/mL) PBS served as the donor solution. A volume of 200 µL was applied directly onto each RHE sample. The time-dependent permeation of caffeine was followed over 12 hours. At specific time intervals (every 30 mins from 0.5 to 2.5 h then every 60 min from 3 h until 12h), the 2 mL of receptor medium was collected for analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Following the collection of the receptor fluid, each RHE was immediately transferred to a new well, and filled with 2 mL of fresh D-PBS [25].

At the end of the permeation experiment, additional steps were performed for determining mass balances. The donor solutions were removed and set aside for analysis by HPLC. RHE and support membranes were then carefully removed from the inserts using a punch and separated. The SC side of the RHE and receptor side of the support membrane were gently swabbed with cotton tips which were then immersed in 2 mL methanol for extraction and analysed by HPLC. The SC side of the tissue was washed for 30 s with methanol to remove any caffeine residue. Skin and support membranes were cut into small pieces and likewise immersed in 2 mL methanol for 12 hours and the extracted solution was then analysed by HPLC.

2.5 HPLC analysis

The receptor media, donor solutions, extracts from skin and support membranes were analysed by HPLC. The HPLC system (Ultimate 3000, Dionex) consisted of a UHPLC pump; an auto-injector; a diode array detector and an Interchim Kromasil Vintage Series C18 column (4.6 x 150 mm, 5 µm). The detection wavelength for caffeine was 272 nm. The temperatures of the column and the auto-injector were set to 25 °C and 15 °C, respectively. The mobile phase used in isocratic mode was methanol 50%: water 50% (v/v) + 10 mM of phosphoric acid. The injection volume of samples was 10 µL. The duration of the analysis of each sample was 6 min at a flow rate of 1 ml.min^{-1}. The software used was Chromeleon 7.1 (Thermo Scientific).

A standard calibration curve was prepared prior to analysis. Standards were obtained in triplicate by dissolving caffeine in PBS at concentrations of 1, 5, 10, 100 and 500 µg min^{-1}. The observed retention time was 2.620 ± 0.008 min.

2.6 HPLC Data analysis

Results are presented as a plot of the cumulative mass of permeated caffeine per area of skin model (mg cm^{-2}):

$$Q_{\mathrm{n}} = \frac{C_{\mathrm{n}} \times V_{\mathrm{rec}} + \sum_{i=1}^{i=n-1} C_{\mathrm{i}} \times V_{\mathrm{i}}}{S} \quad \textbf{(1)}$$

Q_n (mg cm^{-2}) is the cumulative mass of caffeine at a time *n*, normalised by the diffusion surface S, C_n (mg cm^{-3}) is the concentration of the receptor medium determined by HPLC, V_{rec} the volume of the receiving compartment volume of receptor medium = 2 mL), C_i the concentrations calculated at the previous time interval and V_i the sample volume (here V_i = V_{rec}).

Three additional parameters characterizing caffeine permeation were calculated to compare the results between formulations. The steady-state flux (J_{ss} = dQ/dt, expressed in µg cm^{-2} h^{-1}) is equal to the slope of the cumulative amount profile in the steady-state (linear) portion of the profile. The lag time (t_{lag}, expressed in h) is the delay required for diffusion through the skin to reach a steady-state. It is determined as the intercept of the Q(t) profile extrapolated to the time axis [1, 38]:

$$Q(t) = J_{\mathrm{SS}}\left(t - t_{\mathrm{lag}}\right) \quad \textbf{(2)}$$

The permeability coefficient (Kp, expressed in cm h^{-1}) represents the "speed" of penetration of the active ingredient and is obtained from:

$$K_{\mathrm{p}} = J_{\mathrm{SS}}/C_{\mathrm{d}} \quad \textbf{(3)}$$

Where C_d is the applied donor concentration in µg cm^{-3}.
All results are reported as mean ± SD (n=3). The statistical significance of the data was determined using the Student's t-test with a level of significance set for p-values ≤ 0.05.

2.7 Confocal Raman Spectroscopy

Twenty micrometer thin sections were prepared from RHE samples which were not exposed to caffeine using a cryostat (Leica CM 1850 UV, Nanterre, France). Sections were placed onto histology glass slides for CRS analysis. Raman spectra was collected using an Alpha300R Raman microscope (WiTec, Ulm, Germany) equipped with 532 nm laser source. To avoid photodamaging, the power was set to 10 mW at the sample. A 600 lines/mm grating was selected, and the back scattered light was collected on a back illuminated deep depletion CCD detector over the spectral range 0-3600 cm^{-1} with a spectral resolution ~5 cm^{-1}. Spectra were collected using a 50x objective (Olympus, NA=0.5) and the acquisition time was set to 10 sec x 2 accumulations. The instrument is calibrated daily using a 2-step procedure. Firstly, the True Cal function of Project 5 (WITec, Ulm, Germany) is used. It is an automatic multipoint calibration routine performed with a Mercury-Argon (HgAr) light source integrated in the Raman microscope. Secondly, prior to data acquisition, a verification was done using the peak at 520.7 cm^{-1} from a silicon substrate. A total of 650 spectra were acquired per sample, distributed between the SC, the epidermis and the support membrane.

2.9 Raman data analysis

Data analysis was performed using Matlab® (MathWorks, USA). A Lieber baseline correction was applied [39], using a linear correction function with 10 iterations, followed by a unit vector normalisation. The fingerprint region (FPR) between (800 - 1800 cm^{-1}) and the high wavenumber region (HWR) (2500 - 3700 cm^{-1}) were analysed.

Multivariate analysis: Principal Components Analysis (PCA) is an unsupervised multivariate analysis technique used to evaluate the variability and to simplify a complex data

set of multiple dimensions. It allows the reduction of the number of variables in a multidimensional data set, although it retains most of the variation within the data set. The other advantage of this method is the derivation of PC loadings which represent the variance of each variable (wavenumber) for a given PC, hence reflecting the variations in the chemical components contributing to the spectra [40]. In the scatter plot, the first principal component (PC1) accounts for the highest explained variance. Moreover, each dot in the scatterplot, corresponding to a spectrum, can be located in space using the coordinates defined by the scores along both PC1 and PC2. Therefore, similar spectra tend to be gathered with relatively close PC scores while the presence of significant variations in spectral features will result in higher distances between spectra.

3. Results

3.1 Characterisation of the effects of fixation on RHE models by CRS

The RHE models are a stratified and fully differentiated epidermis [25] which is histologically comparable to human skin. The three main layers observed are the *stratum corneum* (SC), the viable epidermis (VE), and the polymeric support membrane (PSM) composed of polycarbonate, according to supplier's description (Figure 1) [25, 41].

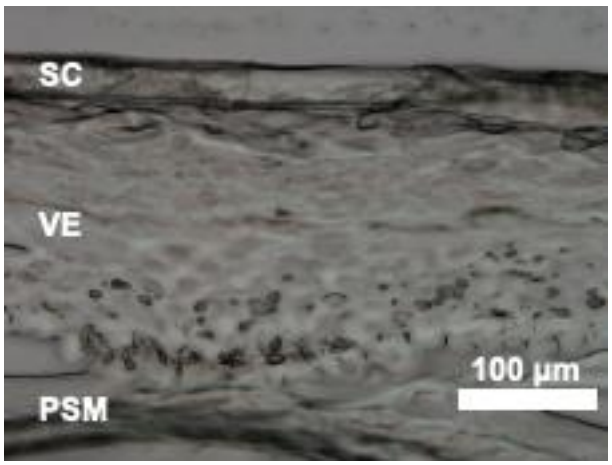


Figure 1: *Representative bright field image of fresh RHE thin section taken with a x40 objective. Stratum corneum (SC), the viable Epidermis (VE) and the polymeric support membrane (PSM).*

3.1a *Stratum corneum*

Mean spectra for the finger print region (FPR) and the High Wavenumbers region (HWR) are presented in supplementary materials (Figure S1). The main features corresponding

to proteins and lipids can be observed and the corresponding assignments can be found in the literature [41, 42]. For the purpose of this study, PCA was used to highlight the spectral difference between FRESH and FIXED samples.

The PCA scatter plot for the FPR is presented in figure 2a. Along PC1, accounting for 53.7% of the explained variance, no clear discrimination was observed between FRESH T0 (red dots), FIXED T0 (green dots), FIXED T+7 (blue dots) and FIXED T+21 (black dots). Along PC2, accounting for 13.5% of the explained variance, the discrimination between FRESH (red dots) and FIXED samples was more delimited. The overlaps between data were limited to a few spectra from FIXED T+7. The loading of PC1 has the most intense features (Figure 2b) at 1655 cm^{-1} (negative band - N–C=O deformation, Amide I band), 1440 and 1469 cm^{-1} (C–H scissoring from proteins and lipids), 1380 cm^{-1} (CH_3 bending or deformation of lipid), 1302 cm^{-1} (C–H deformation of Amide III), 1127 cm^{-1} (trans-conformation of lipid), 1060 cm^{-1} (C-C skeletal stretching of lipid), 1027 cm^{-1} (C-H bending or deformation of phenylalanine), 1005 cm^{-1} (negative band -C–C=C deformation, aromatic acids from phenylalanine), 958 cm^{-1} (negative band -CH_2 deformation for cholesterol) and 854 cm^{-1} (fermi doublet ring for tyrosine). There was no clear correlation between the features observed and the effects of formalin fixation. However, the FIXED samples show a greater variance according to PC1, stretching toward positive scores, although there is no discernible difference between the samples stored for different times. The corresponding positive features observed in the loading 1 highlighted a higher heterogeneity in lipids distribution, notably ceramides [43]. The loading of PC2 (figure 2b) exhibits main features at 1670 cm^{-1} (negative band- C=O deformation coupled to a N-H deformation, Amide I band), 1655 cm^{-1} (N–C=O deformation, Amide I band), 1585 cm^{-1} (C-C bending or deformation of phenylalanine, 1555 cm^{-1} (C=C stretching for tryptophan), 1440 - 1469 cm^{-1} (C–H scissoring from proteins and lipids), 1380 cm^{-1} (CH_3 bending or deformation of lipid), 1339 cm^{-1} (negative band - C-C stretching and C-H bending of phenylalanine and tryptophan), 1302 cm^{-1} (C–H deformation of Amide III), 1157 cm^{-1} (C-C stretching, CH_3 rocking and C-C skeletal conformation of ceramides), 1127 cm^{-1} and 1064 cm^{-1} (trans-conformation and skeletal trans-conformation of lipid), 1027 cm^{-1} (C-H bending or deformation of phenylalanine), 1005 cm^{-1} (negative band - C–C=C deformation, aromatic acids from phenylalanine), 987 cm^{-1} (C-C stretching β-sheet conformations proteins)

and 854 cm^{-1} (Fermi doublet ring for tyrosine). These variations can be more specifically assigned to the fixation protocol. Formalin is known to trigger intermolecular bridges of the aldehyde groups with reactive groups in cells and tissue by cross-linking of proteins (tyrosine rings) [7]. However, it was observed that the modifications extended from significant modifications in the Amide I random chain and β-sheet conformations, alterations in phenylalanine residues, tryptophan, and the Fermi doublet ring of tyrosine to structural changes were also observed in the lipid region, particularly in the skeletal conformation and skeletal trans-conformation of lipids. The scatter plot for the HWR (Figure 2c) showed no discrimination of the data along PC1 or PC2, accounting for 92% and 2.8% of explained variance, respectively. The distribution of the data reflects most likely the biochemical heterogeneity of the SC without correlation with effects from the formalin fixation protocol. The most intense features in loading 1 and loading 2 (figure 2d) are at 2854 cm^{-1} and 2885 cm^{-1} (negative bands - CH_2 asymmetric stretching of lipids and proteins, mostly ceramides), 2930 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching of ceramides), 2970 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching of ceramides), 3063 cm^{-1} (=CH stretching of ceramides and the large band from 3200 - 3700 cm^{-1} (O–H) suggest variations lipids and proteins contents across samples [43, 44].

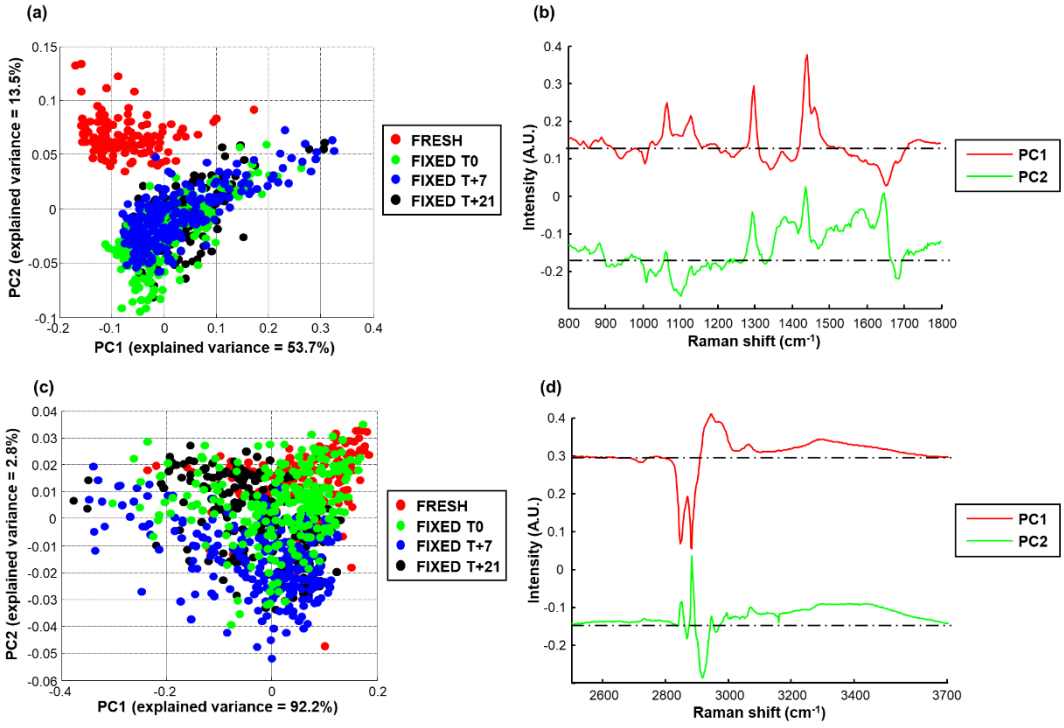


Figure 2: *PCA for spectra collected on the stratum corneum layer: (a) Scatter plot for PC1 and PC2 in the fingerprint region (800 – 1800 cm^{-1}) and (b) the corresponding loadings. (c)*

Scatter plot for PC1 and PC2 in the high wavenumbers region (2500 -3700 cm^{-1}) and (d) the corresponding loadings. Spectra are offset for clarity.

3.1.b Viable epidermis

The mean Raman spectra recorded from the VE are provided in supplementary materials (Figure S2). The PCA scatter plots are presented in Figure 3. For the FPR (Figure 3a), a clear discrimination was observed between FRESH T0 (red dots) and FIXED T0 (green dots), FIXED T+7 (blue dots) and FIXED T+21 (black dots) along PC1 (25.5% of the explained variance). However, there is no discrimination along PC2 (17.3 % of the explained variance).

The loading of PC1 (Figure 3b) displays features at 1726 cm^{-1} (C=O)OH) stretching for amino acids), 1698 cm^{-1} (C=O coupled to a N-H deformation of Amide I band), 1655 cm^{-1} (negative band - N–C=O deformation, Amide I), 1608 cm^{-1} (C=C deformation in plane mode of phenylalanine and tyrosine), 1576 cm^{-1} (C=C deformation mode of phenylalanine), 1555 cm^{-1} (C=C stretching for tryptophan), 1440 and 1469 cm^{-1} (C–H scissoring from proteins and lipids), 1302 cm^{-1} (C–H deformation of Amide III), 1284 cm^{-1} (C-H deformation for α helix of Amide III), 1252 cm^{-1} (random coil of Amide III (secondary structure), 1207 cm^{-1} (C-C6-H5 stretching for phenylalanine, tryptophan, and tyrosine), 1178 cm^{-1} (C-H for phenylalanine and tyrosine), 1138 cm^{-1} (C-N, C-C stretching of skeletal trans conformation of lipid), 1102 cm^{-1} (gauche conformation of lipid), 1060 cm^{-1} (C-C skeletal stretching of lipid), 1027 cm^{-1} (C-H bending or deformation of phenylalanine), 1005 cm^{-1} (negative band - C–C=C deformation, aromatic acids from phenylalanine), 987 cm^{-1} (C-C stretching β-sheet conformations proteins), 923 cm^{-1} (C-C stretching of a-helix for proteins), 902 cm^{-1} (C–O–C skeletal mode of lipid), 854 and 824 cm^{-1} (fermi doublet ring for tyrosine) [44, 45]. The VE displayed numerous effects from the fixation protocols across the entire FPR region and, similarly to the SC, both proteins and lipids are affected. These observations are consistent with some degree of molecular reorganisation induced by formalin within the deeper layers of skin.

The loading 2 (Figure 3b) displayed features at 1683 cm^{-1} (C=O coupled to a N-H deformation of Amide I band), 1655 cm^{-1} (negative band - N–C=O deformation, Amide I), 1440 and 1469 cm^{-1} (C–H scissoring from proteins and lipids), 1302 cm^{-1} (C–H deformation of Amide III), 1284 cm^{-1} (C-H deformation for a helix of Amide III), 1252 cm^{-1} (random coil of Amide III (secondary structure), 1198 cm^{-1} (C-C6-H5 stretching for phenylalanine, tryptophan, and tyrosine), 1178 cm^{-1} (C-H for phenylalanine and tyrosine), 1127 cm^{-1} (C-N,

C-C stretching of skeletal trans conformation of lipid), 1102 cm^{-1} (gauche conformation of lipid), 1060 cm^{-1} (C-C skeletal stretching of lipid), 1027 cm^{-1} (C-H bending or deformation of phenylalanine), 1005 cm^{-1} (negative band - C–C=C deformation, aromatic acids from phenylalanine), 987 cm^{-1} (C-C stretching β-sheet conformations proteins), 923 cm^{-1} (C-C stretching of a-helix for proteins), 902 cm^{-1} (C–O–C skeletal mode of lipid) and 854 cm^{-1} (fermi doublet ring for tyrosine) [44, 45]. While these variations correspond to intra samples variability it is interesting to notice that the distribution of data is significantly larger for FIXED samples than FRESH samples, suggesting that the fixation somehow increased the biological heterogeneity within FIXED samples.

The scatter plot for the HWR (Figure 3c) indicates a discrimination along PC1 and PC2, accounting for 74.7 % and 16.5% of explained variance, respectively. The data are organized into two diagonal clusters (FRESH (red dots) and FIXED T0 (green dots), FIXED T+7 (blue dots) and FIXED T+21 (black dots). Loading 1 and 2 (Figure 3d) showed similar features at 2854 cm^{-1} and 2885 cm^{-1} (negative bands - CH_2 asymmetric stretching of lipids and proteins, mostly Keratin), 2930 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching of keratin), 2970 cm^{-1} (CH_3 symmetric stretching of keratin), 3063 cm^{-1} (=CH stretching of keratin) and the large band from 3200 - 3700 cm^{-1} (O–H vibration). The results are consistent with variations in lipid and protein contents [46–48].

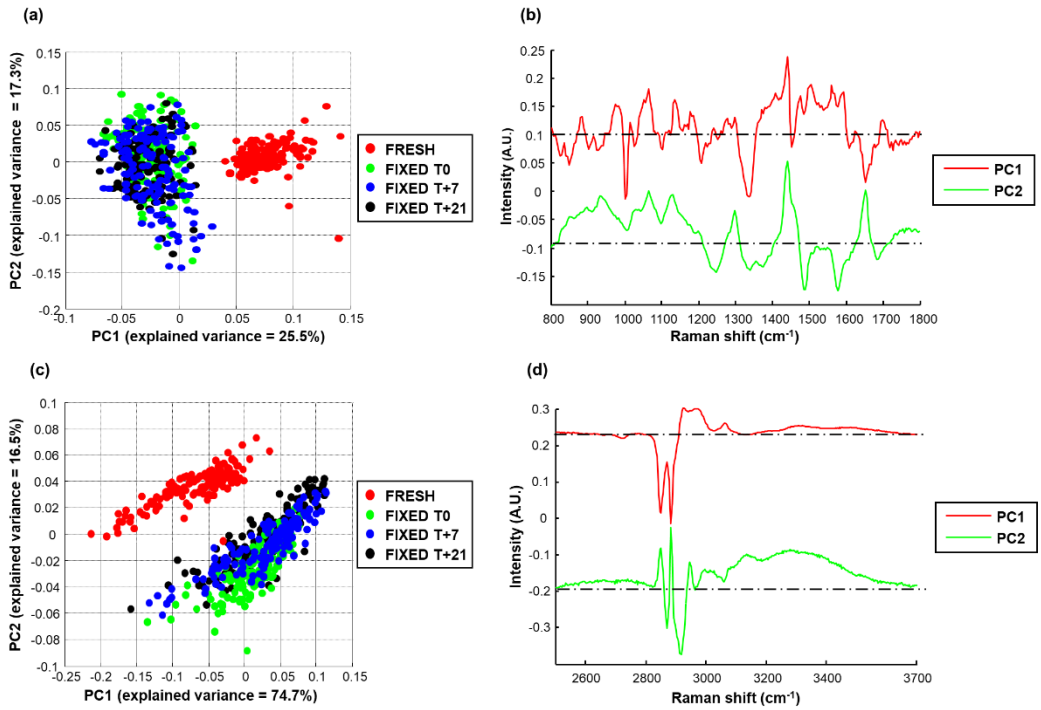


Figure 3: *Principal component analysis on the viable epidermis layer: (a) Scatter plot of the two first component on the fingerprint region (800 – 1800 cm^{-1}) and (b) its corresponding loadings. (c) Scatter plot of the two first component on the high wavenumbers region (2500 -3700 cm^{-1}) and (d) its corresponding loadings.* Spectra are offset for clarity.

3.1.c Polymeric support membrane

The mean spectra of PSM for the FPR and HWR are presented in supplementary materials (Figure S3). According to the manufacturer the support membrane is composed of polycarbonate. However, such materials are known to be characterised by sharp and intense Raman features [45]. The presence of an intense bands at 1655 cm−1 (N–C=O deformation, Amide I band), 1440 and 1469 cm−1 (C–H scissoring from proteins), 1284 cm^{-1} (C-H deformation for α helix of Amide III), 1252 cm^{-1} (random coil of Amide III (secondary structure), 1035 cm−1 (C-H bending or deformation of phenylalanine), 1005 cm−1 (C–C=C deformation, aromatic acids from phenylalanine), 987 cm−1 (C-C stretching β-sheet conformations proteins), 854 cm^{-1} (C-C stretching of Proline ring) suggested that the PSM also contains a significant amount of collagen [34, 46].

The PCA scatter plot for the FPR is displayed in Figure 4a. No clear discrimination was observed between the FRESH samples (red dots), FIXED T0 (green dots), FIXED T+7 (blue dots), and FIXED T+21 (black dots) according to either PC1 or PC2, accounting for 24.3% and 14.7% of the explained variance, respectively. As observed for the other two over layers, the FRESH samples are fairly tightly grouped, while there is greater variance in the FIXED samples. It was observed that for PC1, the most spectra corresponding to FRESH T0 mainly had negative scores but the overlap with FIXED T+21 prevent from assigning specific variations due to fixation. Loading 1 and 2 (figure 4b) exhibit features at 1726 cm^{-1} (C=O)OH) stretching for amino acids), 1698 cm^{-1} (C=O coupled to a N-H deformation of Amide I band), 1655 cm^{-1} (N–C=O deformation, Amide I), 1608 cm^{-1} (C=C deformation in plane mode of phenylalanine and tyrosine), 1576 cm^{-1} (C=C deformation mode of phenylalanine), 1555 cm^{-1} (C=C stretching for tryptophan), 1440 and 1469 cm^{-1} (C–H scissoring from proteins), 1302 cm^{-1} (C–H deformation of Amide III), 1284 cm^{-1} (C-H deformation for α helix of Amide III), 1252 cm^{-1} (random coil of Amide III (secondary structure), 1207 cm^{-1} (C-C6-H5 stretching for Hydroxyproline and Tyrosine), 1178 cm^{-1} (C-H for phenylalanine and tyrosine), 1138 cm^{-1} (C-N, C-C stretching of protein), 1027 cm^{-1} (C-H bending or deformation of phenylalanine), 1005 cm^{-1} (negative band - C–C=C deformation, aromatic acids from phenylalanine), 987 cm^{-1} (C-C stretching β-sheet conformations proteins), 923 cm^{-1} (C-C stretching of a-helix for Proline),

854 cm^{-1} (C-C stretching of Proline ring) [41, 46]. The scatter plot representing the HWR (Figure 4c) did not exhibit any discrimination of the data along PC1 and PC2 axes, which accounted for 41 % and 20.6 % of the explained variance, respectively. The most intense features in loading 1 and loading 2 (figure 4d) are at 2868 cm^{-1} and 2885 cm^{-1} (CH_2 asymmetric stretching of protein), 2940 cm^{-1} to 3063 cm^{-1} (CH stretching of protein) [46, 47].

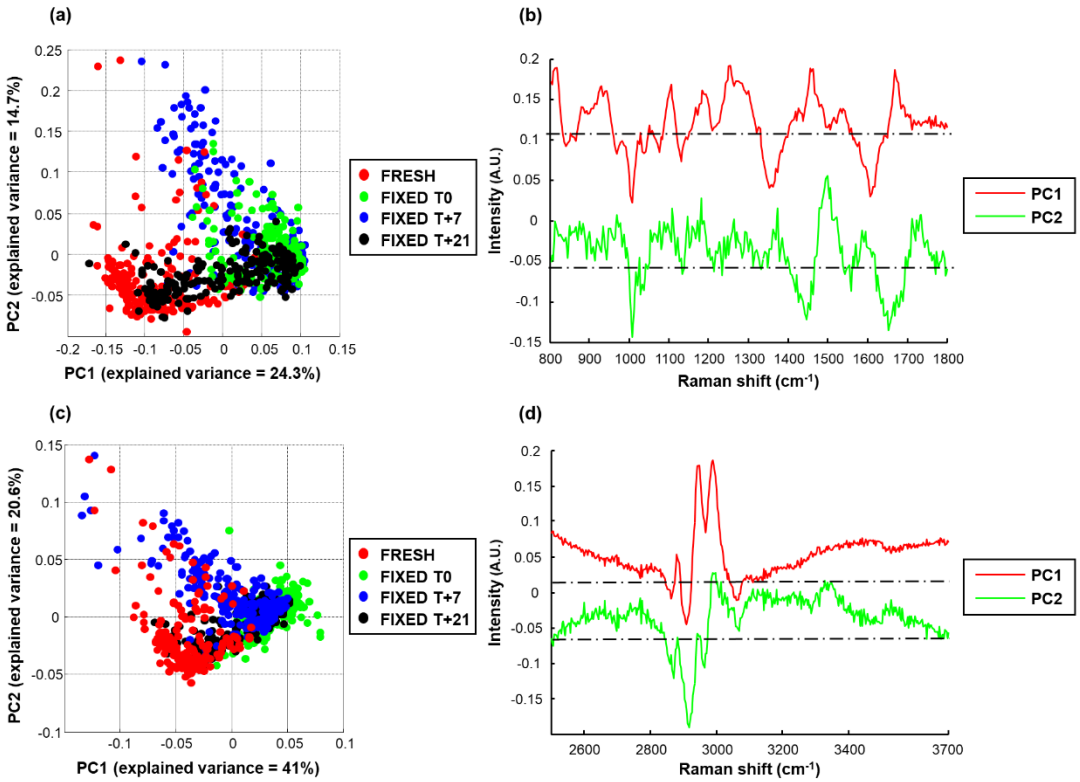


Figure 4: *Principal component analysis on the polymeric support membrane: (a) Scatter plot of the two first component on the fingerprint region (800 – 1800 cm^{-1}) and (b) its corresponding loadings. (c) Scatter plot of the two first component on the High wavenumbers region (2500 -3700 cm^{-1}) and (d) its corresponding loadings. Spectra are offset for clarity.*

3.2 Determining the effect of formalin fixation of RHE models permeability to caffeine

Caffeine is a small, hydrophilic compound of the methylxanthine class [48] which has been employed in several cosmetic preparations and it is recognized as a reference substance for *in vitro* skin absorption tests using Franz diffusion cells by the OECD [49, 50]. Figure 5

shows the 12-hour cumulative amount permeated through RHE for FRESH T0 (red), FIXED T0 (green), FIXED T+7 (blue) and FIXED T+21 (black) exposed to 2 wt% caffeine solutions.

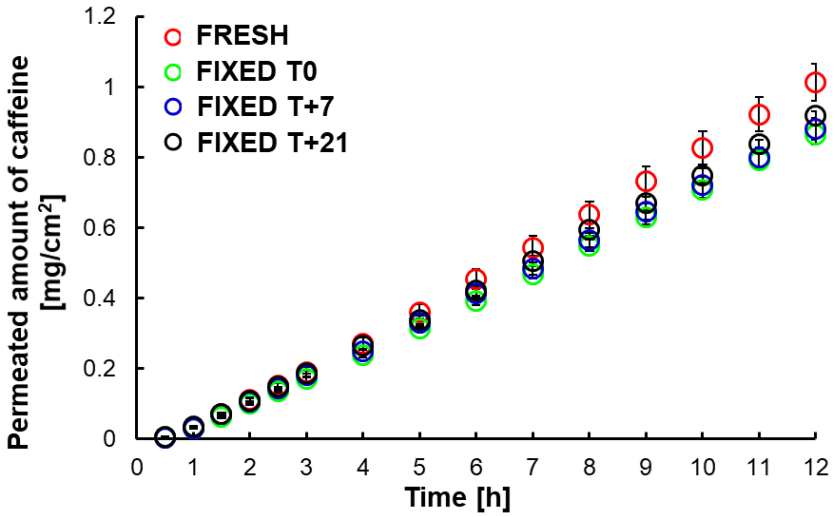


***Figure 5**: Cumulative amount of caffeine permeated through RHE as function of time. (**red**: FRESH T0. **green**: FIXED T0. **blue**: Fixed T+7. **black**: FIXED T+21). Data shown as means ± SD (n =3).*

At 30 min, the cumulative amounts of permeated caffeine were found to be 0.0073 ± 0.0006 mg.cm^{-2} for FRESH T0, 0.0060 ± 0.0005 mg.cm^{-2} for FIXED T0, 0.0049 ± 0.0001 mg.cm^{-2} for FIXED T+7 and 0.0069 ± 0.0011 mg.cm^{-2} for FIXED T+21. Significant differences were found between FRESH and FIXED T0 ($p=0.04$) and FIXED T+7 ($p=0.02$). However, no significant difference was found between the FRESH T0 and FIXED T+21 ($p= 0.58$).

From 30 min to 8 hours, the cumulative amounts of caffeine similarly increased for all conditions studied with no statistical difference observed between FRESH T0 compared to FIXED T0 ($0.05 < p < 0.21$), FIXED T+7 ($0.08 < p < 0.86$) and FIXED T+21 ($0.13< p < 0.73$).

From 8 to 12 hours, FRESH T0 was found significantly different compared to FIXED T0, FIXED T+7 and FIXED T+21 ($0.02 < p < 0.04$). Ultimately, cumulative amounts at 12 hours were 1.0120 ± 0.0525 mg.cm^{-2} for FRESH T0, 0.8652 ± 0.0277 mg.cm^{-2} for FIXED T0 (corresponding to a decrease of 14%), 0.8804 ± 0.0308 mg.cm^{-2} for FIXED T+7 (corresponding to a decrease of 13%) and 0.9184 ± 0.0131 mg.cm^{-2} for FIXED T+21 (corresponding to a decrease of 9%).

Table 1 presents the different parameters calculated from the permeation curve. The steady state flux Jss ranged from 79 ± 3 µg.cm^{-2}.h^{-1} (Fixed T+7) to 94 ± 4 µg.cm^{-2}.h^{-1} (FRESH T0). Significant differences were found between FRESH T0 and all FIXED samples ($p<0.05$).

No significant difference was, however, found between Fixed T0, Fixed T+7 and Fixed T+21 ($0.20 < p < 0.80$) (Table 1). The lag time to steady-state (t lag) was found to be 1.22 ± 0.17 h for FRESH T0, 1.11 ± 0.06 h for FIXED T0 (10% shorter), 0.83 ± 0.01 h for FIXED T+7 (32% shorter) and 0.88 ± 0.17 h for FIXED T+21 (28% shorter). No significant differences were found between FRESH T0 and FIXED T+21 ($0.1< p <0.22$), although significant differences were observed compared to FXED T+7 ($p = 0.02 <0.05$). The permeability coefficient (K_p) for FRESH was 4.71 ± 0.18 $cm.h^{-1}$, 3.99 ± 0.15 $cm.h^{-1}$ for FIXED T0 (-15%), 3.95 ± 0.13 $cm.h^{-1}$ for FIXED T+7 (-16%) and 4.10 ± 0.04 $cm.h^{-1}$ for FIXED T+21 (-13%). Significant differences were found between FRESN T0 and fixed samples ($0.01 < p < 0.03$). However, no significant differences were found between FIXED T0, FIXED T+7 and FIXED T+21 ($0.20 < p < 0.80$).

Table 1: *Steady state fluxes (J_{ss}), lag times (t_{lag}), permeability coefficients (k_p) obtained from cumulative amount profiles of caffeine through RHE samples (FRESH, FIXED T0, FIXED T+7and FIXED T+21). All data displayed as mean ± standard deviation of n = 3 experiments.*

	J_{SS} [µg .cm^{-2}.h^{-1}]	t_{lag} [h]	k_p [10^{-3}.cm .h^{-1}]
FRESH	*94.06 ± 3.69*	*1.22 ± 0.17*	*4.71 ± 0.18*
FIXED T0	*79.63 ± 2.91*	*1.10 ± 0.06*	*3.99 ± 0.15*
FIXED T+7	*79.01 ± 2.69*	*0.83 ± 0.01*	*3.95 ± 0.13*
FIXED T+21	*81.83 ± 0.75*	*0.88 ± 0.17*	*4.10 ± 0.04*

4. Discussion

It is well-known that formalin forms covalent bonds with the biochemical components of the sample, resulting in compositional and conformational changes, particularly in proteins and lipids [51]. CRS is a powerful chemical characterisation tool that can be used to collect information about the skin composition [33, 36, 52, 53]. Many studies reported in the literature have demonstrated the suitability of the technique to investigate physiological process such as cell and tissues maturation [54], to study hydration and NMF variations [55, 56], to monitor diffusion and penetration of active ingredients [40, 57] and also to study the effects of exogenous agents such as UV radiation [58, 59], or for the diagnosis of skin pathologies [60, 61]. Presently, CRS analysis performed on FRESH and FIXED samples enabled identification of significant modifications in proteins (Amide I random chain and β-sheet conformation, as

well as the α-helix and random coil secondary structures in Amide III, modifications in phenylalanine residues, tryptophan, and the Fermi doublet ring of tyrosine) but also in lipids (changes in the skeletal trans-conformation and gauche conformation of lipids). These modifications were particularly noticeable in the viable epidermis, compared to the stratum corneum and the polymeric support membrane layers, due the high protein content of this layer. The formalin-induced effects observed in this study are consistent with other studies, demonstrating the usefulness of the fixation process, and also the alterations it induces in the protein and lipid components of cells [51, 62, 63]. *Meade et al.* have reported that the fixation in formalin alters the vibrational freedom of membrane lipids by modifying the lipid CH scissoring and C-C skeletal conformational modes, possibly through a reaction of methylene glycol in aqueous formalin with unsaturated hydrocarbon chains [51]. *O Faolain et al.* have reported that the formalin fixation process leads to shifts in the Amide bands that are attributed to alterations in protein conformation and potential cross-linking. These changes are caused by the methylene glycol component of aqueous formalin [62]. *Draux et al.* have shown that formalin fixation of cancer cells can induce several changes in spectral information assigned to proteins, notably a shift in the Amide region (Amide I and Amide III) due to changes in protein conformation [63].

Formalin is a well-established fixative, used to preserve the structural and morphological characteristic of biological tissues [35, 36, 64]. However, the fixation protocol applied to skin models prior to permeation studies has received no attention in the literature. Although it has been shown to induce changes in the biochemical components of RHE models, the findings of this proof of concept indicate that the process does not result in a pronounced effect on the barrier function, as measured by permeation assays. The penetration tests indicate that the barrier remains functional in FIXED samples, based on the observation that the amount of caffeine permeated through the FRESH T0 and FIXED RHE models remained comparable to that of FRESH samples after 12h, with at most 15% difference. Similarly, for steady state fluxes, lag times and permeability coefficients, the variations were small, considering the 24 hours fixation protocol used. Indeed, Table 1 indicates that the permeation coefficient is consistently reduced in all FIXED samples compared to FRESH, indicating an increased barrier function.

Several works have demonstrated that freezing skin samples deteriorates the barrier function, regardless of the temperature used [22, 65, 66]. For instance, Nielsen *et al.* reported that the storage of excised abdominal human skin biopsies at -80°C for 21 days increased, up

to four-fold, the permeability coefficient of caffeine compared to fresh skin [22]. Additional studies performed with chromone acid and trichothecene mycotoxin corroborate the observations for human skin samples, with significant increases of 1.6-fold (cumulative amount) and 2.4-fold (permeation flux) for storage at -17°C for 2.5 days and 10 days at -60°C, respectively [20, 24]. Many studies in the literature investigating the effects of freezing were conducted on pig skin, is established as a skin model close to human skin. Sintov *et al.* found that storing pig skin at -20°C for 7 days resulted in a 2- to 8-fold increase in the permeability coefficient of caffeine [65] while Abdayem *et al.* demonstrated that the permeability coefficient of caffeine in pig ear skin increased up to 4 to 5 times after storage at -20°C for 1 day compared to fresh skin [66]. For Diclofenac sodium, L-DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine), permeation fluxes were found to be 5-fold and 3.8-fold higher in frozen pig ears stored at 20°C for two weeks [67]. For acyclovir and methyl salicylate, the cumulative amount permeated increased by 8-fold and 2-fold in porcine ear skin kept at -20°C for 6 weeks [68]. In comparison to the results found in literature based on testing various compounds on frozen human and pig skin, the 10-15% variations induced by the formalin fixation can be considered as extremely low and it supports the limited impact on the barrier function of samples. The study of Dancik *et al.*, conducted on RHE stored at -150°C, -80°C and -20°C for 1 and 10 weeks, provide a relevant comparison for *in vitro* skin models. It was found that, for resorcin, a 3 to 6-fold increase for the permeability coefficient resulted from the damage caused to the barrier function by freezing [25]. Although direct comparison between caffeine and resorcin is not possible, it is clear that constantly storing samples below zero greatly affects the permeability of skin samples beyond possible comparison to the fresh samples.

Although the study is meant as a proof of concept for the storage of skin sample as formalin fixed, it is relevant to note that commercialised RHE models are generally delivered as ready to use inserts that need to be used within 48 hours of delivery, according to manufacturer's recommendations. Many models cannot be purchased by the unit and RHE samples are commonly conditioned in 12 well plates and sold by the dozen. The workload for permeation studies including multiple formulas to test with replicates can rapidly become a fastidious task, especially for laboratories not equipped with automated systems. Furthermore, it has been demonstrated that the maturation of RHE models continues upon delivery and as such the permeation of a given compounds will differ over time [69]. Therefore, being able to store and keep RHE models from a single batch (to avoid the risk of inter-batch variability) at the same stage of maturation is also highly relevant. Moreover, the standard 2-4 weeks delay for delivery

requires meticulous planning of the experimental schedule. The ability to preserve the integrity of samples for a more flexible and cost-effective schedule would be of great benefit to the field of dermal research. Formalin fixation has presently been demonstrated to deliver a stable barrier function over a storage period of 3 weeks, opening perspectives for more ambitious permeation studies involving comparison of multiple active ingredients and/or formulation that cannot be conducted over a single day.

Overall, this proof-of-concept has demonstrated that, despite spectral variability in the major biochemical components observed using Raman Spectroscopy, the formalin fixation protocol does not impair the skin barrier function of the RHE samples. While freezing has been reported to greatly increase the permeability of caffeine, the permeation experiments have demonstrated a reduced penetration after fixation. Although this study is a proof-of-concept and additional investigation should be performed with model molecules with different physico-chemical properties, the indications are that the fixation protocol could significantly reduce the workload and the constraints of using of RHE models simultaneously for permeation studies.

5. Conclusion

This proof-of-concept has established that the formalin fixation protocol provided a stable storage of RHE models without extensive impairment of the barrier function. Although molecular changes in the different skin layers have been witnessed by CRS after the 24 hours fixation protocol, it has been highlighted that the permeation of caffeine remained comparable over 3 weeks. In comparison to reported effects of freezing in the literature, the formalin fixation led to variations in cumulated amount, time lag, flux and permeability coefficient for caffeine that were limited to 10-15% compared to FRESH samples. Although further investigation is needed, this proof of concept highlighted that chemical fixation can be less damaging than freezing and as such it represents a promising alternative for the storage of skin samples with more structural and morphological similarities to native skin. Additionally, the present study suggests that formalin fixation should also be considered to overcome the limited shelf life of RHE models, one of the major drawbacks in their use for permeation studies.

Acknowledgement: This research was funded by Ambition Recherche et Développement Centre Val de Project ARD CVL MINIONs (2020-00141275) and project APR-IR UFO (2020-00138875). The Raman microspectrometer used is this study was found by the FEDER (Fonds Europeen de Developpement Regional), grant number 2017-EX003256.

Conflict of interest: None to declare

References

1. Dancik Y, Jepps OG, Roberts MS Beyond Stratum Corneum. 42

2. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA (2014) The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids 1841:295–313

3. Elias PM (1983) Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation. J Invest Dermatol 80:S44–S49

4. Monteiro-Riviere NA (2010) Toxicology of the Skin. CRC Press

5. OCDE (2004) Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method.

6. Franz TJ (1975) Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. J Invest Dermatol 64:190–195

7. No OT (2004) 428: skin absorption: in vitro method. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 4:

8. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean (2008) List of basic sources in English for a medical faculty library. 117

9. European Commission. Directorate-General for Health and Consumers (2010) Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. European Commission, BE

10. (2006) Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients, updated March 2006. 12

11. USEPA (2004) In vitro dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to the occupational safety and health administration; final rule. Fed Regist 69:22402–22441

12. Marks R, Leveque J-L, Voegeli R (2002) The Essential Stratum Corneum. https://doi.org/10.1201/b14296

13. Netzlaff F, Lehr C-M, Wertz PW, Schaefer UF (2005) The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. Eur J Pharm Biopharm 60:167–178

14. Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W, et al (2008) The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study. Altern Lab Anim 36:161–187

15. Küchler S, Strüver K, Friess W (2013) Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. Expert Opin Drug Metab Toxicol 9:1255–1263

16. Planz V, Lehr C-M, Windbergs M (2016) In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. J Controlled Release 242:89–104

17. Józsa L, Nemes D, Pető Á, Kósa D, Révész R, Bácskay I, Haimhoffer Á, Vasvári G (2023) Recent Options and Techniques to Assess Improved Bioavailability: In Vitro and Ex Vivo Methods. Pharmaceutics 15:1146

18. Bravo D, Rigley TH, Gibran N, Strong DM, Newman-Gage H (2000) Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. Burns 26:367–378

19. Barbero AM, Frasch HF (2016) Effect of frozen human epidermis storage duration and cryoprotectant on barrier function using two model compounds. Skin Pharmacol Physiol 29:31–40

20. Swarbrick J, Lee G, Brom J (1982) Drug permeation through human skin: I. Effects of storage conditions of skin. J Invest Dermatol 78:63–66

21. Dennerlein K, Schneider D, Göen T, Schaller KH, Drexler H, Korinth G (2013) Studies on percutaneous penetration of chemicals–impact of storage conditions for excised human skin. Toxicol In Vitro 27:708–713

22. Nielsen JB, Plasencia I, Sørensen JA, Bagatolli LA (2011) Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent in vitro percutaneous penetration. Skin Pharmacol Physiol 24:93–102

23. Payne OJ, Graham SJ, Dalton CH, Spencer PM, Mansson R, Jenner J, Azeke J, Braue E (2013) The effects of sulfur mustard exposure and freezing on transdermal penetration of tritiated water through ex vivo pig skin. Toxicol In Vitro 27:79–83

24. Kemppainen BW, Riley RT, Pace JG, Hoerr FJ (1986) Effects of skin storage conditions and concentration of applied dose on [3H] T-2 toxin penetration through excised human and monkey skin. Food Chem Toxicol 24:221–227

25. Dancik Y, Kichou H, Eklouh-Molinier C, Soucé M, Munnier E, Chourpa I, Bonnier F (2020) Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation. Pharmaceutics 12:1041

26. Ge L, Huang Z, Wei H (2011) Skin graft preservation. Skin Grafts-Indic. Appl. Curr. Res.

27. Verbeken G, Verween G, De Vos D, Pascual B, De Corte P, Richters C, De Coninck A, Roseeuw D, Ectors N, Rose T (2012) Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. Cell Tissue Bank 13:1–7

28. Petrilli R, Eloy JO, Praça FSG, Del Ciampo JO, Fantini MAC, Fonseca MJV, Bentley M (2016) Liquid crystalline nanodispersions functionalized with cell-penetrating peptides for topical delivery of short-interfering RNAs: a proposal for silencing a pro-inflammatory cytokine in cutaneous diseases. J Biomed Nanotechnol 12:1063–1075

29. Estracanholli ÉA, Praça FSG, Cintra AB, Pierre MBR, Lara MG (2014) Liquid crystalline systems for transdermal delivery of celecoxib: in vitro drug release and skin permeation studies. Aaps Pharmscitech 15:1468–1475

30. Barbero AM, Frasch HF (2009) Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. Toxicol In Vitro 23:1–13

31. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985) Formaldehyde fixation. J Histochem Cytochem 33:845–853

32. Ali SM, Bonnier F, Tfayli A, Lambkin H, Flynn K, McDonagh V, Healy C, Clive Lee T, Lyng FM, Byrne HJ (2013) Raman spectroscopic analysis of human skin tissue sections ex-vivo: evaluation of the effects of tissue processing and dewaxing. J Biomed Opt 18:061202–061202

33. Gazi E, Dwyer J, Lockyer NP, Miyan J, Gardner P, Hart C, Brown M, Clarke NW (2005) Fixation protocols for subcellular imaging by synchrotron-based Fourier transform infrared microspectroscopy. Biopolym Orig Res Biomol 77:18–30

34. Bonnier F, Knief P, Lim B, Meade AD, Dorney J, Bhattacharya K, Lyng FM, Byrne HJ (2010) Imaging live cells grown on a three dimensional collagen matrix using Raman microspectroscopy. Analyst 135:3169–3177

35. Dorney J, Bonnier F, Garcia A, Casey A, Chambers G, Byrne HJ (2012) Identifying and localizing intracellular nanoparticles using Raman spectroscopy. Analyst 137:1111–1119

36. Farhane Z, Bonnier F, Casey A, Maguire A, O'Neill L, Byrne HJ (2015) Cellular discrimination using in vitro Raman micro spectroscopy: the role of the nucleolus. Analyst 140:5908–5919

37. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002) Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. Am J Pathol 161:1961–1971

38. Zillich OV, Schweiggert-Weisz U, Hasenkopf K, Eisner P, Kerscher M (2013) Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. Int J Cosmet Sci 35:491–501

39. Lieber CA, Mahadevan-Jansen A (2003) Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. Appl Spectrosc 57:1363–1367

40. Miloudi L, Bonnier F, Tfayli A, Yvergnaux F, Byrne HJ, Chourpa I, Munnier E (2018) Confocal Raman spectroscopic imaging for in vitro monitoring of active ingredient penetration and distribution in reconstructed human epidermis model. J Biophotonics 11:e201700221

41. Tfayli A, Piot O, Draux F, Pitre F, Manfait M (2007) Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. Biopolymers 87:261–274

42. Tfaili S, Gobinet C, Josse G, Angiboust J-F, Manfait M, Piot O (2012) Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. The Analyst 137:3673–3682

43. Guillard E, Tfayli A, Manfait M, Baillet-Guffroy A (2011) Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part II: effect of chains lengths and head group structures. Anal Bioanal Chem 399:1201–1213

44. Tfayli A, Guillard E, Manfait M, Baillet-Guffroy A (2010) Thermal dependence of Raman descriptors of ceramides. Part I: effect of double bonds in hydrocarbon chains. Anal Bioanal Chem 397:1281–1296

45. Resta V, Quarta G, Lomascolo M, Maruccio L, Calcagnile L (2015) Raman and Photoluminescence spectroscopy of polycarbonate matrices irradiated with different energy 28Si+ ions. Vacuum 116:82–89

46. Frushour BG, Koenig JL (1975) Raman scattering of collagen, gelatin, and elastin. Biopolym Orig Res Biomol 14:379–391

47. Stuart BH (1996) Temperature studies of polycarbonate using Fourier transform Raman spectroscopy. Polym Bull 36:341–346

48. Rodrigues F, Alves AC, Nunes C, Sarmento B, Amaral MH, Reis S, Oliveira MBP (2016) Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option? Int J Pharm 513:496–503

49. OECD (2011) Guidance Notes on Dermal Absorption, Series on Testing and Assessment No. 156. OECD 36:1–72

50. Pulsoni I, Lubda M, Aiello M, Fedi A, Marzagalli M, von Hagen J, Scaglione S (2022) Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. SLAS Technol.

51. Meade AD, Clarke C, Draux F, Sockalingum GD, Manfait M, Lyng FM, Byrne HJ (2010) Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. Anal Bioanal Chem 396:1781–1791

52. Byrne HJ, Bonnier F, Farhane Z (2019) Two-dimensional correlation analysis of Raman microspectroscopy of subcellular interactions of drugs in vitro. J Biophotonics 12:e201800328

53. Farhane Z, Bonnier F, Maher MA, Bryant J, Casey A, Byrne HJ (2017) Differentiating responses of lung cancer cell lines to Doxorubicin exposure: in vitro Raman micro spectroscopy, oxidative stress and bcl-2 protein expression. J Biophotonics 10:151–165

54. Huser T, Chan J (2015) Raman spectroscopy for physiological investigations of tissues and cells. Adv Drug Deliv Rev 89:57–70

55. Crowther JM, Sieg A, Blenkiron P, Marcott C, Matts PJ, Kaczvinsky JR, Rawlings AV (2008) Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. Br J Dermatol 159:567–577

56. Crowther JM, Matts PJ, Kaczvinsky JR (2012) Changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration by moisturizers. Treat Dry Skin Syndr Art Sci Moisturizers 545–560

57. Stella A, Bonnier F, Tfayli A, Yvergnaux F, Byrne HJ, Chourpa I, Munnier E, Tauber C (2020) Raman mapping coupled to self-modelling MCR-ALS analysis to estimate active cosmetic ingredient penetration profile in skin. J Biophotonics 13:e202000136

58. Assi A, Tfaili S, Quatela A, Bonnier F, Baillet-Guffroy A, Tfayli A (2022) Studying the effects of suberythemal UV doses on the human stratum corneum by in vivo confocal Raman spectroscopy. Eur J Dermatol 32:338–346

59. Ali S, Bonnier F, Ptasinski K, Lambkin H, Flynn K, Lyng F, Byrne H (2013) Raman spectroscopic mapping for the analysis of solar radiation induced skin damage. Analyst 138:3946–3956

60. Lieber CA, Majumder SK, Billheimer D, Ellis DL, Mahadevan-Jansen A (2008) Raman microspectroscopy for skin cancer detection in vitro. J Biomed Opt 13:024013-024013–9

61. Zhao J, Lui H, Kalia S, Zeng H (2015) Real-time Raman spectroscopy for automatic in vivo skin cancer detection: an independent validation. Anal Bioanal Chem 407:8373–8379

62. Faolain EO, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, McNamara M, Byrne HJ, Lyng FM (2005) A study examining the effects of tissue processing on human tissue sections using vibrational spectroscopy. Vib Spectrosc 38:121–127

63. Draux F, Gobinet C, Sulé-Suso J, Trussardi A, Manfait M, Jeannesson P, Sockalingum GD (2010) Raman spectral imaging of single cancer cells: probing the impact of sample fixation methods. Anal Bioanal Chem 397:2727–2737

64. Stefanakis M, Bassler MC, Walczuch TR, Gerhard-Hartmann E, Youssef A, Scherzad A, Stöth MB, Ostertag E, Hagen R, Steinke MR (2023) The Impact of Tissue Preparation on Salivary Gland Tumors Investigated by Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy. J Clin Med 12:569

65. Sintov AC, Greenberg I (2014) Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. Int J Pharm 471:516–524

66. Abdayem R, Roussel L, Zaman N, Pirot F, Gilbert E, Haftek M (2015) Deleterious effects of skin freezing contribute to variable outcomes of the predictive drug permeation studies using hydrophilic molecules. Exp Dermatol 24:972–974

67. Sintov AC (2017) Cumulative evidence of the low reliability of frozen/thawed pig skin as a model for in vitro percutaneous permeation testing. Eur J Pharm Sci 102:261–263

68. Morin M, Runnsjö A, Ruzgas T, Engblom J, Björklund S (2023) Effects of storage conditions on permeability and electrical impedance properties of the skin barrier. Int J Pharm 637:122891

69. Bakar J, Michael-Jubeli R, El Khoury R, Hamla S, Assi A, Baillet-Guffroy A, Tfayli A (2021) Assessment of the skin barrier function in the reconstructed human epidermis using a multimodal approach at molecular, tissue and functional levels. Analyst 146:4649–4658

Supplementary materials:

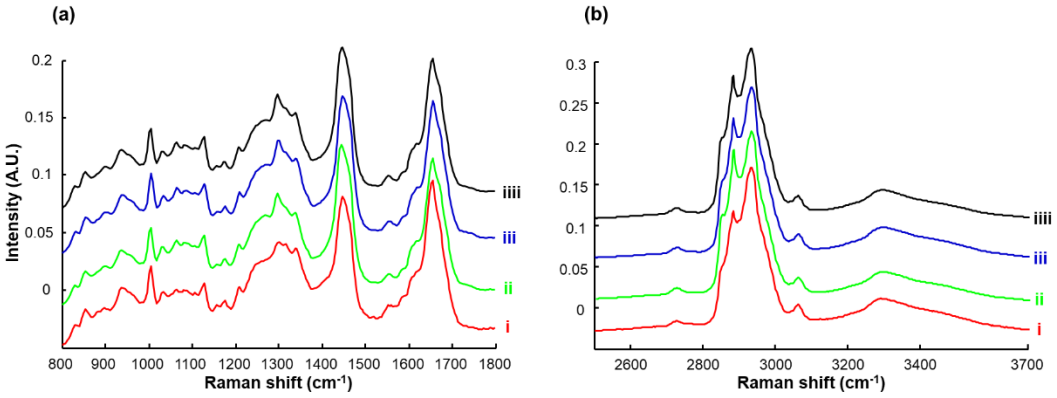


Figure S1: *(a) mean FPR spectra (800 -1800 cm^{-1}) of EpiSkin® RHE stratum corneum: (i): fresh, (ii): FIXED T0, (iii): FIXED T+7 and (iiii): FIXED T+21. (b) Representative high wavenumbers spectra (2500-3700 cm^{-1}) of RHE stratum corneum: (i): fresh, (ii): FIXED T0, (iii): FIXED T+7 and (iiii): FIXED T+21. Spectra are offset for clarity.*

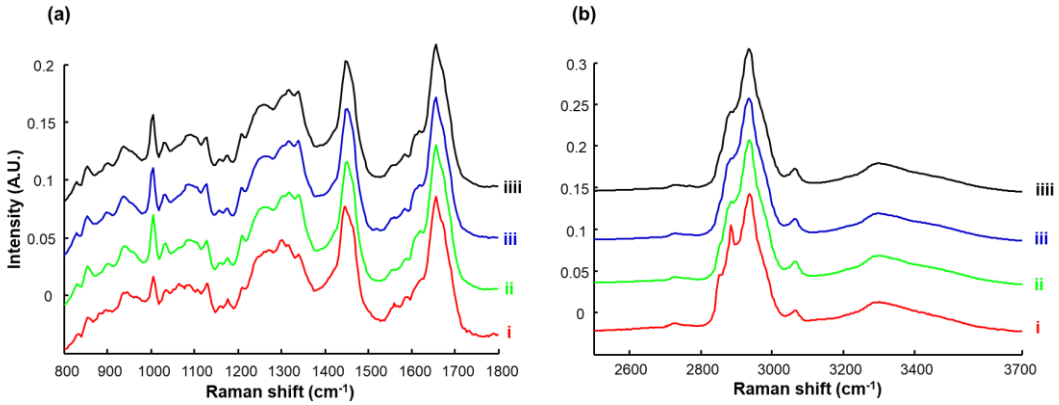


Figure S2: *(a) Representative fingerprint spectra (800 -1800 cm^{-1}) of EpiSkin® RHE viable epidermis: (i): fresh, (ii): FIXED T0, (iii): FIXED T+7 and (iiii): FIXED T+21. (b) Representative high wavenumbers spectra (2500-3700 cm^{-1}) of EpiSkin® RHE viable epidermis: (i): fresh, (ii): FIXED T0, (iii): FIXED T+7 and (iiii): FIXED T+21. Spectra are offset for clarity.*

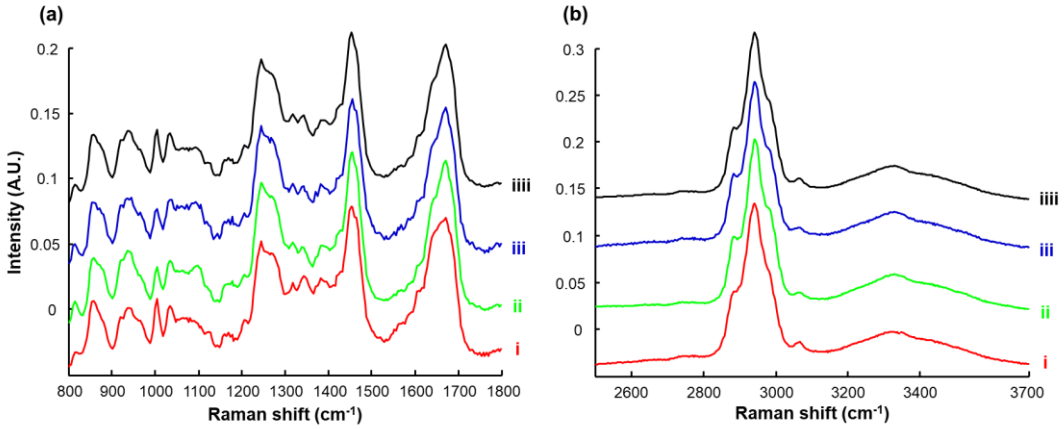


Figure S3: *(a) Representative fingerprint spectra (800 -1800 cm−1) of EpiSkin® RHE Polymeric support membrane: (i): fresh, (ii): FIXED T0, (iii): FIXED T+7 and (iiii): FIXED T+21. (b) Representative high wavenumbers spectra (2500-3700 cm−1) of EpiSkin® RHE Polymeric support membrane: (i): fresh, (ii): FIXED T0, (iii): FIXED T+7 and (iiii): FIXED T+21. Spectra are offset for clarity.*

V. Apport de la micro-spectroscopie Confocale Raman pour l'objectivation sur peau humaine

Les travaux expérimentaux présentés dans ce chapitre apportent des réponses concrètes aux interrogations soulevées lors des études expérimentales précédentes (chapitres III et IV) concernant les performances de la micro-spectroscopie Confocale Raman appliquée aux études de la peau humaine. Ce chapitre comprend deux études expérimentales. La première étude a été publiée (#Article N° 6), tandis que la deuxième étude est présentée sous forme de sous-chapitre. Selon les directives et les considérations législatives des tests de diffusion cutanée (voir chapitre I, section I.2.1), seule la méthode du tape stripping est recommandée pour évaluer la quantité de molécule active pénétrant dans la peau. Toutefois, cette approche reste invasive car elle implique le retrait de couches du stratum corneum. De plus, elle présente des limitations en termes de variabilité, liées à des facteurs tels que l'opérateur et la pression appliquée lors du retrait des bandes adhésives. C'est pourquoi il existe une forte demande pour des méthodes non invasives, et c'est dans ce contexte que la micro-spectroscopie Raman (CRM) pourrait jouer un rôle prépondérant. La CRM est de plus en plus utilisée pour caractériser la peau et suivre la distribution des ingrédients actifs. Cependant, cette technique n'est pas encore officiellement reconnue par les autorités de régulation telles que la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis, l'Agence européenne des médicaments (EMA) et le Conseil international pour l'harmonisation (ICH), qui se basent sur des critères statistiques pour évaluer numériquement une méthode. Il convient de noter que, même après deux ou trois décennies de recherche sur l'application de la CRM à la peau, cette méthode n'a jamais été intégrée dans les recommandations officielles. Une des explications réside dans le fait que la technique n'a jamais été réellement évaluée selon les critères analytiques mentionnés dans les directives, qui sont pourtant essentiels pour la validation des techniques analytiques.

Dans ce contexte spécifique, la première partie de ce chapitre aborde la quantification des performances de la CRM appliquée à la peau, en mettant l'accent sur des aspects tels que la sensibilité, la limite de détection et la sélectivité. L'objectif principal est de répondre de manière précise et quantitative aux exigences réglementaires en vigueur. Il convient de noter que la validation des méthodes analytiques repose généralement sur une comparaison avec une référence établie. Cependant, dans le cas spécifique de la spectroscopie Raman appliquée à la peau, déterminer une référence in vivo appropriée s'avère complexe en raison des contraintes inhérentes aux méthodes invasives. Cette problématique a donc nécessité une réflexion approfondie afin de développer un modèle in vitro représentatif. Ce modèle in vitro permet de

faire varier la concentration de l'actif étudié, offrant ainsi une courbe de calibration essentielle pour l'évaluation des critères de performance d'une technique analytique. À l'instar des mesures in vivo qui se concentrent sur le stratum corneum (SC), ce modèle in vitro se focalise sur l'étude du SC isolé. Ainsi, tout le raisonnement logique qui sous-tend le développement de ce modèle in vitro met en évidence l'importance de sa pertinence et de son adéquation pour l'évaluation des performances de la CRM appliquée à la peau.

La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la démonstration des effets de l'utilisation de la CRM sur des biopsies de peau, préalablement aux tests de perméation. Il est important de noter que la CRM est largement reconnue comme une technique de mesure in vivo non invasive et non destructive, et plusieurs équipements dédiés sont maintenant disponibles sur le marché. Ces équipements sont principalement utilisés pour l'étude des pathologies dermatologiques, mais ils peuvent également être utilisés pour caractériser la pénétration cutanée d'actifs. Cependant, à notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à démontrer l'absence d'effet de l'irradiation laser sur la fonction barrière de la peau lors d'une étude de pénétration cutanée d'une molécule active. Il est donc essentiel de combler cette lacune en réalisant des expériences visant à évaluer spécifiquement l'impact de l'irradiation laser utilisée dans la CRM sur l'intégrité et la fonction de la barrière cutanée. Cette approche permettra d'obtenir des données solides et fiables concernant l'utilisation de la CRM dans les études de pénétration cutanée, renforçant ainsi sa pertinence et sa fiabilité en tant qu'outil d'évaluation des propriétés de la peau.

Les travaux de ce chapitre ont permis :

(i) D'établir, pour la première fois, des critères numériques pour évaluer les performances analytiques de la CRM, sur un modèle in vitro permettant de faire varier les concentrations d'une molécule active. Cela a permis de mettre en place une démarche de validation de la CRM.

(ii) Démontrer expérimentalement le caractère non invasif de la technique pour une utilisation préalable aux tests de perméation.

V.1 Etude 1 : Estimation des performances analytiques de la spectroscopie Raman pour la quantification de la résorcine dans le Stratum Corneum humain

V.1.1 Objectif :

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances analytiques de la spectroscopie Raman en termes de limite de détection (LOD), de précision, d'exactitude, de sensibilité (SEN) et de sélectivité (SEL), en accord avec les critères de qualité définis par les organismes de réglementation tels que l'ICH, la FDA et l'EMA, pour quantifier une molécule modèle, la résorcine, dans le stratum corneum.

V.1.2 Développements méthodologiques :

Lors de notre étude, nous avons réalisé des tests expérimentaux pour évaluer les performances analytiques en fonction de la longueur d'onde du laser utilisé pour illuminer les échantillons, en combinaison avec des objectifs présentant différentes ouvertures numériques et grossissements. Plusieurs questions ont été soulevées, telles que le choix de la longueur d'onde pour atteindre un compromis entre la reproductibilité des spectres (réduction des distorsions de ligne de base) et l'intensité du signal pour une détection optimale de la résorcine, même à de faibles concentrations. De plus, le choix de l'objectif était également crucial pour couvrir toute l'épaisseur du stratum corneum isolé (~10 µm) et éviter une analyse en profondeur.

Ainsi, deux longueurs d'onde de laser ont été testées, à savoir 532 nm et 633 nm, avec différentes combinaisons d'objectifs, notamment 20x / 0.5 et 50x / 0.8. Notre réflexion s'est basée sur le principe de confocalité (voir Chapitre I, section I.3.3) et les résolutions calculées à partir du laser et de l'objectif utilisé, à savoir la résolution axiale et latérale (voir équations 20 et 21 du Chapitre I).

Un autre défi était lié à la sensibilité de la technique pour détecter la résorcine, ainsi qu'à sa capacité à différencier la molécule de résorcine du stratum corneum. À cet effet, nous avons enregistré des spectres sur du stratum corneum exposé à une concentration de 5 g/L de résorcine (au milieu de la plage utilisée) en utilisant les deux lasers et les deux combinaisons d'objectifs. L'analyse visuelle des spectres bruts a montré que le laser à 532 nm offrait une meilleure intensité du signal avec moins de distorsion de la ligne de base par rapport au laser à 633 nm, ce qui était idéal pour détecter de faibles concentrations de résorcine dans le stratum corneum isolé. En ce qui concerne les objectifs, le 50x / 0.8 offrait une meilleure résolution axiale et latérale. Cependant, son volume focal ne permettait pas de couvrir toute l'épaisseur du stratum

corneum isolé, ce qui entraînait des variations interindividuelles. En revanche, l'objectif 20x / 0.5 permettait d'avoir un plus grand volume d'échantillonnage, ce qui permettait d'obtenir un spectre moyen représentatif de toute l'épaisseur du stratum corneum isolé.
En conséquence, pour cette étude, les analyses par spectroscopie Raman confocale ont été réalisées avec un laser de 532 nm et un objectif de 20x / 0.5.

V.1.3 Matériels et méthodes :

Afin d'établir un protocole de quantification de la résorcine in vitro, des disques de stratum corneum (SC) humain ont été immergés dans des solutions de résorcine (PBS).
Tout d'abord, les disques de SC ont été décongelés à température ambiante pendant une heure et pesés. Ensuite, les disques de SC ont été complètement immergés dans 4 mL de solution de résorcine dans des boîtes de Petri pendant 24 heures à température ambiante, permettant une infusion complète jusqu'à l'atteinte de l'équilibre.
Pour l'analyse du SC par HPLC, des solutions de résorcine de 4, 10 et 25 g/L dans du PBS ont été utilisées. Pour chaque concentration, trois échantillons de SC ont été préparés. Après une immersion de 24 heures, les SC ont été délicatement retirés des solutions de résorcine à l'aide de pinces et placés dans 2 mL de méthanol pendant 8 heures pour extraire la résorcine. Le surnageant a ensuite été analysé par HPLC.
Pour l'analyse du SC par spectroscopie Raman, une gamme de solutions de résorcine dans du PBS a été préparée. Les concentrations de 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25 et 50 g/L ont été respectivement identifiées comme C2, C3, C4, C5, C6, C7 et C8. Un témoin négatif de SC immergé dans du PBS a également été préparé (C1). Après une immersion de 24 heures, les disques de SC ont été collectés, déposés sur des substrats de fluorure de calcium (CaF_2), séchés avec des cotons-tiges pour éliminer l'excès de résorcine à la surface des échantillons de SC, puis séchés à l'air à température ambiante avant d'être analysés par CRM.
L'analyse par CRM a été réalisée à l'aide d'un microspectromètre Raman équipé d'une source laser de 532 nm réglée à 10 mW pour les échantillons, avec une résolution spectrale d'environ 5 cm^{-1}. Les spectres ont été enregistrés avec un objectif 20x/0,5. Le temps d'acquisition a été fixé à 30 s avec 2 accumulations. Au total, 180 spectres ont été enregistrés par échantillon, soit un total de 1440 spectres pour l'ensemble de l'étude.
L'analyse des données a été effectuée à l'aide de Matlab® (MathWorks, Natick, MA, États-Unis). Les spectres ont été coupés entre 400 et 1800 cm^{-1} afin d'affiner l'analyse dans la région d'empreinte digitale. La région d'empreinte digitale cutanée est un excellent choix pour étudier la pénétration et les effets d'une molécule active sur la peau, car elle présente de nombreuses

caractéristiques Raman distinctes et spécifiques à chaque molécule. Les pics de raies présents dans cette région permettent de suivre précisément la présence et le comportement de la molécule, offrant ainsi une approche idéale pour ces analyses. De plus, dans notre cas, le pic utilisé pour quantifier la résorcine se situe entre 724 et 794 cm^{-1}. Ce pic a été choisi car il ne se chevauche pas avec les pics endogènes de la peau, offrant ainsi une meilleure sélectivité pour l'analyse.

Une correction de ligne de base Lieber a été appliquée en utilisant une fonction de correction linéaire avec 10 itérations, suivie d'une normalisation vectorielle unitaire.

L'analyse en composantes principales (PCA) a été utilisée en premier lieu pour examiner la variabilité au sein de l'ensemble des données spectrales collectées (voir Chapitre I, section I.3.4.1.1). Ensuite, des rapports calculés à partir de l'aire sous la courbe (AUC) des bandes caractéristiques de la résorcine (724 - 794 cm^{-1}) et des protéines/lipides (1400 - 1500 cm^{-1}) ont été utilisés pour effectuer une analyse de régression linéaire des spectres Raman. Enfin, une analyse PLSR (régression par moindres carrés partiels) croisée a été appliquée pour effectuer une analyse quantitative (voir Chapitre I, section I.3.4.1.2) dans la région d'empreinte digitale (400-1800 cm^{-1}). En appliquant la PLSR à nos données, un modèle quantitatif a été construit pour prédire les concentrations de résorcine dans le SC.

À partir des résultats de la PLSR, divers critères statistiques tels que le rapport de déviation de performance (RPD), la précision (BCMSEP), la sensibilité (SEN) et la sélectivité (SEL) peuvent être calculés.

V.1.4 Équations mathématiques utilisées pour le calculs des performances analytiques :

La Linéarité : Le coefficient de corrélation (R^2) est généralement utilisé pour représenter la linéarité d'un modèle. Pour le rapport de bande AUC, le R^2 peut être utilisé pour évaluer la linéarité entre l'intensité de la réponse instrumentale (intensité de bande Raman) en fonction de la concentration. Dans l'analyse PLSR, le R^2 reflète la linéarité entre les concentrations prédites par rapport aux concentrations observées. Dans les deux cas, une valeur aussi proche que possible de 1 est attendue, indicateur de la fiabilité du modèle linéaire.

La Précision et l'exactitude : La précision correspond à la concordance entre une série de mesures, tandis que l'exactitude correspond au degré de proximité entre les mesures calculées et prédites. Les deux ont été calculés selon les lignes directrices de l'ICH.

L'exactitude d'une régression linéaire peut être exprimée en utilisant l'erreur quadratique moyenne (RMSE) (1) :

$$\mathrm{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (1)$$

Où y_i représente les valeurs mesurées (c'est-à-dire préparées), $\hat{y}_i$ représente les valeurs prédites et n est le nombre d'échantillons.

Pour la PLSR, le RMSE est donné sous forme de RMSECV ou de RMSEP calculés respectivement pour les modèles de calibration (ensemble d'entraînement) et de prédiction (ensemble de test).

De plus, la moyenne corrigée de l'erreur quadratique moyenne de prédiction (BCMSEP) peut aussi être un bon indicateur de la précision du modèle, calculée selon l'équation (2). Une faible valeur de BCMSEP correspond à une grande précision du modèle.

$$\mathrm{BCMSEP} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2 - \left[\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)\right]^2/n}{n-1} \quad (2)$$

La Limite de détection (LOD) : Les lignes directrices de l'IUPAC définissent la limite de détection (LOD) comme la plus faible quantité d'analyte pouvant être distinguée du blanc (absence d'analyte). Selon les recommandations disponibles des autorités réglementaires telles que la FDA, l'EMA et l'ICH, la LOD à partir d'une analyse univariée peut être calculée comme suit :

$$\mathrm{LOD_{AUC}} = 3.3 \cdot \frac{S_{C1}}{a} \quad (3)$$

Où $\mathrm{LOD_{AUC}}$ est la concentration la plus faible détectable calculée, 3.3 est la valeur t du test de Student obtenue avec une probabilité de 5 % et a est la pente du modèle de régression linéaire.

S_{C1} est défini comme l'écart type de la réponse et peut être déterminé en utilisant deux approches :

(i) S_{C1} peut être l'écart type d'un échantillon blanc, par exemple l'échantillon C1.

(ii) S_{C1} peut être défini comme l'écart type résiduel d'une droite de régression, c'est-à-dire le RMSE.

Ces méthodes de calcul estiment toutes, l'écart l'intensité du signal mesuré 'y', Dans l'équation (3), S_{C1} est divisé par la pente pour convertir la valeur de LOD de l'intensité Raman en concentrations. Le calcul peut être étendu aux résultats de la PLSR, en calculant $\mathrm{LOD_{PLSR}}$ comme suit :

$$\mathrm{LOD_{PLSR}} = 3.3 \cdot \mathrm{RMSECV} \quad (4)$$

Tout comme SC_1 dans l'équation (3), le RMSE de validation croisée (RMSECV) calculé à partir des ensembles de données d'entraînement peut être déterminé en incluant toutes les

concentrations C1-C8 analysées ou uniquement calculé à partir de la plus faible concentration analysée (C1).

Sensibilité : Selon les lignes directrices de l'ICH, la sensibilité est la plus faible concentration d'analyte pouvant être mesurée avec une précision et une exactitude acceptable. La sensibilité a été calculée selon la méthode de Li et al., et le signal net de l'analyte (NAS) développé par Lorber et al., en utilisant les équations (5) et (6) :

$$\mathrm{SEN_i} = \frac{\mathrm{NAS_i}}{\mathrm{y_i}} \quad (5)$$

$$\mathrm{NAS_i} = (\mathrm{x_i} \cdot \mathrm{b}) \cdot (\mathrm{b^T} \cdot \mathrm{b})^{-1} \cdot \mathrm{b^T} \quad (6)$$

La sensibilité (SEN) est rapportée comme une seule valeur moyennée pour toutes les concentrations analysées, où x_i est un spectre d'échantillon, b est un vecteur du coefficient de régression de la PLSR, b^T est son vecteur transposé et y_i est la concentration de la résorcine mesurée dans le SC.

Sélectivité : La sélectivité est une mesure de la capacité d'une méthode à déterminer un composé particulier dans les matrices analysées sans interférence d'autres composants. La sélectivité a été calculée selon la méthode de Li et al., en utilisant l'équation (7) :

$$\mathrm{SEL_i} = \frac{\|\mathrm{NAS_i}\|}{\|\mathrm{x_i}\|} \quad (7)$$

La sélectivité (SEL) est rapportée en moyenne pour toutes les concentrations analysées. On utilise le vecteur NAS_i et xi est le spectre de l'échantillon.

Ratio d'écart de performance (RPD) : Le RPD est le rapport entre l'écart type des valeurs mesurées de l'ensemble de calibration, divisé par le RMSEP. Plus la valeur du RPD est élevée, meilleure est la performance du modèle. Les valeurs supérieures à 2,5 sont acceptables, les valeurs supérieures à 5 sont adéquates pour le contrôle qualité, et les valeurs supérieures à 10 sont considérées comme excellentes. Il est calculé comme suit :

$$\mathrm{RPD} = \frac{\mathrm{S_{Ci}}}{\mathrm{RMSEP}} \quad (8)$$

S_{Ci} est l'écart type des valeurs mesurées de chaque concentration de C1 à C8.

Les Coefficients de régression : Les coefficients de régression ont également été utilisés pour visualiser les variables (wavenumbers) utilisées par l'algorithme PLSR. Ils peuvent être interprétés de manière similaire aux spectres et fournissent une représentation visuelle de la sélectivité moléculaire.

V.1.5 Résultats :

V.1.5.1 Validation du protocole de préparation des échantillons :

Dans le cadre de l'étude, un protocole a été développé pour permettre une variation systématique de la masse de résorcine dans le SC. La masse de résorcine par masse de SC a été déterminée par HPLC en fonction des concentrations de résorcine des solutions utilisées comme milieu d'immersion. L'équation $Y = 0{,}0051 \cdot X + 0{,}0027$ et la valeur R^2 de 0,998 confirment la proportionnalité obtenue. L'analyse confirme que les échantillons de SC immergés dans des solutions de résorcine pendant 24 heures atteignent un équilibre et qu'il existe une relation linéaire entre les concentrations des solutions utilisées pour immerger les disques de SC et la concentration résultante dans les tissus, exprimée en mg de résorcine/mg de SC. Par conséquent, une régression linéaire a été utilisée comme courbe d'étalonnage pour déterminer la concentration de résorcine dans les échantillons de SC analysés par spectroscopie Raman.

V.1.5.2 Caractérisation spectrale du stratum corneum humain et de la résorcine par microscopie Raman confocale (CRM) :

Les spectres Raman moyens du SC témoin (C1) et du SC imprégné de différentes concentrations de résorcine (C2 à C8) pendant 24 heures ont été analysés. Les spectres Raman du SC imprégné révèlent une augmentation des bandes spécifiques de résorcine dans le SC en fonction de la concentration des solutions utilisées, notamment pour les bandes à 532 cm^{-1}, 610 cm^{-1} et 741 cm^{-1}, qui se situent dans une région spectrale où les caractéristiques des constituants de la peau sont absentes. Les modes de vibration, tels que la respiration du cycle aromatique (déformation C-C=C) des acides aromatiques, peuvent être partagés entre le SC et la résorcine, bien que les positions des pics dans les échantillons C1 à C8 restent spécifiques à leur composition chimique. Il est intéressant de noter que le pic observé à 1005 cm^{-1} dans l'échantillon témoin (C1) se déplace progressivement vers 1001 cm^{-1} avec l'augmentation de la concentration de résorcine (C2-C8), accompagné d'une augmentation significative de l'intensité de la bande. Bien que ces bandes se chevauchent avec celles provenant des contributions des protéines et des lipides endogènes dans cette région spectrale de la région d'empreinte digitale, à mesure que la concentration de résorcine dans les tissus augmente, elles deviennent progressivement dominantes dans les signatures spectrales obtenues (C8).

V.1.5.3 Analyse des données par ACP :

Les résultats mettent en évidence que l'ACP est un outil puissant pour visualiser la variabilité spectrale et détecter de subtiles modifications des caractéristiques. La CP1 capture à la fois la variabilité systématique des échantillons imprégnés de différentes concentrations de

résorcine et une certaine variabilité intra-échantillon. Étant donné que la peau est une matrice biologique complexe, il est prévisible que la distribution de la résorcine à travers le SC présente un certain degré d'hétérogénéité, inhérent aux systèmes biologiques qui sont naturellement hétérogènes. La structure hétérogène des cornéocytes enchâssés dans la matrice lipidique du SC entraîne une distribution inégale de la résorcine hydrophile (log KOW = 0,78, coefficient de partition octanol/eau). Même si les données ont été enregistrées avec un objectif 20x pour augmenter la taille du spot à environ 1,3 µm, il est naturel d'observer une telle variation spectrale. En effet, l'objectif de l'étude est spécifiquement de calculer les performances analytiques pour la quantification dans le SC. Par conséquent, la variabilité liée aux propriétés biochimiques est intégrée dans les données collectées.

La CP2 met en évidence une variabilité supplémentaire due à l'hétérogénéité biologique spécifique au SC et représente également la variabilité biologique intra-échantillon.

V.1.5.4 L'analyse des données par les AUC (aires sous la courbe)

La régression linéaire basée sur les AUC a été construite en utilisant le rapport intégré de l'aire sous la courbe (AUC) des bandes Raman du SC (1400-1500 cm^{-1}) par rapport à celles de la résorcine (724-794 cm^{-1}). La régression montre une corrélation linéaire avec une valeur de $R^2 = 0,999$. La proportionnalité entre le rapport de bande calculé à partir des spectres Raman et la concentration de résorcine dans les échantillons de SC confirme que la configuration d'immersion est un modèle in vitro adéquat pour simuler différents niveaux de diffusion au sein des tissus cutanés. Les variations d'intensité des caractéristiques de la résorcine dans les spectres Raman sont linéairement corrélées avec le contenu exprimé en mg de résorcine/mg de SC. Les barres d'erreur, qui représentent l'écart type pour chaque concentration, mettent clairement en évidence la variabilité spectrale dans les ensembles de données, comme observé précédemment avec l'ACP.

L'erreur quadratique moyenne des résidus (RMSE) calculée à partir de la régression linéaire est de 0,011 mg de résorcine/mg de SC, démontrant ainsi les performances de la spectroscopie Raman dans le SC, en tenant compte des hétérogénéités biologiques et biochimiques.

Les limites de détection sont calculées selon plusieurs méthodes :

(i) Lorsque S_{C1} est déterminé comme l'écart type des échantillons blancs, par exemple l'échantillon C1, SC1 = 0,016 mg de résorcine/mg de SC et la LOD_{AUC} = 0,017 mg de résorcine/mg de SC.

(ii) Lorsque S_{C1} est déterminé comme l'écart type résiduel (c'est-à-dire le RMSE) de la droite de régression, S_{C1} = 0,011 mg de résorcine/mg de SC et LOD_{AUC} = 0,012 mg de résorcine/mg de SC.

La valeur de LOD_{AUC} calculée à partir de l'échantillon blanc est 1,4 fois plus élevée que la valeur de LOD_{AUC} utilisant le RMSE.

V.1.5.5 L'analyse des données par PLSR

La PLSR est une méthode multivariée largement utilisée pour effectuer des analyses quantitatives avec un jeu de données spectrales. La première étape consiste à construire le modèle prédictif en utilisant un ensemble d'entraînement correspondant à 3/4 des données analysées pour chaque échantillon de SC. Ensuite, une validation croisée a été appliquée en utilisant 2/3 des données de l'ensemble d'entraînement comme ensemble de calibration, et le tiers restant comme ensemble de validation. Trois variables latentes (LV) ont été choisies pour représenter le modèle, car au-delà de 3 LV, l'erreur liée au modèle n'améliore pas de manière significative. De plus, ce choix du nombre de variables nous permet d'éviter d'introduire du bruit ou des interférences dans le modèle de calibration. La régression linéaire donne une équation Y = 0,957X + 0,003 et un coefficient de détermination R^2 = 0,957. La pente proche de 1 suggère une bonne corrélation entre les concentrations préparées et prédites. Le R^2 inférieur à 0,99 est dû aux larges barres d'erreur liées à la variabilité intra-échantillon. La valeur de RMSECV = 0,017 mg de résorcine/mg de SC correspond à 13,2 % de la concentration médiane de la plage étudiée. Le coefficient de régression met en évidence les caractéristiques spectrales utilisées pour la construction du modèle quantitatif à l'aide de la PLSR, ce qui représente clairement les bandes Raman de la résorcine et, dans une moindre mesure, les caractéristiques des constituants biochimiques du SC.

La deuxième étape de la PLSR consiste à évaluer les performances quantitatives du modèle PLSR avec un ensemble de test. À cette fin, 1/4 des cartes Raman analysées pour chaque échantillon de SC ont été conservées indépendamment et projetées dans les modèles prédictifs en tant qu'échantillons inconnus. La régression linéaire obtenue à partir de l'ensemble de test donne une équation Y = 1,009X + 0,003 et R^2 = 0,971. Le RMSEP = 0,015 mg de résorcine/mg de SC correspond à 11,67% de la concentration médiane de la plage étudiée.

Les résultats de PLSR peuvent également être évalués selon différents critères statistiques, notamment le rapport de déviation de performance (RPD), la précision (BCMSEP), la sensibilité (SEN) et la sélectivité (SEL). La valeur de RPD = 8,112, supérieure à 5, indique une bonne performance du modèle, tandis que la valeur de BCMSEP de $5{,}15 \times 10^{-5}$ mg de

résorcine/mg de SC, représentant 0,04% de la plage de concentration étudiée, souligne le potentiel de la spectroscopie Raman pour déterminer avec précision la quantité de résorcine dans la peau, sur une plage allant de 0,006 mg de résorcine/mg de SC à 0,257 mg de résorcine/mg de SC. La sensibilité (SEN), qui est une représentation de la plus faible concentration d'analyte pouvant être mesurée avec une précision acceptable, a une valeur de SEN = 18,994 mg de SC/mg de résorcine, ce qui suggère une sensibilité assez élevée.
Cependant, la sélectivité (SEL) est de 0,3, ce qui montre clairement une sélectivité plus faible. SEL est un critère sans dimension qui varie entre 0 et 1. Une valeur de SEL = 0 implique un chevauchement complet entre l'analyte et les interférences, tandis qu'une valeur de SEL = 1 indique l'absence de chevauchement et que le modèle est plus sélectif. Cette valeur relativement faible de SEL obtenue indique un degré d'interférence et de variabilité intrinsèque des caractéristiques spectrales de la matrice du SC, qui est une matrice complexe contenant des protéines, des acides nucléiques et des lipides de différentes classes (céramides, phospholipides, etc.), ce qui donne une forte réponse Raman avec de nombreuses bandes larges qui se chevauchent avec les caractéristiques de l'analyte (résorcine).

V.1.6 Conclusion

Les spectres Raman révèlent des informations biochimiques sur la composition de la peau ainsi que la présence d'ingrédients actifs. Pour étudier leur pénétration et leur diffusion dans la peau, une analyse quantitative repose sur la sensibilité et la spécificité de la technique. Afin d'évaluer les performances de la microscopie Raman confocale (CRM), un modèle in vitro a été développé pour obtenir des concentrations contrôlées dans le stratum corneum (SC) humain. La résorcine, utilisée comme composé modèle, peut être détectée et quantifiée dans des échantillons isolés de SC en combinant la CRM avec une analyse multivariée PLSR. Les valeurs de RMSECV (0,017 mg de résorcine/mg de SC), RMSEP (0,015 mg de résorcine/mg de SC) et R^2 (0,971) démontrent la fiabilité de la régression linéaire et permettent une quantification précise de la résorcine. En outre, ces résultats ont permis d'établir des mesures quantitatives permettant d'évaluer les performances analytiques de la CRM, incluant la limite de détection (LOD), la précision (BCMSEP), la sensibilité (SEN) et la sélectivité (SEL) dans la quantification des performances de la technique analytique. Il convient de souligner que ces critères de performance sont influencés par le système utilisé, la réponse Raman spécifique à la molécule étudiée et la matrice biologique considérée. L'évaluation de ces critères de performance revêt une importance cruciale pour démontrer la conformité de la micro-

spectroscopie Confocale Raman aux normes internationales et établir la CRM en tant qu'outil de référence approuvé pour les études de perméation.

V.1.7 #Article 6: Estimating the Analytical Performance of Raman Spectroscopy for Quantification of Active Ingredients in Human Stratum Corneum

molecules

MDPI

Article

Estimating the Analytical Performance of Raman Spectroscopy for Quantification of Active Ingredients in Human *Stratum Corneum*

Hichem Kichou [1], Emilie Munnier [1], Yuri Dancik [1,2,†], Kamilia Kemel [1], Hugh J. Byrne [3], Ali Tfayli [4], Dominique Bertrand [5], Martin Soucé [1], Igor Chourpa [1] and Franck Bonnier [1,*]

1 Faculté de Pharmacie, Université de Tours, EA6295 NMNS, NanoMédicaments et NanoSondes, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France; hichem.kichou@univ-tours.fr (H.K.); emilie.munnier@univ-tours.fr (E.M.); yuri.dancik@certara.com (Y.D.); kami.kemel@gmail.com (K.K.); martin.czok-souce@univ-tours.fr (M.S.); igor.chourpa@univ-tours.fr (I.C.)
2 Le STUDIUM Institute of Advanced Studies, 1 Rue Dupanloup, 45000 Orléans, France
3 FOCAS Research Institute, TU Dublin, City Campus, Camden Row, D08 CKP1 Dublin 8, Ireland; hugh.byrne@tudublin.ie
4 Faculté de Pharmacie, Université Paris-Saclay, Lip(sys)^2, Lipides, Systèmes Analytiques et Biologiques, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France; ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr
5 Data_Frame, 25 Rue Stendhal, 44300 Nantes, France; dataframe44@gmail.com
* Correspondence: franck.bonnier@univ-tours.fr
† Current address: Certara UK Ltd., Simcyp Division, Level 2-Acero, 1 Concourse Way, Sheffield S1 2B1, UK.

Abstract: Confocal Raman microscopy (CRM) has become a versatile technique that can be applied routinely to monitor skin penetration of active molecules. In the present study, CRM coupled to multivariate analysis (namely PLSR—partial least squares regression) is used for the quantitative measurement of an active ingredient (AI) applied to isolated (ex vivo) human *stratum corneum* (SC), using systematically varied doses of resorcinol, as model compound, and the performance is quantified according to key figures of merit defined by regulatory bodies (ICH, FDA, and EMA). A methodology is thus demonstrated to establish the limit of detection (LOD), precision, accuracy, sensitivity (SEN), and selectivity (SEL) of the technique, and the performance according to these key figures of merit is compared to that of similar established methodologies, based on studies available in literature. First, principal components analysis (PCA) was used to examine the variability within the spectral data set collected. Second, ratios calculated from the area under the curve (AUC) of characteristic resorcinol and proteins/lipids bands (1400–1500 cm^{-1}) were used to perform linear regression analysis of the Raman spectra. Third, cross-validated PLSR analysis was applied to perform quantitative analysis in the fingerprint region. The AUC results show clearly that the intensities of Raman features in the spectra collected are linearly correlated to resorcinol concentrations in the SC (R^2 = 0.999) despite a heterogeneity in the distribution of the active molecule in the samples. The Root Mean Square Error of Cross-Validation (RMSECV) (0.017 mg resorcinol/mg SC), The Root Mean Square of Prediction (RMSEP) (0.015 mg resorcinol/mg SC), and R^2 (0.971) demonstrate the reliability of the linear regression constructed, enabling accurate quantification of resorcinol. Furthermore, the results have enabled the determination, for the first time, of numerical criteria to estimate analytical performances of CRM, including LOD, precision using bias corrected mean square error prediction (BCMSEP), sensitivity, and selectivity, for quantification of the performance of the analytical technique. This is one step further towards demonstrating that Raman spectroscopy complies with international guidelines and to establishing the technique as a reference and approved tool for permeation studies.

Keywords: *stratum corneum*; high performance liquid chromatography; confocal Raman spectroscopy; resorcinol; quantification

check for updates

Citation: Kichou, H.; Munnier, E.; Dancik, Y.; Kemel, K.; Byrne, H.J.; Tfayli, A.; Bertrand, D.; Soucé, M.; Chourpa, I.; Bonnier, F. Estimating the Analytical Performance of Raman Spectroscopy for Quantification of Active Ingredients in Human *Stratum Corneum*. *Molecules* **2022**, *27*, 2843. https://doi.org/10.3390/molecules27092843

Academic Editor: Maria Paula Marques

Received: 25 March 2022
Accepted: 27 April 2022
Published: 29 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

One of the most important functions of the skin is as a protective barrier preventing excessive transepidermal water loss while protecting against external physical, chemical, and biological aggressions. The outermost layer of the skin, the *stratum corneum* (SC), is of particular interest, as it determines the effectiveness of this barrier function. A "bricks and mortar" model is commonly used to describe the composition of the SC [1], the corneocyte and corneodesmosome "bricks", containing highly cross-linked proteins, being held together by an intercellular lipidic matrix consisting of free fatty acids, cholesterol, and ceramides, acting as the 'mortar'. This specific biochemical architecture of proteins, lipids, and water provides an efficient barrier function [2], which limits the penetration and permeation of exogenous agents [3].

As a direct consequence, active substances (such as active cosmetic ingredient: ACI) and drugs (active pharmaceutical ingredient: API) released from topically applied formulations can also face limited absorption and permeation. It is commonly accepted that the effectiveness of a product is directly correlated to the ability of the ACI or API to penetrate into, and permeate through the skin [4]. Therefore, pharmaceutical and cosmetic industries are driven to develop new formulations, integrating new active molecules into galenic forms with appropriate stability and sensorial properties, but also enabling release and penetration of active ingredients (AI) [5]. Topical formulations, like emulsions or gels, consist of multicomponent mixtures with specific galenic properties. The physicochemical properties of the active ingredients, the rheology of the formulation, the hydrophilic–lipophilic balance and particle size for emulsions are critical parameters which strongly impact on the interaction of the product and the skin, and hence the penetration and permeation [5]. Accordingly, for the development of new formulations, it is necessary to carry out comparative studies to evaluate the efficiency of skin penetration and permeation of an AI [6].

To study skin penetration and permeation ex vivo, data are commonly obtained using Franz diffusion cells coupled to a reference analytical method such as high performance liquid chromatography (HPLC) or UV spectrophotometry [7]. This approach is considered the gold standard, recommended in international guidelines such as the *OECD Guideline 428 and 427 for the testing of chemicals, skin absorption: in vivo and in vitro method* [3], *the Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) for basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients [8], and the EMA draft guideline on quality and equivalence of topical products [9]. For this purpose, human biopsies/explants are used to measure the partitioning of an AI into and diffusion within the skin, depending on its physicochemical properties.

In vivo assessment requires more or less invasive protocols to assess the penetration depth of the AI. The so-called tape stripping (TS) approach is widely used to investigate skin penetration of active ingredients into viable tissues [10–12]. The method has many limitations, however, including the variability associated with the pressure applied to the tape, the time of contact, and the velocity of removing the tape, leading to uncertainties in the depth of penetration estimated [13].

Microdialysis (MD) is used in dermatological research as an in vivo tool that requires the insertion of a small catheter under the skin to enable measurement of percutaneous drug penetration [10]. This method is a versatile sampling technique that can be used to recover soluble endogenous and exogenous molecules from the extracellular compartment of human skin. MD can be applied in both clinical and preclinical settings [14]. However, the main disadvantage is mechanical stress from the probe that can alter tissue morphology and therefore it can be considered minimally invasive, at best. More recently, open-flow microperfusion (dOFM) has been used as an alternative to MD for its potential for bioequivalence and bioavailability assessment of topical products [15]. However, TS and other methods such as MD and dOFM that are minimally invasive lead to local irritation and discomfort for volunteers.

There is an increasing demand for alternative methods to assess the penetration of active ingredients, ultimately in vivo. Since the pioneering work of Caspers et al. in the

1990s, demonstrating the use of Raman spectroscopy for the molecular analysis of skin structure and composition [16], the technique has been widely documented for its potential in the medical field as a tool for investigation of physio-pathological processes, diagnosis of different skin lesions (atopic skin, cancers, actinic keratosis, etc.) [17–19]; in the pharmaceutical and cosmetic fields to investigate the penetration of active molecules [20–25]; or to study the effects of UV and pollutants on skin [26]. Confocal Raman microscopy (CRM) is now a versatile technique that can be applied routinely to skin cross sections in vitro, ex vivo on biopsies and in vivo. Operating in confocal conditions, the measurements can be performed from the surface to the deeper layers of skin, non-invasively, to yield information about the water content [16,27], the thickness of skin layers [21,28], study the impact of emulsifiers and formulations on intercellular lipids of *stratum corneum* [29], or to determine the diffusion of active ingredients in the skin [30]. However, Raman spectroscopy has not yet been fully established as a tool for absolute quantification ex vivo or in vivo.

Increasingly, comparative studies of CRM and conventional methods such as TS coupled to HPLC are conducted to highlight the complementarity of the techniques in monitoring AI diffusion into the skin and determining semi-quantitative penetration and permeation profiles [21]. Iliopoulos et al. have carried out a comparative study between in vitro permeation data using Franz cells and in vivo Raman data on niacinamide (NIA). The results demonstrated a good correlation between in vitro cumulative permeation and in vivo skin uptake at −2 µm (R^2 = 0.98) [31]. Caspers et al. have reported a promising mathematical method for in vivo quantification in the SC, relying on fitting of data collected from skin with Raman spectra collected for reference compounds. This approach was notably applied to calculate the flux of diffusion for trans-retinol after topical applications [32].

Despite the flourish of literature in recent years, few studies have directly targeted the demonstration of analytical performances proscribed by international regulatory authorities such as the US Food and Drug Administration (FDA) [33], the European Medicines Agency (EMA) [34], or the International Council for Harmonisation (ICH) [35], which provide statistical criteria to numerically evaluate a method. Franzen et al. proposed a proof of concept correlating the Raman signal of a model drug with its controlled amount of caffeine in an isolated human SC, determined by CRM and HPLC [36], although without any further insights or discussion about capabilities of the technique for quantification. In a follow-up study, Alonso et al. correlated Raman signal ratios and caffeine concentration obtained by HPLC, but in porcine skin, hence limiting applicability to human skin penetration studies [37].

Therefore, in the present study, CRM coupled with multivariate analysis (namely PLSR—partial least squares regression) is used for the quantitative measurement of resorcinol, selected as a model compound, applied to isolated (ex vivo) human *SC* at systemically varied doses. The performance is quantified according to key figures of merit defined by the regulatory bodies ICH, FDA, and EMA. A methodology is thus demonstrated to establish the limit of detection (LOD), precision, accuracy, sensitivity (SEN), and selectivity (SEL) of the technique, and the performance according to these key figures of merit are compared to similar established methodologies, based on studies available in literature.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Resorcinol was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), methanol and phosphoric acid from Thermo Fisher Scientific (Iiilkrich-Graffenstaden, France), and phosphate-buffered saline (PBS) from Hyclone Laboratories (Logan, UT, USA). Ultra-pure water was obtained using a Millipore MilliQ system (Merck Millipore, Molsheim, France).

2.2. Isolated Human Stratum Corneum

Stratum corneum (SC) discs, 12 mm in diameter, were purchased from Biopredic international (Rennes, France). The SC was collected during abdominal skin surgery from

a 53-year-old Caucasian female according to the French law L. 1245 CSP "product and element of human body taken during surgical procedure and used for scientific research". The SC were shipped frozen and were stored at −20 °C until the day of the experiment.

2.3. Preparation of Infused SC Samples

On the day of the study, SC were immersed in resorcinol solutions prepared in PBS. Firstly, SC discs were thawed at room temperature for 1 h and weighed. The SC discs were then completely immersed in 4 mL of resorcinol solutions in Petri dishes for 24 h at room temperature, to enable complete infusion until equilibrium.

Samples for HPLC: Solutions of 4, 10 and 25 $g \cdot L^{-1}$ resorcinol in PBS were used. For each concentration, 3 SC samples were prepared. After infusion for 24 h, SC were gently removed from resorcinol solutions with tweezers and placed in 2 mL of methanol for 8 h, for extraction of resorcinol, at which point the supernatant was analysed by HPLC.

Samples for Raman spectroscopy: A range of resorcinol solutions in PBS was prepared for use with SC samples. Concentrations of 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, and 50 $g \cdot L^{-1}$ are respectively identified as C2, C3, C4, C5, C6, C7, and C8. An SC negative control sample immersed in PBS was additionally prepared (C1). After 24 h immersion, SC discs were collected and deposited on calcium fluoride (CaF_2) substrates, dried with cotton-tips to remove any excess resorcinol solution on the surface of the SC samples, and then air dried at room temperature before analysis by CRM as described in Figure 1.

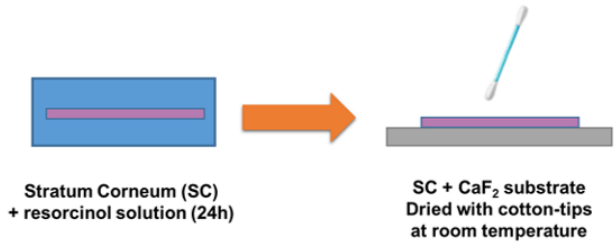


Figure 1. Procedure for infusion of SC samples in resorcinol solutions.

2.4. HPLC Analysis

HPLC analysis was performed using an Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Voisins-le-Bretonneux, France) piloted by Chromeleon 7.1 software. The system was equipped with a DAD UV ultimate 3000 detector and an C18 column with the particle size of 5 µm and length of 4.6 × 150 mm (Interchim, Montluçon, France). The temperature of the column was adjusted to 25 °C. Absorbance was recorded at 275 nm for detection of resorcinol. The analysis was performed in isocratic mode using a methanol/water (25%/75%) mobile phase supplemented with phosphoric acid at 10 µM. A 10 µL sample of each experimental solution was injected and a flow rate of 1 $mL \cdot min^{-1}$ was applied for 6 min runs per analysis.

Calibration curve: To construct the calibration plot, a stock solution of resorcinol was prepared at concentration 1 $mg \cdot mL^{-1}$ in PBS, and serial dilutions were used to obtain the following standard solutions: 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, and 0.0001 $mg \cdot mL^{-1}$ for analysis by HPLC. The observed retention time was 4.14 min for resorcinol. For each concentration, the area under the peak was calculated and used for the calibration curve [38]. Each day, calibration curves were done in triplicate.

2.5. Confocal Raman Microscopy Analysis

CRM analysis was performed using an Alpha300R Raman microscope (WiTec, Ulm, Germany) equipped with 532 nm laser source. To avoid photo damage, the power was set to 10 mW at the samples, corresponding to a laser density of 7.54 mW μm^{-2}. A 600 lines/mm grating was selected, and the back scattered light was collected on a back illuminated deep depletion CCD detector over the spectral range 0–3600 cm^{-1} with a spectral resolution

~5 cm^{-1}. Spectra were collected using a 20 × objective (Zeiss EC-Epiplan-NEOFLUAR, NA = 0.5, spot size ~1.3 µm) and the acquisition time was set to 30 s × 2 accumulations. For each disc, 20 maps were performed across the SC, to account for spatial heterogeneity. For each map, 9 spectra (3-by-3) were collected using a 4 µm step size, resulting in 180 spectra recorded per sample and a total of 1440 spectra for the study. The instrument is calibrated daily using a 2-step procedure. Firstly, the True Cal function of Project 5 (WITec, Ulm, Germany) is used. It is an automatic multipoint calibration routine performed with a mercury–argon (HgAr) light source integrated in the Raman microscope. Secondly, prior to data acquisition, a verification was done using the peak at 520.7 cm^{-1} from a silicon substrate.

2.6. Data Analysis

Data analysis was performed using Matlab® (MathWorks, Natick, MA, USA). The spectra were cut between 400 and 1800 cm^{-1} to refine the analysis to the finger-print region. A Lieber baseline correction was applied [39], using a linear correction function with 10 iterations, followed by a unit vector normalisation.

Principal Components Analysis (PCA): PCA is an unsupervised multivariate analysis technique used to evaluate the variability and to simplify a complex data set of multiple dimensions. It allows the reduction of the number of variables in a multidimensional data set, although it retains most of the variation within the data set. The other advantage of this method is the derivation of PC loadings which represent the variance of each variable (wavenumber) for a given PC, hence reflecting the variations in the chemical components contributing to the spectra [40]. In the scatter plot, the first principal component (PC1) accounts for the highest explained variance. Moreover, each dot in the scatterplot, corresponding to a spectrum, can be located in space using the coordinates defined by the scores along both PC1 and PC2. Therefore, similar spectra tend to be gathered together with relatively close PC scores while the presence of significant variations in spectral features will result in higher distances between spectra. The data collected at a given concentrations are rather grouped in a so-called cluster.

Area under the curve (AUC): The ratio between the AUC 724–794 cm^{-1} corresponding to aromatic ring band of resorcinol and the AUC 1400–1500 cm^{-1} corresponding to C-H of lipids and proteins band was calculated. The value of the band ratio found in the SC control sample C1 (unexposed to resorcinol) was subtracted from all other band ratios calculated from samples C2 to C8.

Partial least squares regression (PLSR): PLSR has been applied to construct a linear regression model. The data set was divided into the training set (3/4 of the Raman maps per sample) and the test set (the remaining 1/4 of Raman maps for each sample). The test set is used as unknown samples to determine the accuracy of the analysis. The training set was further separated in the calibration set (3/4 of samples) and validation sets (1/4 of samples). A 100-fold iteration was implemented to evaluate the stability of the calibration model with multiple random combinations of calibration/validation sets. The validation set is used to select the best number of latent variables, independently of the test set. Notably, in all iterations, the models were tested with the same 1/4 of the data, identified as the test set, i.e., the unknown samples to be determined. The results are presented as predicted concentrations regressed against observed concentrations. The output of this model gives information to evaluate the PLSR using the linearity of the regression between the measured and predicted concentrations (R^2), root mean square error of cross validation (RMSECV), calculated from the training datasets and the root mean square error of prediction (RMSEP), calculated from the test set. The regression vectors were also used to visualise the variables (wavenumbers) used by the PLSR algorithm that are represented under regression coefficients.

2.7. Analytical Performance Figures of Merit

The following figures of merit for performance were used in this study:

Linearity: The correlation coefficient (R^2) is usually used to represent the linearity of a model. For the band ratio of AUC, the R^2 can be used to evaluate the linearity between the intensity of the instrumental response (peak intensity) as a function of concentration. For PLSR analysis, the R^2 reflects the linearity between the predicted concentrations regressed against the observed concentration. For both, a value as close as possible to 1 is expected, as a gauge of the reliability of fitting for the linear model. Additionally, for PLSR, the equation of the regression line is expected to display a slope close to 1.

Precision and accuracy: The precision is the closeness of agreement among a series of measurements, while the accuracy is the degree of closeness of the measurement between calculated and predicted values. Both were calculated following ICH guides lines [35].

The accuracy from a linear regression can be expressed using the root mean square error (RMSE) (1) [35]:

$$\mathrm{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad (1)$$

where y_i is the measured values (i.e., prepared), $\hat{y}_i$ is the predicted values, and n is the number of samples.

For PLSR, the RMSE is given as the RMSECV or RMSEP calculated respectively for the calibration (training set) and predictive (test set) models. Moreover, the precision of the model can be estimated using bias corrected mean error square prediction (BCMSEP) following Equation (2) [41]. A low BCMSEP corresponds to high model precision.

$$\mathrm{BCMSEP} = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2 - [\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)]^2/n}{n-1} \quad (2)$$

Limit of detection (LOD): The IUPAC guidelines define the limit of detection (LOD) as the lowest quantity of analyte that can be distinguished from the blank (absence of analyte) [42]. According to available recommendations from regulatory authorities such as FDA, EMA, and ICH, the LOD from univariate analysis can be calculated as follows:

$$\mathrm{LOD_{AUC}} = 3.3 \cdot \frac{S_{C1}}{a} \quad (3)$$

where $\mathrm{LOD_{AUC}}$ is the lowest detectable concentration calculated, 3.3 is the Student's t-test value obtained from t-test using a 5% probability and a is the slope of the linear regression model. S_{C1} is defined as the standard deviation of the response and can be determined using two approaches. Firstly, S_{C1} can be the standard deviation of a blank sample, for instance sample C1. Secondly, S_{C1} can be defined as the residual standard deviation of a regression line, i.e., the RMSE. These methods of calculation all estimate deviation in y, i.e., the intensity of the signal measured. In Equation (3), S_{C1} is divided by the slope to convert the value of LOD from Raman intensity to concentrations. The calculation can be extended to PLSR results, by calculating $\mathrm{LOD_{PLSR}}$ as follows:

$$\mathrm{LOD_{PLSR}} = 3.3 \cdot \mathrm{RMSECV} \quad (4)$$

Similar to S_{C1} in Equation (3), RMSE of cross validation (RMSECV) calculated from the training datasets can be determined either including all concentrations C1-C8 analysed or only calculated from the lowest concentration analysed (C1).

Sensitivity: According to ICH guidelines, the sensitivity is the lowest analyte concentration that can be measured with acceptable accuracy and precision [35]. The sensitivity was calculated based on the method of Li et al. [43], and the net analyte signal (NAS) developed by Lorber et al. [44], following Equations (5) and (6):

$$\mathrm{SEN_i} = \frac{\mathrm{NAS_i}}{y_i} \quad (5)$$

$$NAS_i = (x_i \cdot b) \cdot (b^T \cdot b)^{-1} \cdot b^T \quad (6)$$

The sensitivity (SEN) is reported as a single value averaged for all concentrations analysed, where x_i is a sample spectrum, b is a PLSR coefficient column vector, b^T is its transposed vector, and y_i is the measured concentration of resorcinol in the SC.

Selectivity: Selectivity is a measurement of the ability of a method to determine a particular compound in the analysed matrices without interference from other components [35]. The selectivity was calculated based on the method of Li et al. [43], following Equation (7).

$$SEL_i = \frac{||NAS_i||}{||x_i||} \quad (7)$$

The selectivity (SEL) is reported as an average for all concentrations analysed. With the NAS_i vector and x_i the sample spectrum.

Ratio of performance deviation (RPD): the RPD is the ratio between the standard deviation of measured values from the calibration set, divided by the RMSEP. The higher the RPD value is, the better the performance of model. Values higher than 2.5 are acceptable, values > 5 are adequate for quality control, and values > 10 are considered to be excellent [45]. It is calculated as follows.

$$RPD = \frac{S_{Ci}}{RMSEP} \quad (8)$$

S_{Ci} is the standard deviation for measured values of each concentration from C1 to C8.

Regression coefficients: Regression coefficients were also used to visualise the variables (wavenumbers) used by the PLSR algorithm. They can be interpreted similarly to spectra and provide a visual representation of the molecular selectivity.

3. Results

3.1. Validation of the Protocol for Sample Preparation

For the purpose of the study, a protocol that delivers systematically varying mass of resorcinol in SC was developed. Figure 2 shows a plot of the mass (mg) of resorcinol per mass (mg) of SC, as determined by HPLC, regressed against resorcinol concentrations of solutions ($g \cdot L^{-1}$) used as immersion medium. The equation $Y = 0.0051 \cdot X + 0.0027$ and the R^2 value 0.998 confirm the proportionality achieved. The analysis validates that SC samples immersed in resorcinol solutions for 24 h reach an equilibrium and that there is a linear relationship between the concentrations of solutions used to immerse SC discs and the resulting concentration in tissues, for instance mg resorcinol/mg SC. Therefore, the linear regression presented in Figure 2 is used as a calibration curve to determine the concentration of resorcinol in SC samples analysed by CRM. Table 1 summarises the concentrations obtained that are used for the subsequent quantitative analysis using univariate and multivariate methods.

3.2. Spectral Characterisation of Human Stratum Corneum and Resorcinol by Confocal Raman Microscopy (CRM)

Figure 3A displays the mean spectrum of control SC samples (i.e., C1). The main characteristic features observed originate from the lipids, nucleic acids, and proteins found in human skin [27]. The broad band at 1655 cm^{-1} is assigned to amide I of proteins (N–C=O deformation). The intense band between 1440 and 1469 cm^{-1} is assigned to combined contributions of C–H scissoring from proteins and lipids. However, the position of the maximum at 1444 cm^{-1} and the presence of a shoulder at 1465 cm^{-1} suggests a high lipid content [46,47]. This is confirmed by the bands found at 1303 cm^{-1} and 1750 cm^{-1}, respectively assigned to CH_2 deformation and C–O–O elongation in lipids [46]. The sharp peak at 1005 cm^{-1} is typically found in biological samples and assigned to the ring breathing (C–C=C deformation) of aromatic acids (phenylalanine) [47,48]. Table 2 provides a list of bands reported in the literature for the SC [46–49].

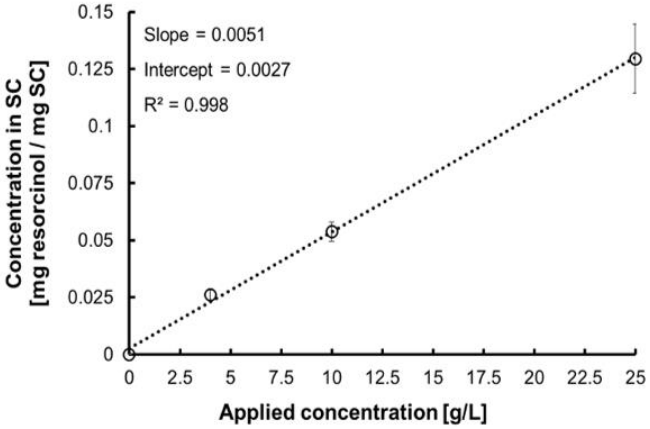


Figure 2. Linear regression of concentration in SC against resorcinol concentrations used as immersion medium.

Table 1. Calculated reference concentrations in SC for samples analysed by CRM.

	Applied Concentration [g·L^{-1}]	Concentration in SC [mg resorcinol/mg SC]
C1	0	0
C2	0.5	0.006
C3	1	0.008
C4	2.5	0.016
C5	5	0.028
C6	10	0.054
C7	25	0.130
C8	50	0.257

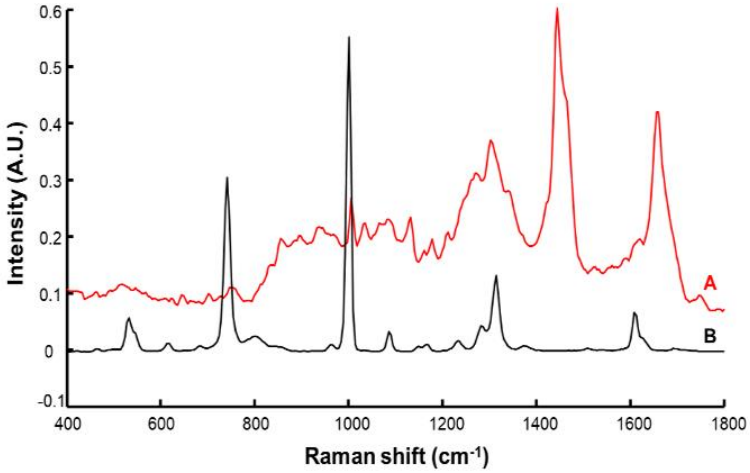


Figure 3. Raman spectra of control *stratum corneum* (A) and pure resorcinol (B). Spectra are offset for clarity.

Table 2. Raman band assignments in SC [46–49].

Raman Shift (cm^{-1})	Assignment
614	Phenylalanine ring
646	Tyrosine ring, ν C–S
702	ν C–S gauche of cysteine cholesterol
751	Aromatic ring puckering
864	Proline, RNA
898	Tryptophan
939	ρ CH_3 terminal, m CC a helix (secondary structure), phospholipids
1005	Symmetric ring breathing phenylalanine
1033	C–H Phenylalanine
1067	Lipids: skeletal trans conformation ceramides; ν
1130	Lipids: hydrocarbon chain, trans conformation ceramides
1177	CH Tyrosine, phenylalanine
1303	Amide III, CH_2 phospholipids
1444	δ CH proteins and lipids
1524	–C=C– carotenoids
1655	Amide I

ν: stretch; δ: deformation; ρ: rocking.

The Raman spectrum collected from resorcinol (Figure 3B) displays fewer sharp bands. Notably, the strongest features found are assigned to aromatic ring deformation at 532 cm^{-1}, C–C stretching of the aromatic ring at 741 cm^{-1} and 1001 cm^{-1}, O–H deformation at 1314 cm^{-1}, and C–C stretching at 1608 cm^{-1}. Further weaker features are assigned to aromatic ring twisting at 617 cm^{-1}, C–C of aromatic ring elongation at 1086 cm^{-1}, and C–H in plane bending of the aromatic ring at 1186 cm^{-1} [50].

Figure 4 shows the mean Raman spectra corresponding to control SC (C1) and SC infused with resorcinol solutions at different concentration (C2 to C8) for 8 h. Raman spectra from immersed SC show that specific bands of resorcinol increase in the *SC* according to the concentration of resorcinol solutions, most evident for the bands at 532 cm^{-1}, 610 cm^{-1}, and 741 cm^{-1}, which are in a spectral region in which strong features from skin constituents are absent. Vibrational modes like the ring breathing (C–C=C deformation) of aromatic acids can be shared between SC and resorcinol, although the peak positions from sample C1 to C8 remain specific to the chemical composition. Notably, the peak observed at 1005 cm^{-1} in the control sample (C1) gradually shifts to 1001 cm^{-1} as the concentration of resorcinol increases (C2–C8), also coupled to a significant increase of the band intensity. This is also observed for other features from resorcinol at 1086 cm^{-1}, 1186 cm^{-1}, 1314 cm^{-1}, and 1608 cm^{-1} that display variations in positions and intensities that can also be correlated with the variations in resorcinol concentration in SC. Although they overlap with bands arising from the strong contributions of endogenous proteins and lipids in this spectral range of the fingerprint region, when the concentration of the resorcinol in the tissue increases, it gradually dominates the spectral signatures collected (C8).

3.3. Data Exploration by Principal Component Analysis (PCA)

The scatter plot in Figure 5 shows the distribution of data along PC1 (82.67% of the explained variance) and PC2 (6.20% of the explained variance). Along PC1, data are organised according to the concentration of resorcinol in SC samples starting from left with C8 (brown dot, 0.257 mg resorcinol/mg SC) to the right with C0 (red dots, control C0). Loading 1, shown in Figure 6A, highlights that PC1 reflects spectral variations specific to resorcinol. It is clearly observed that negative peaks of the loading 1 at 532 cm^{-1}, 617 cm^{-1},

741 cm^{-1}, 1001 cm^{-1}, 1086 cm^{-1}, 1186 cm^{-1}, 1314 cm^{-1}, and 1608 cm^{-1} match with peaks identified from the pure compound (Figure 6A,C—dotted lines). Interestingly, weaker features of resorcinol, overlapping with SC constituents at 617 cm^{-1}, 1086 cm^{-1}, 1186 cm^{-1}, and 1314 cm^{-1} (Figure 3), are observed in the loading of PC1, indicating that they also contribute to the variance of the data along PC1. The positive features are assigned to biochemical constituents of the SC (Figure 6B) which are listed in Table 2.

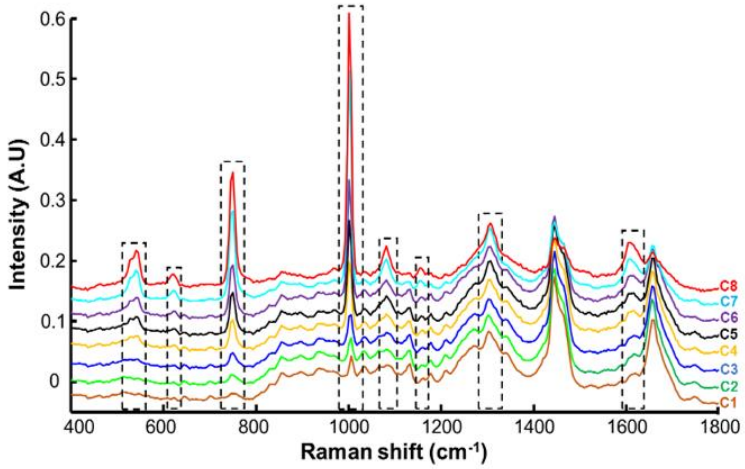


Figure 4. Raman spectra of control SC (C1) and SC infused with resorcinol. a: C2—0.006 mg resorcinol/mg SC; b: C3—0.008 mg resorcinol/mg SC; c: C4—0.016 mg resorcinol/mg SC; d: C5—0.028 mg resorcinol/mg SC; e: C6—0.054 mg resorcinol/mg SC; f: C7—0.130 mg resorcinol/mg SC; and g: C8—0.257 mg resorcinol/mg SC. Spectra are offset for clarity.

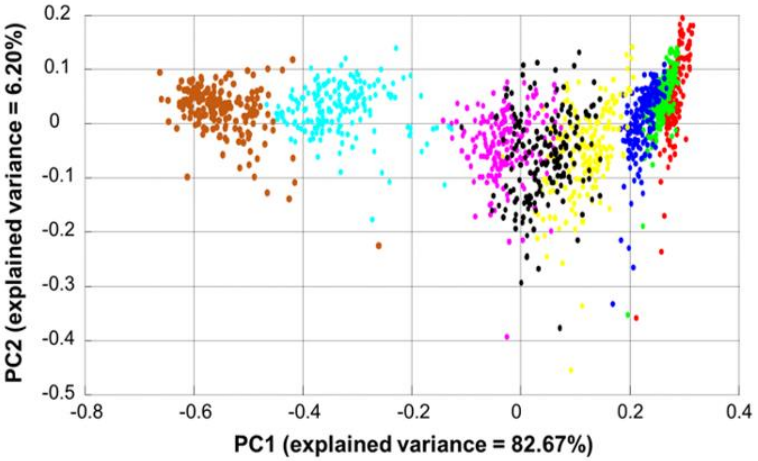


Figure 5. Scatter plot for the first two components obtained from PCA. Red is Raman spectra of control SC (C1), green is C2—0.006 mg resorcinol/mg SC, blue C3—0.008 mg resorcinol/mg SC, yellow C4—0.016 mg resorcinol/mg SC, black is C5—0.028 mg resorcinol/mg SC, magenta is C6—0.054 in turquoise is C7—0.130 mg resorcinol/mg SC, and brown is C8—0.257 mg resorcinol/mg SC.

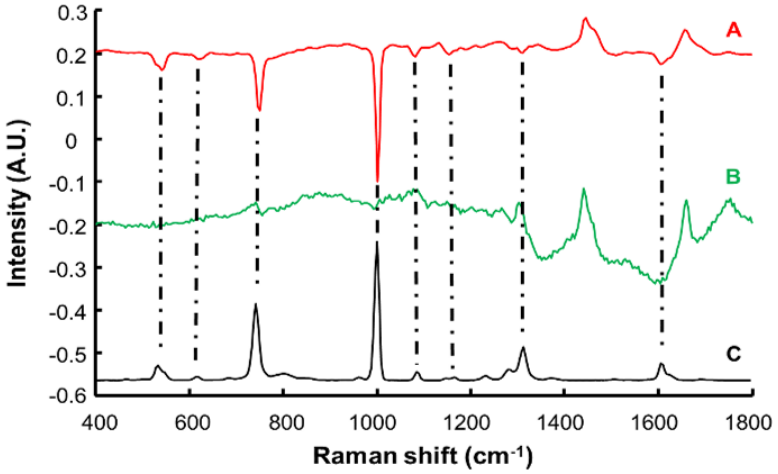


Figure 6. Loadings plot for the two first components obtained from PCA and resorcinol spectrum. A: loading of PC1, B: loading of PC2 and C: reference spectrum from resorcinol (powder).

PCA is a powerful tool to illustrate the spectral variability and detect subtle modifications in features. While PC1 captures the systematic variability of the samples infused with different AI concentrations, it also indicates a degree of intra-sample variability. Skin is a complex biological matrix, and it can be anticipated that the distribution of resorcinol across the *SC* would display a level of heterogeneity, inherent in biological systems which are heterogeneous by nature. The heterogeneous structure of the corneocytes embedded in the lipid matrix of the SC results in an uneven distribution of the hydrophilic resorcinol (log K_{OW} = 0.78, octanol/water partition coefficient [51]). Although the data have been recorded with a 20 × objective to increase the spot size to ~1.3 µm, it is natural to observe such spectral variation. Indeed, the purpose of the study is the calculation of the analytical performances specifically for quantification in the SC. Therefore, the variability linked to biochemical properties is encompassed within the data collected.

The loading of PC2, shown in Figure 6B, reflects the further variability of biological heterogeneity specific to SC. The most intense and positive peaks, observed at 1303 cm^{-1}, 1444 cm^{-1}, 1655 cm^{-1}, and 1750 cm^{-1}, correspond to features of SC (Figure 3A). It is seen in Figure 5 that the distribution along PC2 is consistent for all concentrations and that all the clusters are aligned, with no possible discrimination along this principal component. Therefore, the variability along the second principal component, PC2, is not related to resorcinol (Figure 6B), but represents intra-sample biological variability.

3.4. Data Analysis Using Area under the Curve

Figure 7 shows the linear regression constructed using the integrated band ratio of AUC of the feature of SC (1400–1500 cm^{-1}) to that of resorcinol (724–794 cm^{-1}). The regression has a linearity characterised by a value of R^2 = 0.999. The proportionality between the band ratio calculated from Raman spectra and the concentration of resorcinol in SC samples confirms the suitability of the immersion setup as an in vitro model that can be used to simulate different levels of diffusion within the skin tissues. The variations in intensities for features of resorcinol in Raman spectra linearly correlates with the content expressed as mg resorcinol/mg SC. The error bars, representing the standard deviation for each concentration, clearly highlight the spectral variability in the data sets, as observed previously with PCA (Figure 5). The RMSE calculated from Figure 7 was found to be 0.011 mg resorcinol/mg SC. According to Equation (1), the difference between y_i, the measured values (i.e., prepared), and $\hat{y}_i$, the predicted values, is taken into account, and

therefore the results represent the performances of Raman spectroscopy in the SC, taking into account the biological and biochemical heterogeneities.

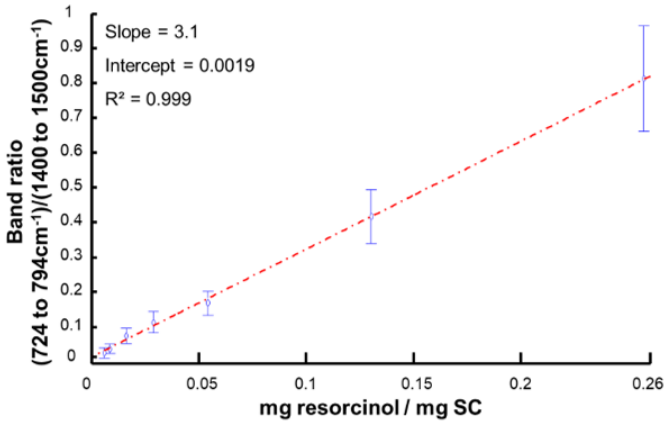


Figure 7. Band ratio of the AUC of the C–C band of the aromatic resorcinol ring [724–794 cm^{-1}] and the C–H band of protein/lipids of the SC [1400–1500 cm^{-1}] regressed against resorcinol content in SC expressed as mg resorcinol/mg SC.

The limit of detection (LOD) is one of the most important key figures of merit to be determined to evaluate analytical methods, as it depends on both the precision and sensitivity of the method [52,53]. According to the definition of the International Standardization Organization (ISO), adopted by the International Union of Pure Applied Chemistry (IUPAC), the LOD indicates the lowest quantity of an analyte which can be distinguished from the absence of the analyte within a stated confidence limit [54]. According to Equation (3), the LOD_{AUC} can differ depending on the determination of the parameter S_{C1}.

When S_{C1} is determined as the standard deviation from blank samples, for instance sample C1, S_{C1} = 0.016 mg resorcinol/mg SC and the LOD_{AUC} = 0.017 mg resorcinol/mg SC. Alternatively, when S_{C1} is determined as the residual standard deviation (i.e., RMSE) of the regression line from Figure 7, S_{C1} = 0.011 mg resorcinol/mg SC and LOD_{AUC} = 0.012 mg resorcinol/mg SC. Although similar, the LOD_{AUC} value calculated from the blank sample is 1.4 times higher than the LOD_{AUC} value using the RMSE. While AUC is a rapid approach to visualise variations in data sets, the calculation can be influenced by residual contribution from the SC, notably for the resorcinol band (724–794 cm^{-1}). Multivariate methods of determining the LOD, using the full range (for instance the fingerprint region) may be more appropriate to delivery more specific and accurate figures of merits describing the analytical performances of Raman spectroscopy. To this end, partial least squares regression (PLSR) was applied to the data set.

3.5. Data Analysis Using Partial Least Squares Regression (PLSR)

PLSR is the most widely used multivariate method to perform quantitative analysis of spectral data sets [43,55,56]. The first step is to construct the predictive model using a training set corresponding to 3/4 of the maps analysed for each SC sample. A cross validation was applied using 2/3 of the data from the training set used as the calibration set and the remaining 1/3 of the dataset as the validation set. Figure 8 displays the RMSECV as a function of number of latent variables (LV). There is a slight decrease in the RMSECV for the three first LV, whereafter the overlapping errors bars suggests the improvement in the accuracy of the model is not significant. Therefore, it was found preferable to select n = 3 for the LV to avoid introducing noise or interferences in the calibration model. The PLSR plot for the cross validation, i.e., predicted concentrations in SC samples regressed against the calculated (reference) concentrations, is presented in Figure 9. For each concentration,

C1–C8, results are provided as mean predicted concentration and errors bars represent standard deviations. The linear regression gives an equation Y = 0.957·X + 0.003 and R^2 = 0.975. The slope close to 1 suggests a good correlation between prepared and predicted concentrations is observed. The R^2 inferior to 0.99 is due to the large error bars that are linked to the intra-sample heterogeneity. The value of RMSECV = 0.017 mg resorcinol/mg SC corresponds to 13.2% of the median concentration of the range studied. The regression coefficient (Figure 10) highlights the spectral characteristics used for the construction of the quantitative model using PLSR. It is clearly observed that intense positive features at 532 cm^{-1}, 617 cm^{-1}, 741 cm^{-1}, 1001 cm^{-1}, 1086 cm^{-1}, 1186 cm^{-1}, 1314 cm^{-1}, and 1608 cm^{-1} seen in Figure 10 match well with resorcinol bands (see Figure 3B). Negative features at 1655 cm^{-1} and 1444 cm^{-1} are characteristic of the biochemical constituents found in the SC (Table 2).

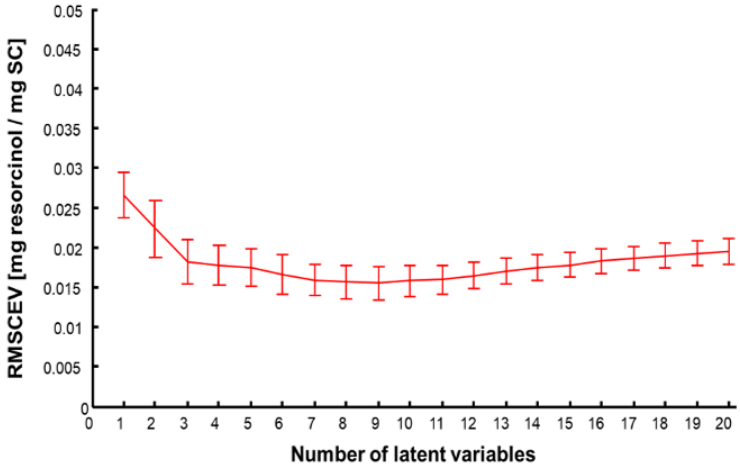


Figure 8. Root mean square error of cross validation (RMSECV).

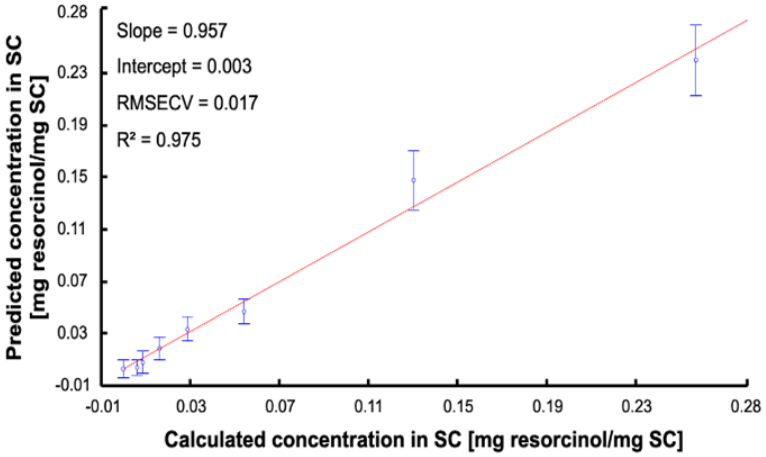


Figure 9. PLSR plot for the validation set. Dots are mean predicted concentration and errors bar represent the standard deviation.

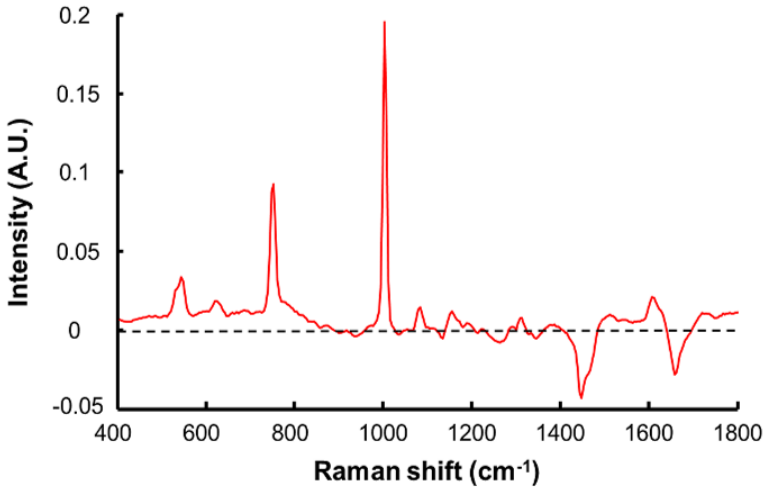


Figure 10. First regression coefficient from the PLSR analysis.

The second step of PLSR is to evaluate the quantitative performances of the PLSR model with a test set. For this purpose, 1/4 of the Raman maps analysed for each SC sample was kept independent and projected in the predictive models as unknown samples to be determined. As described in Section 2.3, the samples in the test set are also prepared by immersion and hence their concentration is known; these values are not used during the training of PLSR model in order not to bias the analysis, but rather at the later stage to assess the performance of the model based on the RMSEP and R^2. The PLSR plot obtained from the test set is presented in Figure 11. The linear regression gives an equation $Y = 1.009 \cdot X + 0.003$ and a $R^2 = 0.971$. The RMSEP = 0.015 mg resorcinol/mg SC corresponds to 11.67% compared to the median concentration of the range studied.

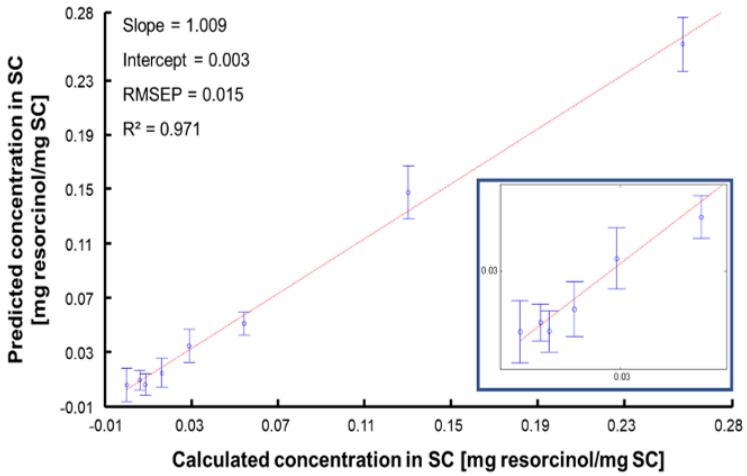


Figure 11. PLSR plot for the test set. Dots are mean predicted concentration and errors bars represent the standard deviation.

While RMECV, RMSEP, and the respective R^2 are commonly used to interpret PLSR outcomes, additional figures of merit referred to in guidelines and the literature are available to evaluate statistically the performance of an analytical technique. Multivariate data analysis generates more complex modes to interpret especially for data collected from

biological systems like SC, because the data mining is performed using all wavenumbers from a given spectral range (for instance fingerprint region), hence including more variables in the calculations [52,57,58].

To enable comparison with results obtained from AUC in the previous section, LOD_{PLSR} was determined using the RMSECV from the blank sample C1 (LOD_{PLSR} = 0.023 mg resorcinol/mg SC) and using the RMSECV including concentrations C1–C8 (LOD_{PLSR} = 0.06 mg resorcinol/mg SC). LOD_{PLSR} using the RMSECV, including all concentrations, is 2.6 times higher compared to the LOD_{PLSR} using the RMSECV from the blank sample C1. This difference can be simply explained by the origin of the errors accounted for. For the blank sample, C1, the variability in Raman spectra collected is solely attributed to biological heterogeneity, i.e., variations mostly due to proteins/lipids and other skin constituents contributing to the data collected. However, for C2–C8, in addition to the biological heterogeneity, there is the heterogeneity of resorcinol distribution across the SC (see PCA scatter plot in Figure 5). This observation is confirmed in Figure 7 by the increasing standard deviation from rationed AUC as a function of concentration. Therefore, the LOD_{PLSR} = 0.06 mg resorcinol/mg SC, incorporating all sources of errors in the calculation, better reflects the performance of Raman spectroscopy applied to the quantification of an active molecule in a complex biological system. Furthermore, the LOD_{AUC} = 0.012 to 0.017 mg resorcinol/mg SC is ≈3.5 times lower than LOD_{PLSR}. The difference can be explained by PLSR being more challenging to the data due to the three-way splitting into calibration, validation, and test sets.

PLSR results can also be assessed according to various statistical criteria, described in Section 2, including ratio of performance deviation (RPD), precision (BCMSEP), sensitivity (SEN), and selectivity (SEL) (Table 3). The value of RPD = 8.112, that is superior to 5, indicates a good model performance, while the BCMSEP value of 5.15×10^{-5} mg resorcinol/mg SC, representing 0.04% of the range of concentration studied, highlights the potential of Raman spectroscopy to accurately determine the amount of resorcinol in the skin, over the range extending from 0.006 mg resorcinol/mg SC to 0.257 mg resorcinol/mg SC. The sensitivity (SEN) is a representation of the lowest analyte concentration that can be measured with acceptable accuracy and precision [35]. The higher the SEN value is, the better the detection of compounds and therefore the performance of the technique. The value of SEN = 18.994 mg SC · mg of resorcinol^{-1} suggests a quite high sensitivity. However, SEL = 0.3 clearly indicates a lower selectivity. According to the ICH, the selectivity (SEL) is the ability of an analytical method to differentiate and measure the analyte in the presence of potential interfering substances in the blank biological matrix [35]. SEL is a dimensionless criterion ranging between 0 and 1. A value of SEL = 0 implies complete overlap between analyte and interferences. SEL = 1 indicates no overlap and that the model is more selective [56]. The relatively low value obtained is consistent with observation made in Figures 4 and 5 of the degree of interference and intrinsic variability of the spectral features of the SC matrix. While mean spectra indicate that features from SC are broad peaks overlapping with specific bands from resorcinol, PCA highlighted the presence of an important biological heterogeneity that also impact on the selectivity. SC is a complex matrix with proteins, nucleic acids, and lipids from different classes (ceramides, phospholipids, etc.) resulting in a strong Raman response with numerous broad bands that overlap with the features from the analyte (resorcinol), like the aromatic ring deformation at 532 cm^{-1}, C–C stretching of the aromatic ring at 741 cm^{-1} and 1001 cm^{-1} which interfere/overlap with C–C deformation and stretching and of phenylalanine ring at 614 cm^{-1}, 751 cm^{-1}, and 1005 cm^{-1}. Furthermore, in Figure 10, the regression coefficient from PLSR enables identification of specific features from resorcinol (positive peaks), but also demonstrates that the quantification relies also on the SC features (negative peaks).

Table 3. Estimation of analytical performance parameters of the models using PLSR data (RMSECV, RMSEP, and BCMSEP are in mg resorcinol/mg SC, sensitivity is in (mg SC·mg of resorcinol^{-1}), and all other parameters are dimensionless).

RMSECV	0.017
RMSEP	0.015
Linearity (R^2)	0.971
RPD	8.112
BCMSEP	5.15×10^{-5}
Sensitivity (sen)	18.994
Selectivity (sel)	0.3

4. Discussion

The study of human skin represents an important area of research and development in many areas, including dermatology, toxicology, pharmacology, and cosmetology. In this context, a method which can noninvasively and quantitatively determine the concentration profile of an AI in the skin, in situ, is highly desirable. A number of studies have clearly demonstrated that confocal Raman microscopy can effectively profile the chemical composition of skin, and monitor the penetration and permeation of topically-applied exogenous molecules/agents both in vitro and in vivo [21,30]. Critical to its legislative acceptance as a methodology for routine screening of AI penetration and permeation in skin is the standardisation of protocols and the quantification and optimisation of performance according to key figures of merit defined by legislative/regulatory bodies.

However, there are few reported studies about quantification of active molecules in human skin using Raman spectroscopy that provide reference values for these criteria. Although a few studies, for example Caspers et al. [32] and Iliopoulos et al. [31], have demonstrated the ability of CRM to quantify the permeated flux [22], criteria such as RPD, BCMSEP, SEN, and SEL are essential not only to evaluate the performance of a technique but also to enable direct comparison of studies from the literature. Unfortunately, these key figures of merit are seldom considered in studies reporting quantitative application of Raman spectroscopy, not only for skin analysis, but in general.

Applying Raman spectroscopy to quantify ingredients in pharmaceutical tablets, Short et al. reported values of SEN = 15.13 (%$^{-1}$) and SEL = 0.37 for theophylline, SEN = 17.31 (%$^{-1}$) and SEL = 0.37 for lactose, SEN = 11.85 (%$^{-1}$) and SEL = 0.18 for microcrystalline cellulose, and SEN = 10.53 (%$^{-1}$) and SEL = 0.16 for starch, although no values of RPD and BCMSEP were reported [59]. The consistently high values of SEN, but low SEL, are similar to the observations for AI in SC reported here, as the solid matrix of the tablets analysed contributes a high degree of variability. Schönbichler et al. quantified furosemide from a powder mixture using Raman spectroscopy with a RPD value between 6.67 and 9.13, depending on data pre-processing [45]. Joshi et al. obtained a RPD = 7.84 and SEL = 0.01 for the quantification of olive oil in argan oil matrix using Raman spectroscopy [60]. In both these studies, it is also observed that RPD reported for Raman are within the range 5 and 10, considered adequate for quality control. Fan et al. have used surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) for quantification of carbaryl pesticides in Fuji apples with a RPD equal to 7.71 [61]. Despite the enhancement of the Raman signals, the RPD value did not improve compared to other studies.

Li et al. have reported in situ Raman spectroscopy for real time quantification of cell culture medium in a bioreactor to monitor the production of a monoclonal antibody [43]. RPD values for key parameters were 4.8 for the antibody, 8.1 for glucose, 2.5 for lactate, and 2.6 for glutamine. It was observed that the RPDs display significant variations, depending on the compounds quantified, which can have higher or lower Raman scattering cross sections (Raman intensity). The dynamic range of concentrations found in the mixtures was also seen to be a contributing factor. For instance, glucose, with the highest RPD, also had the broadest range of concentration 0–4.5 g·L^{-1}. BCMSEP further reflects the

importance of concentration ranges to interpret the results. Li et al. reported values equal to 4.43×10^{-4} g·L^{-1} for the antibody, 0.189 g·L^{-1} for the glucose, 0.4716 g·L^{-1} for lactate, and 0.026 g·L^{-1} for glutamine [43]. However, when these values are expressed as percentage of the concentration range analysed, it is found that BCMSEP represent respectively 0.22%, 8.4%, 41.9%, and 89.65% for the antibody, glucose, lactate, and glutamine. It suggests that, despite the low absolute value of BCMSEP obtained for glutamine, the precision is quite poor when concentrations analysed are considered. SEN values were respectively 14.24 g·L^{-1} for the antibody, 0.28 mM^{-1} for glucose, 0.67 mM^{-1} for lactate, and 1.43 mM^{-1} for glutamine. In the study of Li et al., SEL values of 0.65 for the antibody, 0.72 for glucose, 0.74 for lactate, and 0.67 for glutamine were determined. All values above 0.5 are not surprising, due to the difference in Raman spectral signatures collected from these compounds.

Therefore, although reports are few, it can be deduced that the reliability of the predictive model is significantly influenced by the complexity of the matrix analysed, the range of concentration studied, the strength of the Raman response of the AI, all of which can contribute to the degree of heterogeneity in the data collected. Coupling Raman spectroscopy with multivariate data mining methods such as PLSR enables the variance to be captured, reduced, and quantified.

5. Conclusions

Raman spectra encompass biochemical information about skin composition and the presence of active ingredients. Performing quantitative analysis for monitoring their penetration and diffusion in the skin relies on the sensitivity and specificity of the technique. In order to determine key figures of merit to characterise the performance of confocal Raman microscopy (CRM), an in vitro model delivering controlled concentrations in human *stratum corneum* (SC) has been developed. Resorcinol, used as model compound, can be detected and quantified in isolated SC samples coupling CRM to multivariate PLSR analysis. The RMSECV (0.017 mg resorcinol/mg SC), the RMSEP (0.015 mg resorcinol/mg SC), and R^2 (0.971) demonstrate the reliability of the linear regression constructed enable accurate quantification of resorcinol. Furthermore, the results have enabled the determination, for the first time, of numerical criteria to estimate analytical performances of CRM, including limit of detection (LOD), precision (BCMSEP), sensitivity (SEN), and selectivity (SEL) for quantification of the performance of the analytical technique. This is one crucial step towards demonstrating the compliance of Raman spectroscopy with international guidelines and towards establishing the technique as a reference and approved tool for permeation studies.

Author Contributions: Conceptualization, F.B., Y.D., H.J.B., A.T. and E.M.; methodology, H.K., Y.D., F.B. and M.S.; software, D.B. and F.B.; validation, F.B.; formal analysis, H.K., D.B. and F.B.; investigation, H.K., K.K., and M.S.; resources, F.B. and I.C.; data curation, H.K., D.B., F.B. and M.S.; writing—original draft preparation, H.K., Y.D., H.J.B. and F.B.; writing—review and editing, H.K., Y.D., H.J.B. and F.B.; visualization, H.K. and F.B.; supervision, F.B., Y.D. and E.M.; project administration, F.B. and E.M.; funding acquisition, F.B. and E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: ARD Centre Val de Loire—Project MINIONs (2020-00141275) and APR-IR—project UFO (2020-00138875) for funding. Y.D. thanks Le STUDIUM Institute of Advanced Studies for the research fellowship award.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G.S.; Bouwstra, J.A. The important role of *Stratum corneum* lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841*, 295–313. [CrossRef] [PubMed]
2. Elias, P.M. Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation. *J. Investig. Dermatol.* **1983**, *80*, S44–S49. [CrossRef] [PubMed]
3. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method*; OECD Publishing: Paris, France, 2004. [CrossRef]
4. Monteiro-Riviere, N.A. *Toxicology of the Skin*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2010.
5. Schmidberger, M.; Nikolic, I.; Pantelic, I.; Lunter, D. Optimization of Rheological Behaviour and Skin Penetration of Thermogelling Emulsions with Enhanced Substantivity for Potential Application in Treatment of Chronic Skin Diseases. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 361. [CrossRef]
6. Okunade, O.A.; Yekeen, N.; Padmanabhan, E.; Al-Yaseri, A.; Idris, A.K.; Khan, J.A. Shale core wettability alteration, foam and emulsion stabilization by surfactant: Impact of surfactant concentration, rock surface roughness and nanoparticles. *J. Pet. Sci. Eng.* **2021**, *207*, 109139. [CrossRef]
7. Franz, T.J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *J. Investig. Dermatol.* **1975**, *64*, 190–195. [CrossRef]
8. Directorate-General for Health and Consumers—European Commission. *Basic Criteria for the In Vitro Assessment of Dermal Absorption of Cosmetic Ingredients*; European Commission: Brussels, Belgium, 2010.
9. European Medicines Agency (EMA). *Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2018.
10. Supe, S.; Takudage, P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. *Skin Res. Technol.* **2021**, *27*, 299–308. [CrossRef]
11. Hughes, A.J.; Tawfik, S.S.; Baruah, K.P.; O'Toole, E.A.; O'Shaughnessy, R.F.L. Tape strips in dermatology research. *Br. J. Dermatol.* **2021**, *185*, 26–35. [CrossRef]
12. Escobar-Chavez, J.J.; Merino-Sanjuán, V.; López-Cervantes, M.; Urban-Morlan, Z.; Piñón-Segundo, E.; Quintanar-Guerrero, D.; Ganem-Quintanar, A. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2008**, *11*, 104. [CrossRef]
13. Bashir, S.J.; Chew, A.-L.; Anigbogu, A.; Dreher, F.; Maibach, H.I. Physical and physiological effects of *Stratum corneum* tape stripping: Effects of SC tape stripping. *Skin Res. Technol.* **2001**, *7*, 40–48. [CrossRef]
14. Baumann, K.Y.; Church, M.K.; Clough, G.F. Skin microdialysis: Methods, applications and future opportunities—An EAACI position paper. *Clin. Transl. Allergy* **2019**, *9*, 24. [CrossRef]
15. Bodenlenz, M.; Augustin, T.; Birngruber, T.; Tiffner, K.I.; Boulgaropoulos, B.; Schwingenschuh, S.; Raney, S.G.; Rantou, E.; Sinner, F. Variability of Skin Pharmacokinetic Data: Insights from a Topical Bioequivalence Study Using Dermal Open Flow Microperfusion. *Pharm. Res.* **2020**, *37*, 204. [CrossRef] [PubMed]
16. Caspers, P.J.; Lucassen, G.W.; Wolthuis, R.; Bruining, H.A.; Puppels, G.J. In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. *Biospectroscopy* **1998**, *4*, S31–S39. [CrossRef]
17. Krafft, C.; Schie, I.W.; Meyer, T.; Schmitt, M.; Popp, J. Developments in spontaneous and coherent Raman scattering microscopic imaging for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 1819–1849. [CrossRef] [PubMed]
18. Krafft, C.; Schmitt, M.; Schie, I.W.; Cialla-May, D.; Matthäus, C.; Bocklitz, T.; Popp, J. Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4392–4430. [CrossRef]
19. Silveira, L.; Pasqualucci, C.A.; Bodanese, B.; Pacheco, M.T.T.; Zângaro, R.A. Normal-subtracted preprocessing of Raman spectra aiming to discriminate skin actinic keratosis and neoplasias from benign lesions and normal skin tissues. *Lasers Med. Sci.* **2020**, *35*, 1141–1151. [CrossRef]
20. Tfaili, S.; Josse, G.; Angiboust, J.F.; Manfait, M.; Piot, O. Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy. *J. Biophotonics* **2014**, *7*, 676–681. [CrossRef]
21. Mateus, R.; Abdalghafor, H.; Oliveira, G.; Hadgraft, J.; Lane, M.E. A new paradigm in dermatopharmacokinetics—Confocal Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* **2013**, *444*, 106–108. [CrossRef]
22. Lunter, D.; Daniels, R. Confocal Raman microscopic investigation of the effectiveness of penetration enhancers for procaine delivery to the skin. *J. Biomed. Opt.* **2014**, *19*, 126015. [CrossRef]
23. dos Santos, L.; Tippavajhala, V.K.; Mendes, T.O.; da Silva, M.G.P.; Fávero, P.P.; Téllez Soto, C.A.; Martin, A.A. Evaluation of penetration process into young and elderly skin using confocal Raman spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2019**, *100*, 123–130. [CrossRef]
24. de Azevedo, J.R.; Bolzinger, M.-A.; Briançon, S.; Chevalier, Y.; Dancik, Y. Confocal Raman Microspectroscopy in the Assessment of Skin Barrier Function and Drug Penetration. In *Percutaneous Absorption*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2021; pp. 799–836.
25. Essendoubi, M.; Gobinet, C.; Reynaud, R.; Angiboust, J.F.; Manfait, M.; Piot, O. Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy. *Skin Res. Technol.* **2016**, *22*, 55–62. [CrossRef]
26. Pereira, A.F.M.; Rodrigues, B.V.M.; Neto, L.M.; Lopes, L.D.O.; da Costa, A.L.F.; Santos, A.S.; Viana, B.C.; Tosato, M.G.; da Silva, G.C.; Gusmao, G.O.M.; et al. Confocal Raman spectroscopy as a tool to assess advanced glycation end products on solar-exposed human skin. *Vib. Spectrosc.* **2021**, *114*, 103234. [CrossRef]
27. Boncheva, M.; de Sterke, J.; Caspers, P.J.; Puppels, G.J. Depth profiling of *Stratum corneum* hydration in vivo: A comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. *Exp. Dermatol.* **2009**, *7*, 870–876. [CrossRef] [PubMed]
28. Dancik, Y.; Sriram, G.; Rout, B.; Zou, Y.; Bigliardi-Qi, M.; Bigliardi, P.L. Physical and compositional analysis of differently cultured 3D human skin equivalents by confocal Raman spectroscopy. *Analyst* **2018**, *143*, 1065–1076. [CrossRef] [PubMed]

29. Zhang, Z. Confocal Raman microspectroscopy as an alternative method to investigate the extraction of lipids from *Stratum corneum* by emulsifiers and formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2018**, *11*, 61–71. [CrossRef] [PubMed]
30. Pudney, P.D.A.; Mélot, M.; Caspers, P.J.; van der Pol, A.; Puppels, G.J. An In Vivo Confocal Raman Study of the Delivery of Trans-Retinol to the Skin. *Appl. Spectrosc.* **2007**, *61*, 804–811. [CrossRef] [PubMed]
31. Iliopoulos, F.; Caspers, P.J.; Puppels, G.J.; Lane, M.E. Franz Cell Diffusion Testing and Quantitative Confocal Raman Spectroscopy: In Vitro-In Vivo Correlation. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 887. [CrossRef]
32. Caspers, P.J.; Nico, C.; Bakker Schut, T.C.; Sterke, J.; Pudney, P.D.A.; Curto, P.R.; Illand, A.; Puppels, G.J. Method to quantify the in vivo skin penetration of topically applied materials based on confocal Raman spectroscopy. *Transl. Biophotonics* **2019**, *1*, e201900004. [CrossRef]
33. Food and Drug Administration (FDA); Center for Drug Evaluation and Research (CDER); Center for Veterinary Medicine (CVM). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2018; 44p.
34. European Medicines Agency (EMA). *Guideline on Bioanalytical Method Validation*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2011.
35. Guideline, I.H. *Bioanalytical Method Validation M10*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2019.
36. Franzen, L.; Anderski, J.; Windbergs, M. Quantitative detection of caffeine in human skin by confocal Raman spectroscopy—A systematic in vitro validation study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95*, 110–116. [CrossRef]
37. Alonso, C.; Carrer, V.; Barba, C.; Coderch, L. Caffeine delivery in porcine skin: A confocal Raman study. *Arch. Dermatol. Res.* **2018**, *310*, 657–664. [CrossRef]
38. Dancik, Y.; Kichou, H.; Eklouh-Molinier, C.; Soucé, M.; Munnier, E.; Chourpa, I.; Bonnier, F. Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1041. [CrossRef]
39. Lieber, C.A.; Mahadevan-Jansen, A. Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Appl. Spectrosc.* **2003**, *57*, 1363–1367. [CrossRef] [PubMed]
40. Miloudi, L.; Bonnier, F.; Tfayli, A.; Yvergnaux, F.; Byrne, H.J.; Chourpa, I.; Munnier, E. Confocal Raman spectroscopic imaging for in vitro monitoring of active ingredient penetration and distribution in reconstructed human epidermis model. *J. Biophotonics* **2018**, *11*, e201700221. [CrossRef] [PubMed]
41. Callao, M.P.; Rius, F.X. Multivariate standardization techniques using UV-Vis data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1997**, *38*, 63–73.
42. *ISO 11843-2*; Capability of Detection–Part 2: Methodology in the Linear Calibration Case. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 2000.
43. Li, M.; Ebel, B.; Chauchard, F.; Guédon, E.; Marc, A. Parallel comparison of in situ Raman and NIR spectroscopies to simultaneously measure multiple variables toward real-time monitoring of CHO cell bioreactor cultures. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *137*, 205–213. [CrossRef]
44. Lorber, A.; Faber, K.; Kowalski, B.R. Net Analyte Signal Calculation in Multivariate Calibration. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1620–1626. [CrossRef]
45. Schönbichler, S.A.; Bittner, L.K.H.; Weiss, A.K.H.; Griesser, U.J.; Pallua, J.D.; Huck, C.W. Comparison of NIR chemical imaging with conventional NIR, Raman and ATR-IR spectroscopy for quantification of furosemide crystal polymorphs in ternary powder mixtures. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *84*, 616–625. [CrossRef]
46. Tfayli, A.; Piot, O.; Draux, F.; Pitre, F.; Manfait, M. Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. *Biopolymers* **2007**, *87*, 261–274. [CrossRef]
47. Tfaili, S.; Gobinet, C.; Josse, G.; Angiboust, J.-F.; Manfait, M.; Piot, O. Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: A comparative study between human skin and pig skin. *Analyst* **2012**, *137*, 3673–3682. [CrossRef]
48. Barry, B.W.; Edwards, H.G.M.; Williams, A.C. Fourier transform Raman and infrared vibrational study of human skin: Assignment of spectral bands. *J. Raman. Spectrosc.* **1992**, *23*, 641–645. [CrossRef]
49. Gniadecka, M.; Wulf, H.C.; Nielsen, O.F.; Christensen, D.H.; Hercogova, J. Distinctive Molecular Abnormalities in Benign and Malignant Skin Lesions: Studies by Raman Spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *66*, 418–423. [CrossRef]
50. Drużbicki, K.; Mikuli, E.; Pałka, N.; Zalewski, S.; Ossowska-Chruściel, M.D. Polymorphism of Resorcinol Explored by Complementary Vibrational Spectroscopy (FT-RS, THz-TDS, INS) and First-Principles Solid-State Computations (Plane-Wave DFT). *J Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 1681–1695. [CrossRef] [PubMed]
51. Lin, Z.; Wu, C.; Shi, P.; Wang, L.; Gao, S. General Toxicity Prediction Approach for Mixtures Containing Polar Narcotic Chemicals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *71*, 345–353. [CrossRef] [PubMed]
52. Allegrini, F.; Olivieri, A.C. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 7858–7866. [CrossRef] [PubMed]
53. Oleneva, E.; Khaydukova, M.; Ashina, J.; Yaroshenko, I.; Jahatspanian, I.; Legin, A.; Kirsanov, D. A Simple Procedure to Assess Limit of Detection for Multisensor Systems. *Sensors* **2019**, *19*, 1359. [CrossRef]
54. *ISO 11843-1*; Capability of Detection—Part 1: Terms and Definitions. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland, 1997.
55. Makki, A.A.; Massot, V.; Byrne, H.J.; Respaud, R.; Bertrand, D.; Mohammed, E.; Chourpa, I.; Bonnier, F. Understanding the discrimination and quantification of monoclonal antibodies preparations using Raman spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *194*, 113734. [CrossRef]

56. Makki, A.A.; Massot, V.; Byrne, H.J.; Respaud, R.; Bertrand, D.; Mohammed, E.; Chourpa, I.; Bonnier, F. Vibrational spectroscopy for discrimination and quantification of clinical chemotherapeutic preparations. *Vib. Spectrosc.* **2021**, *113*, 103200. [CrossRef]
57. Burgués, J.; Marco, S. Multivariate estimation of the limit of detection by orthogonal partial least squares in temperature-modulated MOX sensors. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1019*, 49–64. [CrossRef]
58. Ostra, M.; Ubide, C.; Vidal, M.; Zuriarrain, J. Detection limit estimator for multivariate calibration by an extension of the IUPAC recommendations for univariate methods. *Analyst* **2008**, *133*, 532. [CrossRef]
59. Short, S.M.; Cogdill, R.P.; Anderson, C.A. Determination of figures of merit for near-infrared and raman spectrometry by net analyte signal analysis for a 4-component solid dosage system. *Aaps Pharmscitech* **2007**, *8*, 109–119. [CrossRef]
60. Joshi, R.; Cho, B.-K.; Joshi, R.; Lohumi, S.; Faqeerzada, M.A.; Amanah, H.Z.; Lee, J.; Mo, C.; Lee, H. Raman spectroscopic analysis to detect olive oil mixtures in argan oil. *Korean J. Agric. Sci.* **2019**, *46*, 183–194. [CrossRef]
61. Fan, Y.; Lai, K.; Rasco, B.A.; Huang, Y. Determination of carbaryl pesticide in Fuji apples using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with multivariate analysis. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *60*, 352–357. [CrossRef]

V.2 Etude 2 : Impact de l'analyse par Micro-spectroscopie Confocale Raman sur la fonction barrière de la peau humaine

V.2.1 Contexte et motivation

Cette étude a été réalisée dans le cadre du projet MINIONs, financé par la Région Centre-Val de Loire dans le cadre du programme ARD CVL Cosmétosciences. L'un des objectifs du projet était de développer une approche analytique basée sur la micro-spectroscopie confocale Raman (CRM) pour l'évaluation et les tests d'efficacité de produits cosmétiques in vivo. Grâce au financement du projet MINIONs, l'EA 6295 "NMNS" a pu acquérir un système Raman en configuration in vivo (GEN-2 SCA Skin Composition Analyser, RiverD International BV, Rotterdam, Pays-Bas).

Dans le cadre du WP2 de ce projet, une collaboration a été établie avec Eurofins Spincontrol, un centre d'évaluation de l'efficacité des produits cosmétiques sur des volontaires humains. Ces volontaires sont rémunérés pour leur participation aux différentes études. Ce centre est agréé par le ministère de la Santé et certifié ISO 9001 pour les tests in vivo de produits cosmétiques. L'objectif de cette collaboration est d'intégrer la CRM comme technique d'évaluation de la pénétration et de l'efficacité des cosmétiques dans le catalogue des tests instrumentaux proposés aux clients d'Eurofins Spincontrol. Pour répondre à la demande de notre partenaire, la première étape de ce projet consiste à démontrer expérimentalement le caractère non invasif du système GEN2-SCA sur la fonction barrière de la peau. À cette fin, le caractère non invasif a été vérifié sur des biopsies de peau humaine par une étude comparative entre les perméations cutanées de caféine à travers les peaux exposées et les peaux témoins (non exposées).

V.2.2 Introduction

La micro-spectroscopie Raman confocale (CRM) appliquée à la peau est une technique avancée qui permet une analyse détaillée et précise des caractéristiques moléculaires de la peau à une échelle microscopique. En combinant les principes de la spectroscopie Raman avec la résolution spatiale (~1 µm) de la microscopie confocale, cette méthode fournit des informations spécifiques sur des régions précises de la peau [1, 2]. La CRM présente des avantages majeurs en tant que technique non destructive, permettant une analyse directe et en temps réel de la structure et de la composition d'un échantillon sans nécessiter de préparation. Cela rend son utilisation prometteuse pour des études in vivo à grande échelle sur la perméation cutanée et l'efficacité des cosmétiques, telles que celles proposées par Eurofins Spincontrol.

Comme mentionné dans le chapitre I (voir section I.3.2.1), la CRM repose sur le principe de l'interaction lumière/matière. Lorsqu'elle est appliquée à la peau, les photons collectés fournissent une information complexe sur les modes de vibrations moléculaires caractéristiques des différents composants cutanés (voir section I.3.3.1). Cette approche présente de nombreux avantages dans les domaines de la dermatologie et de la recherche sur la peau. Elle permet d'identifier et de cartographier des composants spécifiques tels que les lipides, les protéines ou les pigments, et de visualiser leur distribution spatiale à l'intérieur de la peau [3, 4]. De plus, la CRM peut être utilisée pour suivre les changements biochimiques qui se produisent dans la peau en réponse à des traitements, des maladies ou des affections cutanées [5]. Grâce à sa résolution spatiale élevée [6], cette technique permet également de sonder différentes couches de la peau, de l'épiderme jusqu'au derme profond, offrant ainsi une compréhension complète de la structure et de la composition de la peau.

Dans ce contexte, les premières recherches menées par Caspers et al, se sont concentrées sur la structure et la composition du tissu cutané. En 1998, ils ont utilisé la CRM pour étudier la peau humaine in vitro et in vivo. Les résultats ont révélé que le spectre Raman du derme est principalement composé de signaux de collagène, tandis que les spectres de la couche cornée sont dominés par les contributions des lipides et de la kératine [7]. Les résultats ont également montré des variations significatives de la couche cornée en fonction de la région anatomique et de l'individu examiné [7]. Par la suite, Caspers et al, ont développé une méthodologie d'analyse en profondeur pour déterminer les profils de concentration moléculaire des composants biochimiques de la peau. Les spectres sont ajustés par une méthode des moindres carrés multiples avec des combinaisons pondérées par des spectres des constituants de la peau isolés, considérés comme des spectres de référence (par exemple le spectre de la kératine). Cette étude a permis la quantification de l'eau et des principaux constituants de la peau, tels que les facteurs naturels d'hydratation (NMF) [8]. Suite à ces développements, la CRM a été utilisée pour l'étude de la diffusion d'ingrédients actifs dans la peau [9–14].

Les résultats obtenus par CRM in vitro montrent une bonne corrélations avec les résultats obtenus par les techniques de références utilisées pour l'étude de diffusion cutanée, comme les cellules de Franz [12], le tape stripping [13]. Suite à cela, la CRM a été utilisé in vivo, notamment pour l'étude de l'altération de la barrière cutanée [15], l'impact du vieillissement sur la teneur en eau et la composition du NMF [16], l'effet des tensioactifs sur les lipides cutanés [17], pour l'étude des effets de produits cosmétiques hydratants [18–22], le suivi de la libération du trans-rétinol [23], et pour étudier l'effet des promoteur de pénétration en profondeur [24].

La CRM appliquée à la peau est souvent considérée comme une technique non invasive en raison de l'utilisation de lasers de faible puissance (entre 10 et 40 mW) avec des longueurs d'onde comprises entre 500 et 800 nm [14, 25–27]. Cette assertion repose sur le principe selon lequel l'irradiation par les lasers ne devrait pas altérer ou endommager l'intégrité de la peau, bien que cela n'ait pas été vérifié expérimentalement dans les conditions d'usage liées à la mesure de la pénétration cutanée d'actifs. Cependant, ces études utilisent la CRM dans des conditions expérimentales diverses. Il est important de noter que l'altération des tissus peut dépendre fortement de la durée totale de l'analyse, qui peut varier considérablement en fonction des objectifs de l'étude, du type d'analyse (surface ou profils en profondeur) et du niveau d'informations requis. Par conséquent, il est pertinent de mener une évaluation expérimentale de l'aspect non invasif de la CRM appliquée à la peau in vivo dans les conditions expérimentales envisagées dans le cadre du projet MINIONs.

L'objectif de cette étude est de démontrer expérimentalement le caractère non invasif de la CRM en mesurant l'effet de l'irradiation de la lumière laser sur la fonction barrière de la peau. Étant donné qu'il n'est pas possible de réaliser cette étude directement in vivo, nous avons travaillé in vitro sur des biopsies de peau abdominale humaine prélevées sur six donneurs différents. Cela a été fait afin de limiter l'influence d'éventuelles différences inter-donneurs sur nos résultats, qui ne seraient pas liées à la méthode mais à la variabilité interindividuelle. Nous avons utilisé un système Raman confocal (GEN-2 SCA Skin Composition Analyser, RiverD International BV, Rotterdam, Pays-Bas), largement utilisé pour l'analyse de la peau humaine in vivo et in vitro, notamment dans le domaine médical [27, 29]. Ce système est équipé de deux lasers fonctionnant à des longueurs d'onde différentes : 785 nm et 671 nm, respectivement, délivrant des puissances différentes sur l'échantillon : 25 mW pour le 785 nm et 20 mW pour le 671 nm. Le laser à 785 nm est utilisé pour analyser la région des empreintes cutanées (FP : FingerPrint) (400 - 1800 cm^{-1}), tandis que le laser à 671 nm est utilisé pour analyser la région des nombres d'onde élevés (HWN : High WaveNumbers) (2500 - 4000 cm^{-1}).

La région des empreintes cutanées, comme son nom l'indique, présente de nombreuses bandes Raman avec des pics de raies caractéristiques et spécifiques à chaque molécule, ce qui en fait un choix idéal pour suivre la pénétration d'une molécule active et observer ses effets sur la peau. En revanche, la région des nombres d'onde élevés présente moins de pics que la région des empreintes cutanées, mais elle contient les bandes OH de l'eau, qui permettent d'évaluer le taux d'hydratation de la peau. La combinaison de ces deux régions offre des informations complémentaires et indispensables pour les études in vivo.

Pour simuler une étude in vivo et évaluer l'effet sur l'intégrité de la peau, l'analyse par CRM a été réalisée pendant 45 minutes en utilisant un profilage en profondeur (profilage Z) sur les deux régions. Pour la FP, le profilage Z consistait en une exposition de 5 secondes et des incréments de 3 µm jusqu'à une profondeur de 30 µm. Quant à la HWN, le profilage a été réalisé avec un temps d'exposition de 4 secondes et des incréments de 5 µm, atteignant une profondeur finale de 60 µm. En prenant en compte l'utilisation des deux lasers, le nombre de profils en Z nécessaires pour une représentation statistique complète de l'échantillon (~30 profils par région, 800 spectres par échantillon) et les durées moyennes d'analyse rapportées dans la littérature, le temps d'analyse par échantillon a été fixé à 45 minutes. Cette durée de 45 minutes d'analyse a été jugée tolérable par les volontaires et validée par notre partenaire. Pour évaluer l'intégrité de la fonction barrière après exposition au laser, des mesures de perte insensible en eau Trans-Épidermique (TEWL) et des cinétiques de perméation de la caféine ont été réalisées sur les peaux exposées au laser ainsi que sur les peaux témoins (non-exposées). Les résultats des mesures de TEWL et des cinétiques de perméation ont ensuite été comparés entre les peaux exposées au laser et les peaux témoins (non-exposées).

V.2.3 Matériels et Méthodes

V.2.3.1 Réactifs :

La caféine a été achetée chez Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France), l'eau ultrapure Elix® chez Merck (Darmstadt, Allemagne). Le méthanol, l'acide phosphorique et le tampon phosphate salin de Dulbecco (D-PBS) ont été achetés chez Fisher scientific (Illkirch, France).

V.2.3.2 Les biopsies de peau humaine :

Les biopsies de peau humaine dermatomées, d'un diamètre de 20 mm, ont été obtenus auprès d'Alphenyx (Marseille, France), qui effectue le prélèvement et la diffusion des échantillons conformément à l'article L.1245 du CSP du code de la santé publique français, qui régit l'utilisation des produits du corps humain à des fins de recherche scientifique. Les échantillons de peau ont été prélevés sur six femmes caucasiennes qui avaient subi une abdominoplastie. Un total de 48 explants cutanés, comprenant 8 échantillons de chaque donneur, a été utilisé dans cette étude. Les échantillons ont été identifiés comme suit : Donneur 1 (37 ans, phototype 2, épaisseur de 511,3 ± 25,5 µm), Donneur 2 (53 ans, phototype 2, épaisseur de 510 ± 16 µm), Donneur 3 (45 ans, phototype 3, épaisseur de 476 ± 20 µm), Donneur 4 (40 ans, phototype 2, épaisseur de 507 ± 27 µm), Donneur 5 (40 ans, phototype 2, épaisseur de 502 ± 33 µm) et Donneur 6 (43 ans, phototype 3, épaisseur de 514,1 ± 18,8 µm). Les échantillons de peau

congelés ont été stockés à -20 °C jusqu'à la veille de l'expérience. Chaque expérience a été réalisée en n=4.

V.2.3.3 Expériences de perméation :

Les expériences de perméation ont été réalisées à l'aide d'un dispositif vertical et statique de cellules Franz en verre (configuration à 9 cellules) avec une surface de diffusion de 0,64 cm^2 et un compartiment récepteur de 5,0 mL (Permegear Inc, PA, USA). Le compartiment récepteur de chaque cellule était rempli de PBS dégazé (pH 7,4) maintenu à 37 °C. Le milieu récepteur était maintenu en agitation continue (500 tr/min) à l'aide d'un agitateur magnétique. Les échantillons de peau ont été décongelés à 4 °C pendant la nuit précédant le jour des expériences. Ils ont ensuite été montés sur les cellules de diffusion de Franz avec le derme tourné vers le compartiment récepteur, en contact avec le milieu récepteur (PBS, pH 7,4). Avant d'appliquer la solution de caféine, la peau a été équilibrée en contact avec le milieu récepteur pendant 30 minutes. Des mesures de la perte insensible en eau Trans-Épidermique (TEWL) à l'aide d'un VapoMeter (Delfin Technologies, Kuopio, Finlande) ont été réalisées sur chaque biopsie. Pour chaque donneur (n=8), les expériences de perméation ont été divisées en deux ensembles :

(i) 4 échantillons de chaque donneur, ont servi de groupe témoin. Ces expériences de perméation ont été réalisées directement après l'étape d'équilibration et les mesures de TEWL. Ces échantillons étaient identifiés comme des peaux "***Contrôles***".

(ii) 4 échantillons de chaque donneur étaient destinés à l'analyse par CRM avant les expériences de perméation. Ces échantillons étaient étiquetés comme des peaux "***Exposées au laser***".

V.2.3.4 Expériences de perméation de la caféine :

Six cents microlitres d'une solution de caféine à 2% (m/m) ou 20 g/L ont été appliquée à la surface de la peau. Des aliquotes de 200 µL de milieu récepteur ont été prélevées toutes les 0,5 heures de 0,5 à 3 heures, puis toutes les heures de 3 à 6 heures (voir figure V1). Après chaque prélèvement, 200 µL de PBS à température ambiante, ont été immédiatement ajoutés au milieu récepteur pour maintenir le volume constant pendant toute la durée de l'expérience. Tous les prélèvements ont été analysés par HPLC. Toutes les expériences ont été réalisées en n=4, et les données ont été rapportées sous la forme de la moyenne ± l'écart type (SD).

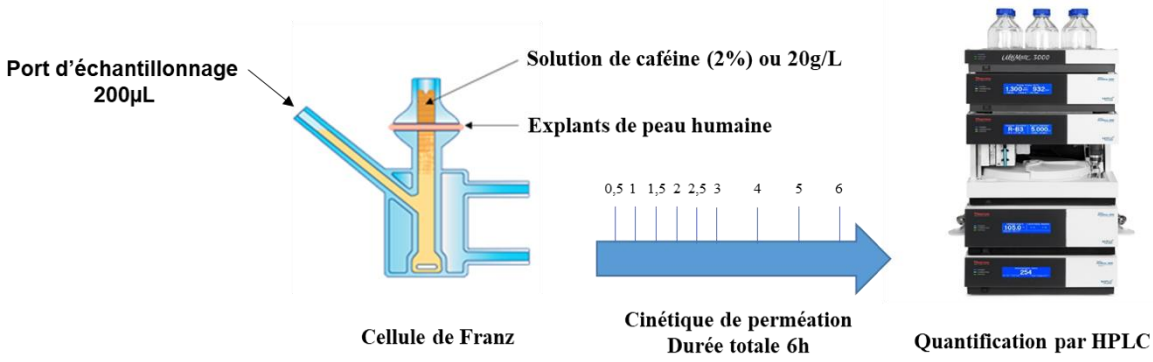


Figure V1 : *Schéma représentant l'expérience de perméation de la caféine.*

V.2.3.5 Préparation de la peau pour l'analyse CRM :

Après l'étape d'équilibration en cellule de Franz, les peaux ont été retirées du système et placées sur une compresse humidifiée préalablement avec de l'eau distillée pour éviter la déshydratation de la peau. Par la suite, les biopsies ont été placées sur la fenêtre d'analyse du système Raman (avec le côté de la couche cornée tourné vers la fenêtre) pour une analyse en profondeur, tandis que la compresse était placée du côté du derme de la peau pour éviter la déshydratation pendant les 45 minutes d'analyse Raman.

Après l'analyse Raman, les échantillons de peau ont été replacés sur la cellule de Franz, et une mesure de TEWL a été effectuée. Une fois que la peau a été rééquilibrée pendant 5 minutes afin d'obtenir la valeur de TEWL avant l'exposition au laser, une seconde mesure de TEWL a été réalisée pour évaluer les effets de l'exposition au laser. Ensuite, les expériences de perméation ont été initiées.

V.2.3.6 Bilans de masse :

Après les 6 heures de perméation, les solutions de caféine ont été collectées et les peaux ont été retirées des cellules de diffusion de Franz. Les deux faces des explants ont été soigneusement nettoyées avec des cotons tiges pour éliminer tout excès de solution. Les cotons tiges ont ensuite été immergés dans 2 mL de méthanol pendant une durée de 15 heures, afin d'en extraire la caféine. Les échantillons de peau ont été découpés en petits morceaux (~1 mm^2) et placés dans 2 mL de méthanol pendant une durée de 15heures, pour l'extraction. Les solutions pour le bilan de masse ont été analysées par HPLC.

V.2.3.7 Analyse par HPLC-DAD :

A la fin de l'essai de perméation, les milieux récepteurs et les solutions appliquées sur la peau ont été analysés par HPLC afin de déterminer la concentration de caféine. Les extractions des

bilans de masse ont été analysées par le même protocole. Le système HPLC (Ultimate 3000, Dionex) est composé d'une pompe UHPLC, d'un auto-injecteur, d'un détecteur à barrette de diodes et d'une colonne Interchim Kromasil Vintage Series C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm). La longueur d'onde de détection pour la caféine était de 272 nm. La température de la colonne et de l'auto-injecteur était réglée à 25 °C et 15 °C, respectivement. La phase mobile utilisée est composée de méthanol à 50 % : de l'eau à 50 % (v/v) + 10 mM d'acide phosphorique. La phase mobile a été utilisée en mode isocratique. Le volume d'injection des échantillons était de 10 µL. La durée de l'analyse de chaque échantillon était de 6 minutes avec un débit de 1 ml/min. Le logiciel utilisé était Chromeleon 7.1 (Thermo Scientific). Une courbe d'étalonnage a été préparée avant l'analyse. Les étalons ont été préparés en triplicata en dissolvant de la caféine dans du PBS à des concentrations de 1, 5, 10, 100 et 500 µg/min. Le temps de rétention observé était de 2,62 ± 0,08 minutes.

V.2.3.8 Microscopie Confocale Raman (CRM) :

L'analyse de spectroscopie Raman confocale a été réalisée à l'aide du GEN-2 SCA Skin Composition Analyser (RiverD International BV, Rotterdam, Pays-Bas). Le système RiverD est composé d'un analyseur et d'un ordinateur pour le piloter. L'analyseur est l'unité de mesure du système gen2-SCA. Ce dernier est contrôlé via un logiciel de contrôle des instruments 'RiverICon' installé sur l'ordinateur. L'analyseur est équipé d'un module Raman haute performance (HPRM) intégré avec un détecteur CCD, de deux lasers (671 nm et 785 nm respectivement), d'un objectif avec une grande ouverture numérique mobile en Z et d'une platine de mesure motorisée pour les mouvements (X, Y). La figure V2 montre une représentation schématique d'un profilage en profondeur du GEN-2 SCA. L'instrument est calibré quotidiennement à l'aide d'une lampe néon-argon intégrée, dont les longueurs d'onde d'émission sont connues. Le décalage des longueurs d'onde était calibré à l'aide d'une référence standard de méthacrylate de polyméthyle (Plexiglas^{TM}).

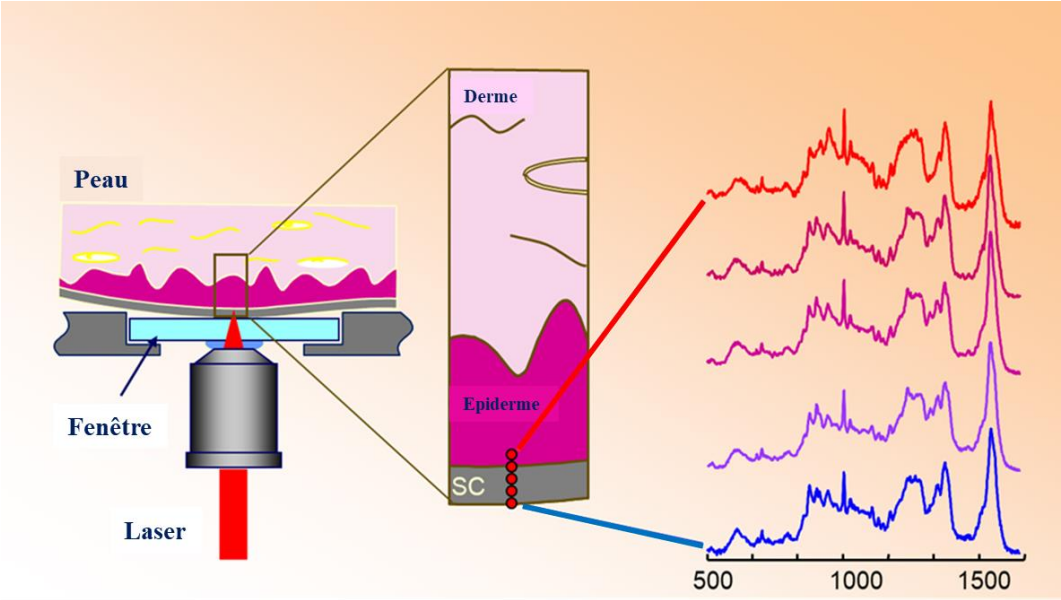


Figure V2 : *Représentation schématique d'un profilage en profondeur du GEN-2 SCA Skin [1].*

V.2.3.9 Analyse des données de perméation :

Les résultats sont représentés sous forme d'un graphique montrant la quantité cumulée de caféine qui traverse la peau par unité de surface du modèle de peau (µg/cm^2) :

$$Q_{\mathrm{n}} = \frac{C_{\mathrm{n}} \times V_{\mathrm{rec}} + \sum_{i=1}^{i=n-1} C_{\mathrm{i}} \times V_{\mathrm{i}}}{S} \qquad \textbf{(1)}$$

En utilisant Q_n (µg/cm^2) comme masse cumulative de caféine à l'instant n, normalisée par la surface de diffusion S, et C_n (mg/cm^3) comme concentration du milieu récepteur déterminée par HPLC, les paramètres suivants sont calculés pour comparer les résultats de perméation de la caféine entre les formulations. V_{rec} représente le volume du compartiment récepteur (2 mL) contenant le milieu récepteur, C_i se réfère aux concentrations calculées lors de l'intervalle de temps précédent, et Vi correspond au volume de l'échantillon (ici, $V_i = V_{rec}$).

Trois paramètres supplémentaires sont dérivés pour caractériser la perméation de la caféine. Le flux à l'état stable (Jss = dQ/dt, exprimé en µg/cm²·h) est déterminé par la pente du profil de la quantité cumulative pendant la phase d'état stationnaire (portion linéaire) du profil. Le temps de latence (tlag, exprimé en heures) représente le délai nécessaire à la diffusion à travers la peau pour atteindre un état stationnaire. Il est déterminé par l'intersection de la pente (Jss) avec l'axe des temps [28, 29].

$$Q(t) = J_{\mathrm{SS}}\left(t - t_{\mathrm{lag}}\right) \qquad \textbf{(2)}$$

Le coefficient de perméabilité (Kp, exprimé en cm/h) est une mesure du taux auquel l'ingrédient actif pénètre dans la peau et est calculé en utilisant l'équation suivante :

$$K_{\mathrm{p}} = J_{\mathrm{SS}}/C_{\mathrm{d}} \quad \textbf{(3)}$$

La concentration du donneur appliqué (C_d) en µg/cm^3 est utilisée dans l'équation. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type (n=3). Une analyse statistique a été réalisée en utilisant le test de Student avec un niveau de signification de $p \leq 0,05$.

V.2.4 Résultats et Discussion

V.2.4.1 Mesures de la perte insensible en eau transépidermique

Les mesures de la perte insensible en eau transépidermique (TEWL) sont largement utilisées pour évaluer la fonction barrière de la peau in vitro et in vivo [30, 31], en évaluant sa capacité à retenir l'humidité et à maintenir son hydratation. En mesurant la quantité d'eau qui s'évapore de la peau, les appareils de mesure de la TEWL fournissent des informations précieuses sur l'état de la barrière cutanée [32]. Ainsi, les mesures de la TEWL offrent une méthode objective et non invasive pour évaluer l'intégrité de la barrière cutanée. Elles sont largement utilisées dans la recherche dermatologique, le développement de produits cosmétiques, ainsi que dans les études cliniques visant à évaluer l'efficacité des produits cosmétiques.

Les mesures de la TEWL sont utilisées pour détecter les altérations de la barrière cutanée telles que les lésions, les irritations ou les inflammations [33]. Des valeurs élevées de TEWL indiquent une altération de la fonction barrière de la peau, pouvant résulter de conditions dermatologiques telles que l'eczéma, le psoriasis ou des traumatismes cutanés [34, 35]. Les recommandations des lignes directrices de l'OCDE, de l'EMA et de la FDA concernant la vérification de l'intégrité cutanée avant les tests de perméation cutanée stipulent que des valeurs de TEWL inférieures à 25 g/m²h sont considérées comme acceptables, témoignant de l'intégrité de la peau et de sa fonction barrière pour les besoins des tests [30, 36, 37].

Dans un premier temps, des mesures de la TEWL ont été effectuées après une période d'équilibration de 30 minutes à l'aide d'une cellule de Franz sur l'ensemble des biopsies provenant de différents donneurs. Cette étape initiale vise à évaluer la qualité des échantillons utilisés ainsi que l'intégrité de leur fonction barrière. Les valeurs de TEWL obtenues se situent entre 8 et 12 g/m²h, en fonction de la variabilité biologique intra et inter-donneurs. Ces résultats indiquent que les explants utilisés dans cette étude n'ont pas été endommagés lors de l'ablation chirurgicale.

Dans un second temps, des mesures supplémentaires de TEWL ont été effectuées sur les explants exposés au Raman afin de vérifier l'intégrité de la fonction barrière après l'irradiation laser. Les valeurs obtenues ont ensuite été comparées avec celles obtenues après la première équilibration (avant l'exposition au laser). La Figure V3 présente les mesures de TEWL avant et après l'exposition au laser pour les six donneurs.

Pour le Donneur 1, les valeurs de TEWL étaient de 11,67 ± 0,29 g/m²h avant l'exposition au laser et de 10,87 ± 0,75 g/m²h après l'exposition au laser. Dans le cas du Donneur 2, les mesures de TEWL affichaient des valeurs de 10,07 ± 0,90 g/m²h avant l'exposition au Raman et de 10,07 ± 0,21 g/m²h après l'exposition au laser. En ce qui concerne le Donneur 3, les valeurs de TEWL étaient de 9,20 ± 0,20 g/m²h avant l'exposition au laser et de 8,73 ± 1,10 g/m²h après l'exposition au laser, respectivement. Le Donneur 4 présentait des valeurs avoisinant 8,97 ± 0,57 g/m²h avant l'exposition au laser et de 9,17 ± 0,76 g/m²h après l'exposition au laser. Dans le cas du Donneur 5, la valeur de TEWL avant l'exposition au laser était de 9,47 ± 0,25 g/m²h, tandis qu'après l'exposition, la valeur était de 9,83 ± 0,21 g/m²h. Les valeurs de TEWL du Donneur 6 affichaient des valeurs de 10,63 ± 1,05 g/m²h avant l'exposition au laser et de 10,73 ± 0,31 g/m²h après l'exposition au laser.

Les valeurs de TEWL obtenues varient entre 8 et 12 g/m²h, en fonction des donneurs et de la variabilité intra-donneur. Les valeurs de TEWL mesurées dans cette étude sont inférieures à 25 g/m²h et sont en parfaite adéquation avec les valeurs de référence d'une peau intacte physiologiquement selon les lignes directrices des tests de diffusion in vitro et in vivo [30, 31]. Les valeurs de TEWL avant et après l'exposition au laser ont été comparées statistiquement pour chaque donneur, et aucune différence significative n'a été observée, avec des p-values égales à $p = 0,20 > 0,05$ pour le Donneur 1, $p = 0,63 > 0,05$ pour le Donneur 2, $p = 0,54 > 0,05$ pour le Donneur 3, $p = 0,74 > 0,05$ pour le Donneur 4, $p = 0,13 > 0,05$ pour le Donneur 5 et $p = 0,89 > 0,05$ pour le Donneur 6.

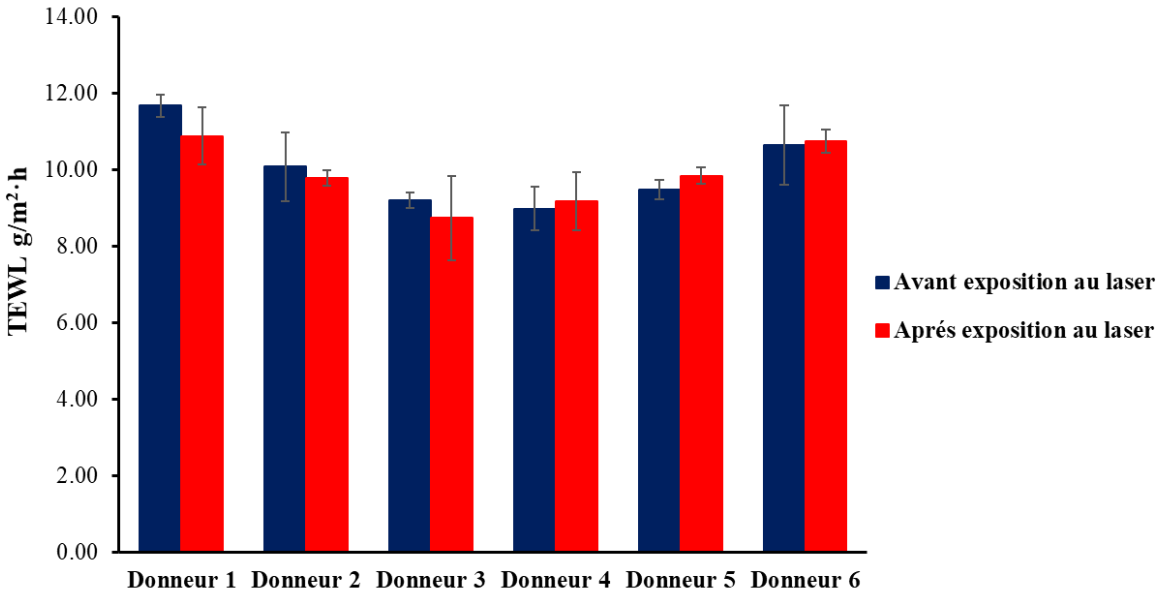


***Figure V3** : Perte insensible en eau Trans-Épidermique (TEWL) mesurées avant et après exposition au laser sur les Donneur 1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et Donneur 6. Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart-type (n=3).*

La mesure de la TEWL présente à la fois des avantages et des limites. Parmi les avantages, elle offre une méthode non invasive pour évaluer l'intégrité de la barrière cutanée et surveiller les modifications de la perméabilité cutanée. De plus, elle est relativement rapide, facile à réaliser et non invasive, ce qui en fait une technique pratique pour les tests in vivo, évitant ainsi des procédures plus complexes ou invasives. Cependant, il est important de noter que la mesure de la TEWL fournit une évaluation indirecte de la fonction barrière de la peau et ne permet pas une analyse complète de tous les paramètres pertinents. Dans ce contexte, une étude très récente de Alsamad et al, démontre que la mesure de la TEWL n'est pas toujours représentative de la barrière cutanée et que cette mesure peut être utile pour différencier de grands changements dans la fonction de barrière cutanée (par exemple, entre une peau saine et malade), mais elle est moins sensible aux petites variations qui suivent la pénétration de molécules [38]. En conséquence, des cinétiques de perméation ont été réalisées sur des peaux exposées et des peaux témoins afin d'évaluer l'impact de l'irradiation sur la barrière cutanée, qui limite la perméation et la pénétration de molécules exogènes.

V.2.4.2 Expériences de perméation de la caféine

En plus des mesures de TEWL, pour démontrer l'impact de l'irradiation de la peau par les lasers du système GEN2-SCA sur l'intégrité de la fonction barrière de la peau et donc sa perméabilité, nous avons réalisé des expériences de perméation de la caféine comme mesure directe, sur les explants exposés au Raman et sur les explants témoins (non exposés au Raman).

La caféine est un petit composé hydrophile de la classe des méthylxanthines [39, 40]. Cette molécule a été utilisée dans plusieurs préparations cosmétiques, notamment en tant qu'ingrédient anticellulite. Selon Herman et al., la caféine peut stimuler la dégradation des graisses lors de la lipolyse en inhibant l'activité de la phosphodiestérase [41]. Plus récemment, les propriétés antioxydantes ainsi que son effet vasoconstricteur et décongestionnant, réduisant la visibilité des poches sous les yeux et des cernes, a également été rapporté [42]. En plus de ses propriétés biologiques, la caféine est reconnue comme une substance de référence pour les tests d'absorption cutanée in vitro utilisant des cellules de diffusion de Franz par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) [43, 44]. Il est reconnu que l'utilisation de la peau humaine est soumise à des considérations et des conditions éthiques nationales et internationales. La peau dermatomée, d'une épaisseur comprise entre 200 et 500 µm, peut également être utilisée, à condition que l'intégrité de la peau puisse être démontrée [45].

Pour évaluer l'impact de l'exposition des biopsies au laser, nous avons comparé les courbes d'évolution cinétique entre les peaux témoins et les peaux exposées pour chaque donneur individuellement. La Figure V4 montre la quantité cumulative de caféine récupérée dans les liquides récepteurs pour les peaux témoins et les peaux exposées au laser en fonction du temps pour (a) : Donneur 1 ; (b) : Donneur 2 ; (c) : Donneur 3 ; (d) : Donneur 4 ; (e) : Donneur 5 et (f) : Donneur 6.

Dans l'ensemble, les profils présentent une tendance similaire pour tous les donneurs, aussi bien pour les peaux contrôles que pour les peaux exposées au laser. Un profil similaire et superposé est observé à 30 minutes et 2,5 heures, correspondant à la phase pré-stationnaire (non linéaire) du profil. Une légère variation a été ensuite observée entre 2,5 et 6 heures, correspondant à la phase stationnaire (linéaire) de la cinétique, sans qu'une tendance à la hausse ou à la baisse en fonction de l'irradiation puisse être identifiée.

Pour le donneur 1, les courbes cinétiques (Figure V4 a) ont montré des quantités cumulées de caféine après 6 heures de perméation de 108,24 ± 26,01 µg/cm² pour les peaux exposées au

laser et de 95,58 ± 15,79 µg/cm² pour les peaux contrôles. Les valeurs étaient très proches et aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les peaux contrôles et exposées au laser ($p = 0,52 > 0,05$).

Pour le donneur 2, les quantités de caféine après 6 heures (Figure V4 b) étaient de 24,19 ± 2,27 µg/cm² pour les peaux exposées au laser et de 24,38 ± 6,25 µg/cm² pour les peaux contrôles. Les valeurs ont été comparées statistiquement et aucune différence n'a été trouvée ($p = 0,96 > 0,05$).

En ce qui concerne le donneur 3, les quantités de caféine après 6 heures (Figure V4 c) étaient d'environ 131,40 ± 28,02 µg/cm² pour les peaux exposées au laser et de 111,82 ± 13,19 µg/cm² pour les peaux contrôles. Les valeurs étaient assez proches et ne présentaient pas de différence statistique significative ($p = 0,35 > 0,05$).

Pour les courbes du donneur 4, la quantité de caféine (Figure V4 d) était de 37,88 ± 3,41 µg/cm² pour les peaux exposées au laser et de 33,84 ± 3,62 µg/cm² pour les peaux contrôles. Les valeurs ont été comparées statistiquement et aucune différence n'a été trouvée ($p = 0,23 > 0,05$).

Dans le cas du donneur 5, les quantités de caféine après 6 heures (Figure V4 e) étaient de 27,50 ± 5,13 µg/cm² pour les peaux exposées au laser et de 36,88 ± 5,05 µg/cm² pour les peaux contrôles. Les valeurs ont été comparées statistiquement et aucune différence n'a été trouvée ($p = 0,91 > 0,05$).

Concernant le dernier donneur (donneur 6), les profils de perméation (Figure V4 f) ont montré une quantité de caféine de 35,59 ± 2,85 µg/cm² pour les peaux exposées au laser et de 30,53 ± 4,41 µg/cm² pour les peaux contrôles après 6 heures de perméation. Les valeurs ont été comparées statistiquement et aucune différence n'a été trouvée ($p = 0,13 > 0,05$).

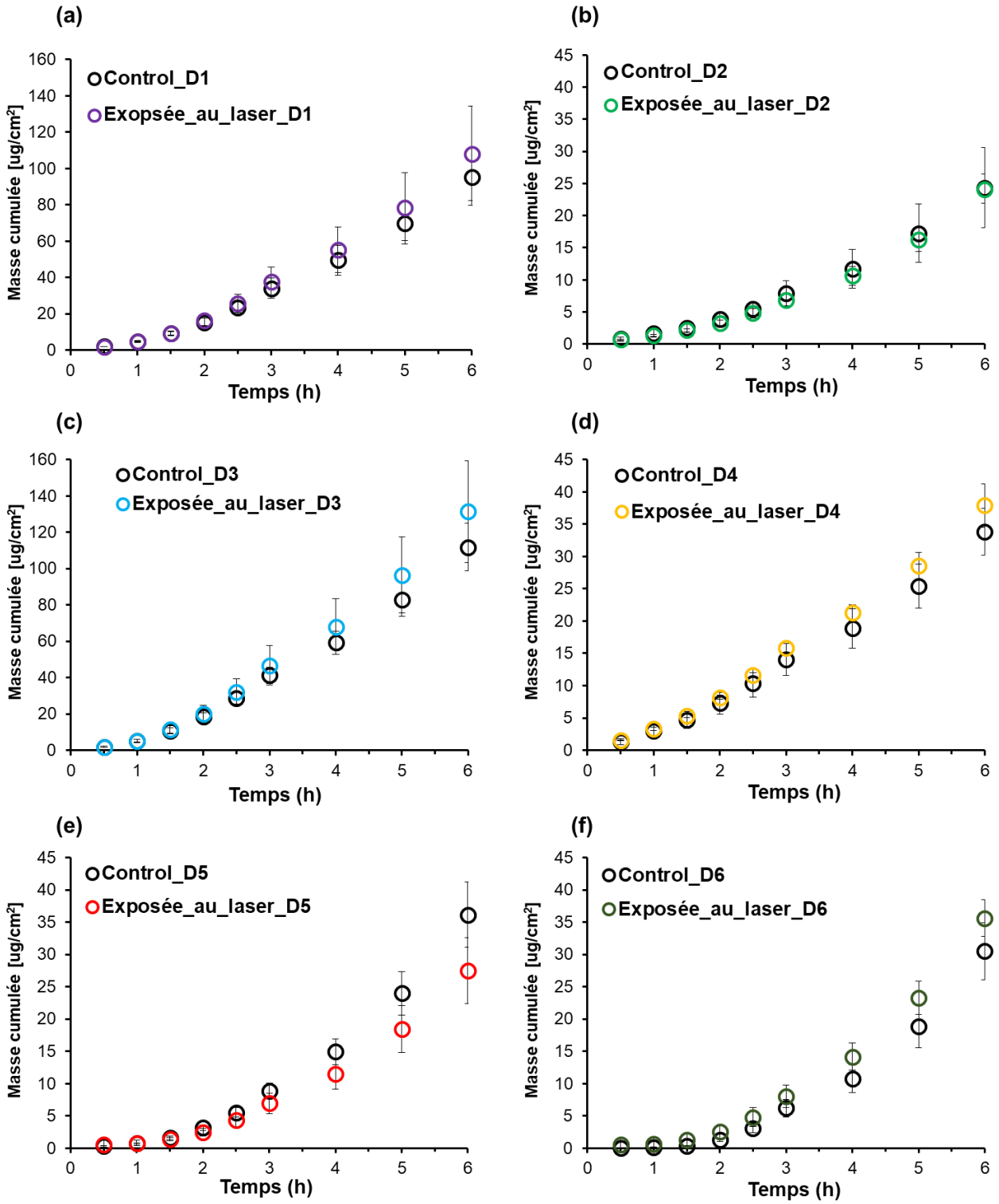


Figure V4: *Masses cumulées de caféine à travers les peaux contrôles et exposées au laser en fonction du temps pour les 6 donneurs (Donneur 1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et Donneur6). Les valeurs sont présentées en moyenne ± écart-type (n=4).*

Pour une meilleure représentation graphique, des ratios ont été calculés entre les masses cumulées de caféine après 6 heures de perméation à travers les peaux exposées au laser et les peaux de contrôle pour chaque donneur. Ces ratios ont ensuite été exprimés en pourcentage, comme suit : $\left(Ratio = \frac{Masse\ cumulée\ peaux\ exposées\ au\ Raman}{Masse\ cumulée\ peaux\ \text{contrôles}}\ X\ 100\right)$. La figure V5 présente les ratios de masses cumulées après 6 heures de perméation pour les peaux exposées au laser et les peaux contrôles (considérées comme 100%) des donneurs 1, 2, 3, 4, 5 et 6. Les résultats montrent que les valeurs moyennes de perméation ne révèlent aucune différence significative entre les masses cumulées des peaux exposées au laser et celles des peaux contrôles.

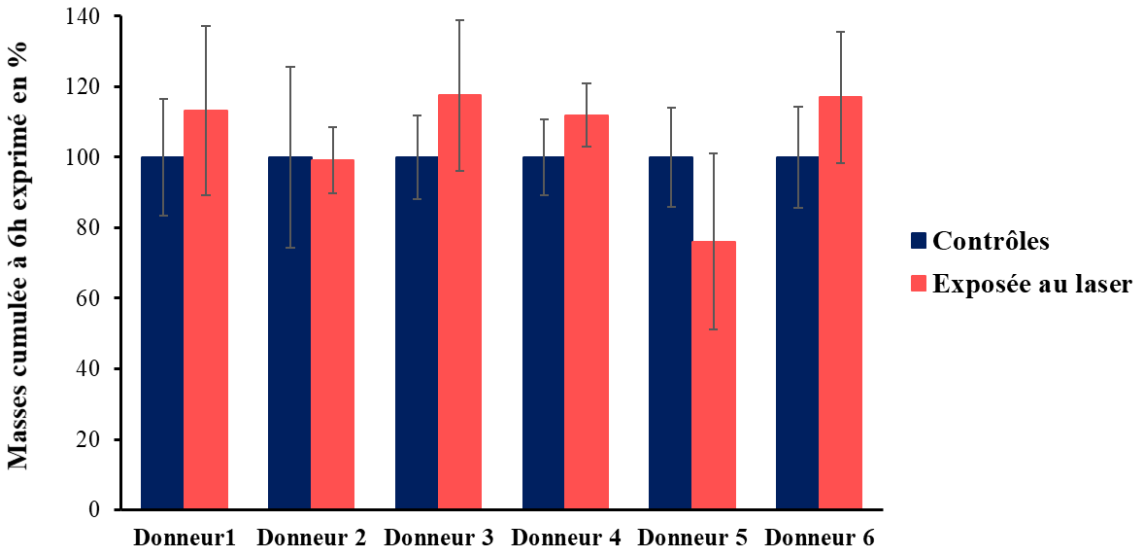


Figure V5 : *Ratios de masses cumulées après 6h de perméation des peaux exposées au laser et les peaux contrôles (considérées comme 100%) pour le Donneur1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et le Donneur 6. Les données sont présentées en moyennes ± écart-type (n=4).*

Pour une analyse plus approfondie de la perméation de la caféine à travers les peaux exposées et les peaux témoins, les paramètres Jss (flux), tlag (temps de latence) et kp (coefficient de perméabilité) ont été calculés à partir des cinétiques de perméation de la caféine présentées dans la Figure V4. Les flux à l'état stationnaire (Jss), les temps de latence (tlag) et les coefficients de perméabilité (kp) ont été calculés à partir des données de perméation pour les peaux exposées au laser et les peaux témoins, conformément à la description donnée dans le chapitre I (section I.2.5). Les résultats sont résumés dans le Tableau V1.

Les flux à l'état stationnaire (Jss) de caféine n'ont montré aucune différence significative entre les peaux exposées au laser et les peaux contrôles pour tous les donneurs ($p = [0,24, 0,80] > 0,05$). Les valeurs des flux de caféine à travers la peau du donneur 1 étaient de 24 ± 5 µg/cm²h pour les peaux exposées au laser et de 23 ± 4 µg/cm²h pour les peaux contrôles. Pour le donneur 2, les valeurs étaient de $6,1 \pm 0,2$ µg/cm²h (exposées au laser) et de $7,3 \pm 2,3$ µg/cm²h (contrôles). Dans le cas du donneur 3, la valeur de flux pour les peaux exposées au laser était de 28 ± 6 µg/cm²h, tandis que pour les peaux contrôles, elle était de 27 ± 4 µg/cm²h. Pour le donneur 4, le Jss de caféine présentait une valeur de $7,3 \pm 0,1$ µg/cm²h pour les peaux exposées au laser et de $7,5 \pm 0,3$ µg/cm²h pour les peaux contrôles. Le donneur 5 a montré des valeurs de flux de caféine d'environ $9,1 \pm 1,2$ µg/cm²h pour les peaux exposées au laser et de $10,6 \pm 1,5$ µg/cm²h pour les peaux contrôles. Enfin, pour le dernier donneur (donneur 6), les peaux exposées au laser ont affiché une valeur de Jss de $9,2 \pm 0,4$ µg/cm²h, tandis que les peaux contrôles présentaient une valeur de $9,6 \pm 1,1$ µg/cm²h.

De plus, lors de la comparaison des tendances des temps de latence, il a été observé que les peaux exposées au laser atteignaient l'état stationnaire plus tôt que les peaux contrôles. Par exemple, chez le donneur 4, le temps de latence pour les peaux exposées au laser était d'environ 0,96 h, ce qui était inférieur au temps de latence des peaux contrôles (1,52 h). Une observation similaire a été faite pour le donneur 6, où les temps de latence étaient de 1,47 h pour les peaux exposées au laser et de 2,99 h pour les peaux contrôles. Les coefficients de perméabilité, tout comme les flux, n'ont présenté aucune différence statistiquement significative entre les peaux exposées au laser et les peaux contrôles pour tous les donneurs ($p = [0,26, 0,79] > 0,05$).

En 2018, Musazzi et al. ont étudié la perméation cutanée de la caféine (0,4 %) chargée dans une émulsion conventionnelle [46]. Le test de perméation a été réalisé dans un système de cellules de Franz sur des peaux humaines provenant d'un seul donneur. Cette étude a rapporté un taux de perméation de 0,3 % de la dose appliquée. De plus, dans l'étude 2 du chapitre II, qui explore la perméation à travers des explants de peau humaine provenant de différents donneurs, l'étude visait la perméation d'émulsions chargées en caféine à une concentration de 2 %. Les résultats ont montré que le taux de perméation de la caféine variait en fonction des donneurs, avec des valeurs allant de 0,1 % pour le donneur 1 à 0,5 % pour le donneur 2 et 0,6 % pour le donneur 3 [47]. Il était attendu que la quantité de caféine pénétrant à travers une matrice biologique complexe telle que la peau présente un niveau d'hétérogénéité inhérent aux systèmes biologiques [48].

De plus, bien qu'il soit bien établi que la peau humaine soit la référence en matière de tests de perméation, d'importantes disparités dans sa perméabilité ont été signalées en raison de variations interindividuelles et intra-individuelles, telles que le site cutané sélectionné, l'âge et le mode de vie du donneur [49, 50]. Les taux de perméation de la caféine dans la présente étude étaient similaires (sans différence significative) entre les peaux exposées et les témoins. Pour une comparaison avec la littérature, les taux de perméation de la caféine ont été calculés en moyenne entre les peaux témoins et les peaux exposées. Les valeurs sont de 0,90 ± 0,08 % pour le donneur 1, 0,26 ± 0,06 % pour le donneur 2, 1,17 ± 0,03 % pour le donneur 3, 0,32 ± 0,03 % pour le donneur 4, 0,32 ± 0,01 % pour le donneur 5 et 0,30 ± 0,03 % pour le donneur 6. Les taux de perméation des donneurs 2, 4, 5 et 6 étaient similaires aux taux de perméation rapportés par Musazzi et al. En ce qui concerne les donneurs 1 et 3, les taux de perméation étaient similaires aux résultats de Schreiber et al. pour la perméation d'une solution de caféine (2 %) sur la peau humaine, où les taux de perméation de la caféine avoisinaient 1 % [40]. En résumé, les taux de perméation de la caféine dans cette étude, en tenant compte de la variabilité intra-donneur des peaux, étaient en accord avec les résultats de la littérature, ce qui prouve que la fonction barrière des peaux utilisées était intacte.

Tableau V1 : Flux au steady-state (Jss), temps de latence (tlag) et le coefficient de perméabilité (Kp) obtenus des profils de masse cumulée en fonction du temps des peaux contrôles et les peaux exposées au laser pour le donneur 1 (a), le donneur 2 (b), le donneur 3 (c), le donneur 4 (d), le donneur 5 (e) et le donneur 6 (f).

(a)

Donneur 1	**Contrôles**	**Exposées au laser**
Jss [µg / (cm^2.h)]	23 ± 4	24 ± 5
tlag [h]	1.88 ± 0.14	1.66 ± 0.17
Kp [cm/h]	1.15 ± 0.19	1.21 ± 0.24

(b)

Donneur 2	Contrôles	Exposées au laser
Jss [µg / (cm^2.h)]	7.3 ± 2.3	6.1 ± 0.2
tlag [h]	2.17 ± 0.03	1.82 ± 0.25
Kp [cm/h]	0.36 ± 0.11	0.30 ± 0.01

(c)

Donneur 3	Contrôles	Exposées au laser
Jss [µg / (cm^2.h)]	27 ± 4	28 ± 6
tlag [h]	1.79 ± 0.14	1.47 ± 0.08
Kp [cm/h]	1.34 ± 0.21	1.41 ± 0.29

(d)

Donneur 4	Contrôles	Exposées au laser
Jss [µg / (cm^2.h)]	7.5 ± 0.3	7.3 ± 0.1
tlag [h]	1.52 ± 0.33	0.96 ± 0.21
Kp [cm/h]	0.38 ± 0.01	0.37 ± 0.1

(e)

Donneur 5	Contrôles	Exposées au laser
Jss [µg / (cm^2.h)]	10.6 ± 1.5	9.1 ± 1.2

tlag [h]	2.64 ± 0.02	2.16 ± 0.08
Kp [cm/h]	0.53 ± 0.08	0.46 ± 0.06

(f)

Donneur 6	**Contrôles**	**Exposées au laser**
Jss [µg / (cm^2.h)]	9.6 ± 1.1	9.2 ± 0.4
tlag [h]	2.99 ± 0.11	1.47 ± 0.08
Kp [cm/h]	0.49 ± 0.06	0.46 ± 0.02

En plus des études de perméation, la quantité de caféine accumulée dans les explants de peau a été déterminée par HPLC et exprimée en pourcentage de la dose appliquée. La figure V6 présente les pourcentages de masse de caféine dans les peaux exposées au laser et les peaux contrôles pour les six donneurs. Les résultats révèlent que les quantités de caféine retrouvées dans les peaux exposées au laser sont de 0,14 ± 0,02 % pour le donneur 1, 0,16 ± 0,02 % pour le donneur 2, 0,12 ± 0,03 % pour le donneur 3, 0,12 ± 0,01 % pour le donneur 4, 0,13 ± 0,03 % pour le donneur 5 et 0,11 ± 0,02 % pour le donneur 6. En ce qui concerne les quantités retrouvées dans les peaux contrôles, les valeurs sont de 0,16 ± 0,02 % pour le donneur 1, 0,17 ± 0,02 % pour le donneur 2, 0,14 ± 0,03 % pour le donneur 3, 0,13 ± 0,02 % pour le donneur 4, 0,15 ± 0,01 % pour le donneur 5 et 0,12 ± 0,02 % pour le donneur 6. Les valeurs ont été comparées statistiquement et aucune différence significative n'a été observée entre les quantités de caféine dans les peaux exposées au laser et les peaux contrôles ($0,14 < p < 0,38$). Ces résultats démontrent que l'irradiation aux lasers n'affecte pas l'accumulation de caféine dans la peau, ce qui prouve qu'une utilisation du système GEN2-SCA pendant 45 minutes ne compromet pas l'intégrité de la fonction barrière.

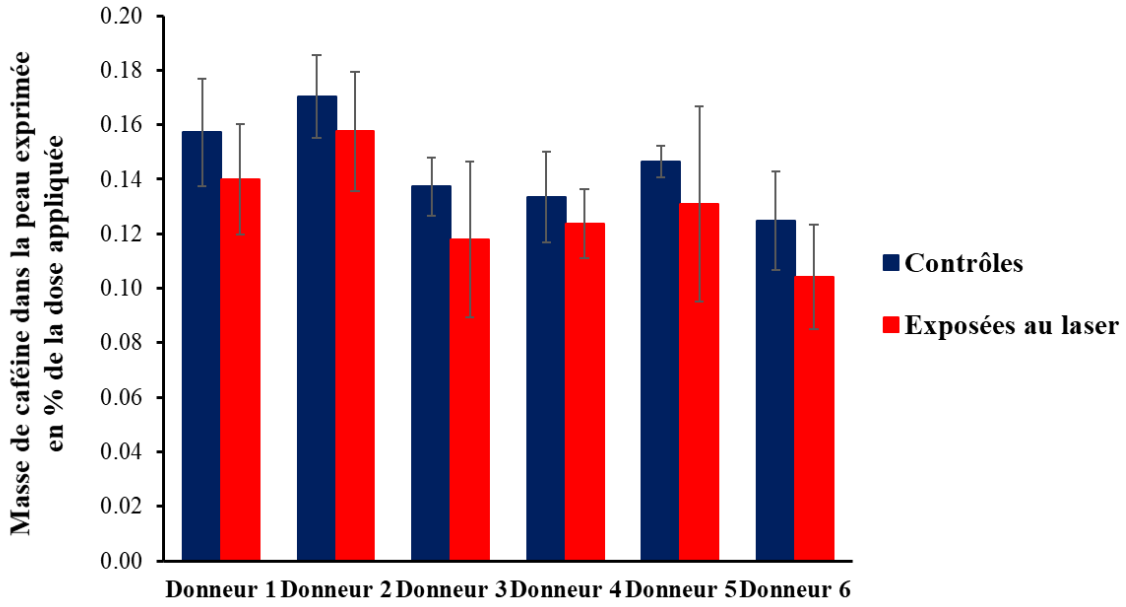


Figure V6 : *Masse de caféine récupérée dans les peaux contrôles et exposées au laser pour le Donneur1, Donneur 2, Donneur 3, Donneur 4, Donneur 5 et Donneur 6. Les valeurs sont présentées en moyennes ± écart-type (n=4).*

En résumé, les résultats de cette étude confirment le caractère non-invasif de l'analyse par CRM. Les peaux exposées à l'irradiation laser lors des analyses par CRM ont montré des valeurs de TEWL similaires à celles des peaux contrôles. De plus, les masses cumulées de caféine récupérées dans les liquides récepteurs et les taux d'accumulation de caféine exprimés en pourcentage de la dose appliquée dans la peau étaient équivalents entre les peaux exposées au laser et les peaux contrôles. Les paramètres de diffusion calculés à partir des cinétiques de perméation, tels que le flux, le temps de latence et les coefficients de perméabilité, ont également montré des valeurs similaires entre les peaux contrôles et les peaux exposées. Ces observations ont été obtenues auprès de six donneurs avec des âges et des phototypes différents (phototypes 2 et 3). Ainsi, cette étude démontre que l'exposition de 45 minutes aux lasers du GEN-2 SCA ne compromet pas la fonction barrière de la peau. Les résultats concernant la caféine en tant que molécule modèle hydrophile peuvent être généralisés à d'autres molécules partageant des propriétés physico-chimiques similaires. Cependant, il serait intéressant d'explorer d'autres molécules ayant des propriétés différentes.

Dans le cadre de notre collaboration avec Eurofins Spincontrol, les résultats de cette étude ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'utilisation du système GEN2-SCA pour évaluer l'efficacité des produits cosmétiques sur des volontaires humains (in vivo). Le système GEN2-SCA est facilement déplaçable grâce à sa configuration et sera donc mis à disposition dans les

locaux d'Eurofins Spincontrol. De plus, le personnel technique sera formé pour collecter des données sur les volontaires humains. La méthodologie développée prévoit une durée d'analyse de 45 minutes, correspondant à celle utilisée dans cette étude. Cette durée permet d'obtenir une représentation statistique de la zone analysée (environ 30 profils par région, 800 spectres par échantillon) et reste tolérable pour les volontaires sans entraîner de frais supplémentaires.

La première étude vise à évaluer l'effet des produits cosmétiques sur l'hydratation et le renforcement de la barrière cutanée chez 40 volontaires humains en bonne santé. Plusieurs instruments de mesure usuels seront utilisés, notamment la mesure de la TEWL et la Cornéométrie en parallèle de l'analyse par CRM. Il est important de souligner que cet enjeu est de taille, car cette étude cherche à comparer les effets sur des peaux saines, en se concentrant sur des modifications minimes entre les volontaires. Cela pourrait mettre à l'épreuve la sensibilité des instruments utilisés, remettant en question les performances analytiques de la CRM, comme cela a été mentionné dans la première étude du chapitre V. La deuxième étude vise à évaluer in vivo l'efficacité d'un produit chargé en caféine, à une concentration de 5 % (m/m). Ce produit sera appliqué sur 10 volontaires (panélistes), et des mesures de la TEWL, de la Cornéométrie et de la CRM seront effectuées à différents intervalles pendant 3 heures afin d'évaluer les cinétiques de diffusion du produit dans la peau des volontaires.

V.2.5 Conclusion

L'analyse par micro-spectroscopie Raman confocale (CRM) offre de nombreux avantages et ouvre des perspectives prometteuses dans le domaine de l'étude de la peau. Les résultats de cette étude ont fourni une confirmation tangible que l'analyse par CRM telle qu'elle a été réalisée dans cette étude ne compromet pas la fonction barrière de la peau, comme en témoignent les mesures de TEWL et l'utilisation de la caféine comme molécule de référence pour les cinétiques de perméation. Cela démontre clairement son caractère non invasif. Ces résultats ouvrent de nouvelles opportunités pour son utilisation in vivo dans le cadre d'études d'efficacité des produits cosmétiques en collaboration avec Eurofins Spincontrol. L'objectif est d'intégrer la CRM en tant qu'instrument de mesure complémentaire aux techniques biométriques telles que la Cornéométrie et la mesure du TEWL au sein d'Eurofins Spincontrol. Ces études nous permettront d'évaluer les performances analytiques de la CRM, comme cela a été abordé dans la première étude de ce chapitre (#Article 6), dans des conditions d'utilisation in vivo.

V.2.6 Références

1. Byrne HJ, Bielfeldt S, Bonnier F, et al (2022) Monitoring Dermal Penetration and Permeation Kinetics of Topical Products; the Role of Raman Microspectroscopy. SSRN Electron J. https://doi.org/10.2139/ssrn.4030268

2. Böhling A, Bielfeldt S, Himmelmann A, Keskin M, Wilhelm K-P (2014) Comparison of the stratum corneum thickness measured in vivo with confocal Raman spectroscopy and confocal reflectance microscopy. Skin Res Technol 20:50–57

3. Stella A, Bonnier F, Tfayli A, Yvergnaux F, Byrne HJ, Chourpa I, Munnier E, Tauber C (2020) Raman mapping coupled to self-modelling MCR-ALS analysis to estimate active cosmetic ingredient penetration profile in skin. J Biophotonics 13:e202000136

4. Ali S, Bonnier F, Ptasinski K, Lambkin H, Flynn K, Lyng F, Byrne H (2013) Raman spectroscopic mapping for the analysis of solar radiation induced skin damage. Analyst 138:3946–3956

5. Caspers PJ, Lucassen GW, Wolthuis R, Bruining HA, Puppels GJ (1998) In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. Biospectroscopy 4:S31–S39

6. Everall NJ (2000) Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of confocal Raman microscopy. Appl Spectrosc 54:773–782

7. Caspers PJ, Lucassen GW, Wolthuis R, Bruining HA, Puppels GJ (1998) In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. Biospectroscopy 4:S31–S39

8. Caspers PJ, Bruining HA, Puppels GJ, Lucassen GW, Carter EA (2001) In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. J Invest Dermatol 116:434–442

9. de Azevedo JR, Bolzinger M-A, Briançon S, Chevalier Y, Dancik Y (2021) Confocal Raman Microspectroscopy in the Assessment of Skin Barrier Function and Drug Penetration. In: Percutaneous Absorpt. CRC Press, pp 799–836

10. dos Santos L, Tippavajhala VK, Mendes TO, da Silva MGP, Fávero PP, Téllez Soto CA, Martin AA (2019) Evaluation of penetration process into young and elderly skin using confocal Raman spectroscopy. Vib Spectrosc 100:123–130

11. Essendoubi M, Gobinet C, Reynaud R, Angiboust JF, Manfait M, Piot O (2016) Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy. Skin Res Technol 22:55–62

12. Lunter D, Daniels R (2014) Confocal Raman microscopic investigation of the effectiveness of penetration enhancers for procaine delivery to the skin. J Biomed Opt 19:126015

13. Mateus R, Abdalghafor H, Oliveira G, Hadgraft J, Lane ME (2013) A new paradigm in dermatopharmacokinetics – Confocal Raman spectroscopy. Int J Pharm 444:106–108

14. Tfaili S, Josse G, Angiboust J-F, Manfait M, Piot O (2014) Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy: Raman follow-up of skin permeation. J Biophotonics 7:676–681

15. Richters RJ, Falcone D, Uzunbajakava NE, Varghese B, Caspers PJ, Puppels GJ, Van Erp PE, van de Kerkhof PC (2017) Sensitive skin: assessment of the skin barrier using confocal Raman microspectroscopy. Skin Pharmacol Physiol 30:1–12

16. Boireau-Adamezyk E, Baillet-Guffroy A, Stamatas GN (2021) The stratum corneum water content and natural moisturization factor composition evolve with age and depend on body site. Wiley Online Library

17. Liu Y, Lunter DJ (2020) Systematic investigation of the effect of non-ionic emulsifiers on skin by confocal raman spectroscopy—A comprehensive lipid analysis. Pharmaceutics 12:223

18. Chrit L, Bastien P, Biatry B, Simonnet J-T, Potter A, Minondo AM, Flament F, Bazin R, Sockalingum GD, Leroy F (2007) In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: assessment of a new moisturizing agent, pMPC. Biopolym Orig Res Biomol 85:359–369

19. Chrit L, Bastien P, Sockalingum GD, Batisse D, Leroy F, Manfait M, Hadjur C (2006) An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerol-based hydration cream. Skin Pharmacol Physiol 19:207–215

20. Crowther JM, Matts PJ, Kaczvinsky JR (2012) Changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration by moisturizers. Treat Dry Skin Syndr Art Sci Moisturizers 545–560

21. Crowther JM, Sieg A, Blenkiron P, Marcott C, Matts PJ, Kaczvinsky JR, Rawlings AV (2008) Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. Br J Dermatol 159:567–577

22. Tippavajhala VK, Magrini TD, Matsuo DC, Silva MG, Favero PP, De Paula LR, Martin AA (2018) In vivo determination of moisturizers efficacy on human skin hydration by confocal raman spectroscopy. AAPS PharmSciTech 19:3177–3186

23. Pudney PD, Mélot M, Caspers PJ, Van Der Pol A, Puppels GJ (2007) An in vivo confocal Raman study of the delivery of trans-retinol to the skin. Appl Spectrosc 61:804–811

24. Mélot M, Pudney PD, Williamson A-M, Caspers PJ, Van Der Pol A, Puppels GJ (2009) Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum cornum by in vivo confocal Raman spectroscopy. J Controlled Release 138:32–39

25. Tfayli A, Piot O, Draux F, Pitre F, Manfait M (2007) Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. Biopolymers 87:261–274

26. Liu Y, Lunter DJ (2021) Profiling skin penetration using PEGylated emulsifiers as penetration enhancers via confocal Raman spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Eur J Pharm Biopharm 166:1–9

27. Caspers PJ, Nico C, Bakker Schut TC, Sterke J, Pudney PDA, Curto PR, Illand A, Puppels GJ (2019) Method to quantify the in vivo skin penetration of topically applied materials based on confocal RAMAN spectroscopy. Transl Biophotonics. https://doi.org/10.1002/tbio.201900004

28. Kichou H, Dancik Y, Eklouh-Molinier C, Huang N, Soucé M, Gressin L, Gillet G, Chourpa I, Munnier E, Bonnier F (2022) Highlighting the efficiency of ultrasound-based emulsifier-free emulsions to penetrate reconstructed human skin. Int J Cosmet Sci ics.12772

29. Dancik Y, Kichou H, Eklouh-Molinier C, Soucé M, Munnier E, Chourpa I, Bonnier F (2020) Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation. Pharmaceutics 12:1041

30. OCDE (2004) Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method.

31. OCDE (2004) Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method.

32. Fluhr JW, Feingold KR, Elias PM (2006) Transepidermal water loss reflects permeability barrier status: validation in human and rodent in vivo and ex vivo models. Exp Dermatol 15:483–492

33. Pinnagoda J, Tupkek RA, Agner T, Serup J (1990) Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement: a report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. Contact Dermatitis 22:164–178

34. Loden M, OLSSON H, Axell T, LINDE YW (1992) Friction, capacitance and transepidermal water loss (TEWL) in dry atopic and normal skin. Br J Dermatol 126:137–141

35. Seidenari S, Giusti G (1995) Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. Acta Derm Venereol 75:429–433

36. FDA U (2018) Bioanalytical method validation guidance for industry, US Department of Health and Human Services. Food Drug Adm Cent Drug Eval Res CDER Cent Vet Med CVM Biopharm 1–44

37. EMA C (2018) Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products.

38. Alsamad F, Stamatas GN (2023) Directional assessment of the skin barrier function in vivo. Skin Res Technol 29:e13346

39. Rodrigues F, Alves AC, Nunes C, Sarmento B, Amaral MH, Reis S, Oliveira MBP (2016) Permeation of topically applied caffeine from a food by—product in cosmetic formulations: Is nanoscale in vitro approach an option? Int J Pharm 513:496–503

40. Schreiber S, Mahmoud A, Vuia A, et al (2005) Reconstructed epidermis versus human and animal skin in skin absorption studies. Toxicol In Vitro 19:813–822

41. Herman A, Herman AP (2015) Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review: Essential oils for transdermal drug delivery. J Pharm Pharmacol 67:473–485

42. Rosado C, Tokunaga VK, Sauce R, De Oliveira CA, Sarruf FD, Parise-Filho R, Maurício E, de Almeida TS, Velasco MVR, Baby AR (2019) Another reason for using caffeine in dermocosmetics: Sunscreen adjuvant. Front Physiol 519

43. OECD (2011) Guidance Notes on Dermal Absorption, Series on Testing and Assessment No. 156. OECD 36:1–72

44. Pulsoni I, Lubda M, Aiello M, Fedi A, Marzagalli M, von Hagen J, Scaglione S (2022) Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. SLAS Technol.

45. USEPA (2004) In vitro dermal absorption rate testing of certain chemicals of interest to the occupational safety and health administration; final rule. Fed Regist 69:22402–22441

46. Musazzi UM, Franzè S, Minghetti P, Casiraghi A (2018) Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product? Drug Deliv Transl Res 8:414–421

47. Kichou H, Caritá AC, Gillet G, Bougassaa L, Perse X, Soucé M, Gressin L, Chourpa I, Bonnier F, Munnier E Efficiency of emulsifier-free emulsions in delivering caffeine and α-tocopherol to human skin. Int. J. Cosmet. Sci.

48. Park S Biochemical, structural and physical changes in aging human skin, and their relationship. 14

49. Todo H (2017) Transdermal permeation of drugs in various animal species. Pharmaceutics 9:33

50. Boonen J, Malysheva SV, Taevernier L, Di Mavungu JD, De Saeger S, De Spiegeleer B (2012) Human skin penetration of selected model mycotoxins. Toxicology 301:21–32

VI. CONCLUSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Dans cette partie, nous commencerons par rappeler les principaux domaines de recherche explorés au cours de cette thèse. Par la suite, nous procéderons à une synthèse succincte des résultats majeurs obtenus, tout en abordant les perspectives de recherche qui peuvent en découler.

VI.1 Les axes de recherche

Selon les directives de plusieurs agences réglementaires telles que l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE), L'Agence Européenne de Médicaments (EMA) et la Food and Drug Administration (FDA), les tests de diffusion cutanée in vitro sont d'une importance cruciale pour évaluer la perméation, la pénétration et donc l'efficacité et la toxicité des médicaments et des cosmétiques pour application cutanée.

La méthode recommandée implique l'utilisation de peau humaine pour ces essais. Une fois que l'intégrité de la peau a été vérifiée à l'aide de mesures biométriques telles que la mesure de la perte insensible en eau Trans épidermique (TEWL), les produits sont appliqués sur la peau à l'aide d'un dispositif de cellule de Franz. Ensuite, la quantité de la molécule active qui traverse la peau est déterminée à l'aide de techniques analytiques, généralement la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). En parallèle, la quantité de molécule présente dans la peau peut être mesurée après extraction. Dans des cas plus rigoureux, la distribution de la molécule active dans le stratum corneum est évaluée par le tape stripping, où la quantité de la molécule active est également déterminée grâce à une extraction à partir des cellules adhérentes aux bandes adhésives, suivie d'une quantification par HPLC. L'HPLC s'est imposée en tant que technique de référence car elle permet la séparation et le dosage de tous types de molécules. Elle est accessible et présente dans de nombreux laboratoires. Elle fournit des informations quantitatives concernant la perméation et la pénétration des produits à partir de faibles volumes d'analyte et avec une grande sensibilité, ce qui permet de distinguer, par exemple, les performances de différentes formulations, comme le montrent les chapitres I et II. Néanmoins, l'utilisation de l'HPLC requiert des étapes pré-analytiques qui impliquent l'extraction de la molécule active du tissu à l'aide de solvants organiques. Cette procédure entraîne la destruction de l'échantillon, ce qui entraîne une perte d'informations sur la profondeur de pénétration de la molécule dans la peau, au profit d'une évaluation globale de la perméation et de l'accumulation totale de la molécule. Le tape stripping est la seule méthode considérée et recommandée par les directives sur les tests de diffusion cutanée pour évaluer la quantité de molécule active pénétrant

dans la peau. En revanche, elle est peu reproductible, avec de nombreux facteurs de variation tels que l'opérateur et la pression appliquée, ce qui génère d'importants écarts-types. De plus, les concentrations de la molécule active dans les bandes adhésives sont souvent très faibles, ce qui met à l'épreuve la sensibilité de plusieurs techniques analytiques, entraînant ainsi des limitations de détection et de reproductibilité, ce qui rend difficile la comparaison des données avec d'autres études. L'objectif principal de cette thèse était d'étudier de nouvelles approches permettant d'étudier la pénétration des molécules actives dans la peau et les interactions moléculaires en jeu. En effet, bien que cette technique soit présentée comme un outil utile pour étudier ces phénomènes, il manque dans la littérature une caractérisation des performances analytiques de cette technique qui permettrait son inclusion dans les recommandations internationales.

Au cours de ces travaux de recherche, qui se sont déroulés sur une période de trois ans, plusieurs axes majeurs ont été explorés :

(1) La mise en place au laboratoire d'une approche bio-analytique en conformité avec les critères réglementaires pour l'objectivation de produits cosmétiques.

(2) Le développement d'une approche analytique multi-techniques sur modèles de peau afin d'étudier les interactions moléculaires entre ces modèles de peau et les formulations utilisées.

(3) L'étude de l'impact du stockage des EpiSkin® (modèle de peau reconstruit) par congélation et par fixation à la formaline sur leur fonction barrière.

(4) L'évaluation de l'apport et des performances analytiques de la micro-spectroscopie Raman Confocale (CRM) pour l'objectivation de produits cosmétique.

VI.2 Résultats et perspectives de l'axe 1 :

Dans le cadre du premier axe de recherche, l'objectif était de mettre en place, au sein du laboratoire, une approche bioanalytique visant à évaluer la perméation et la pénétration de produits cosmétiques, en respectant les recommandations des autorités réglementaires telles que l'OCDE, l'EMA et la FDA. À présent, cette approche est maîtrisée au sein de l'EA6295. Elle nous a notamment permis de démontrer l'efficacité d'un procédé de fabrication d'émulsion sans tensioactifs stabilisée par ultrasons, appelé Hydrofeeling®, développé par notre partenaire industriel, Genialis. Les émulsions sans tensioactifs étaient chargées en caféine et en α-tocophérol, deux molécules présentant une polarité opposée, ce qui a démontré la polyvalence de ce procédé. Cependant, il convient de noter que des quantités plus faibles d'α-tocophérol ont été observées dans les couches supérieures de la peau, plus précisément dans le SC, lors de

l'exposition aux émulsions sans tensioactifs, par rapport aux peaux exposées à l'émulsion de référence. Ces résultats contribuent à la compréhension de l'effet promoteur de pénétration induit par les tensioactifs, qui ont tendance à accentuer l'effet réservoir dans la couche cornée. En effet, les tensioactifs peuvent modifier la structure des lipides de la couche cornée de deux manières différentes : en s'insérant dans la bicouche lipidique et en extrayant les lipides. L'incorporation des tensioactifs dans la couche cornée entraîne des modifications de la structure lipidique, la rendant plus fluide, augmentant ainsi sa perméabilité. De plus, les tensioactifs ont la capacité de solubiliser et d'extraire les lipides de la couche cornée, ce qui altère l'intégrité de la barrière cutanée, entraînant ainsi, lors d'une utilisation répétée, une sécheresse cutanée et un dysfonctionnement de la barrière au fil du temps.

En perspective des travaux de l'axe 1, il serait pertinent de commencer par réaliser des tests sur un éventail plus large de molécules présentant différentes polarités, y compris des polarités intermédiaires par rapport à la caféine et à l'α-tocophérol. Parmi les molécules à examiner, la vitamine A (rétinol) et la vitamine C sont particulièrement intéressantes en raison de leur grande importance dans le domaine cosmétique. Cependant, ces molécules sont connues pour être facilement dégradables. De plus, dans le cas du rétinol qui est une molécule lipophile, son utilisation pour les tests de perméation nécessite des optimisations, notamment en ce qui concerne sa solubilité dans les liquides récepteurs.

Dans un deuxième temps, il serait pertinent d'étudier les interactions moléculaires entre les formulations et la peau au moyen de la CRM. Pour cela, des coupes transversales de peau, préalablement exposées aux émulsions, devraient être préparées et soumises à une analyse par CRM. L'objectif serait d'évaluer, à une échelle moléculaire, l'impact des émulsions sur la barrière lipidique du stratum corneum (SC). Grâce à la polyvalence de la CRM, il serait possible, entre autres, de déterminer la répartition des molécules d'intérêt dans les différentes couches de la peau (SC, épiderme vivant et derme). De plus, la CRM permettrait d'identifier les conformations lipidiques du SC exposé aux deux types d'émulsions. Les résultats obtenus permettraient de mettre en évidence d'éventuels changements de conformation des lipides de la barrière cutanée, induits par la présence de tensioactifs dans les émulsions de référence. Afin de tester les émulsions sans tensioactifs de manière rigoureuse, il serait judicieux d'étudier l'impact des diverses classes de tensioactifs, notamment les nouveaux tensioactifs d'origine naturelle souvent considérés sans preuve expérimentale comme moins agressifs pour la peau. En effet, grâce à la technologie Hydrofeeling®, nous avons accès à un témoin d'émulsion sans tensioactifs, et on pourrait donc déterminer leur mécanisme d'action s'ils induisent un changement quantitatif de la pénétration cutanée.

VI.3 Résultats et perspectives de l'axe 2 :

L'approche bioanalytique utilisée lors des travaux de l'axe 1 a été couplée à différentes techniques analytiques, telles que la microspectroscopie Raman utilisée comme outil de caractérisation, et l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse utilisée comme outil d'analyse des lipides. Le développement de cette approche s'inscrit dans le cadre des travaux de l'axe 2, qui vise à étudier la caractérisation moléculaire et la perméation d'un modèle de peau synthétique appelé Strat-M®. Pour la première fois, cette étude a utilisé la CRM sur des coupes transversales de ce modèle pour déterminer leur composition à l'échelle moléculaire. Ce modèle présente des avantages considérables en termes de stockage, de coût et de reproductibilité par rapport à d'autres modèles de peau, et pourrait être d'une grande utilité à l'étape de criblage des molécules actives ou des formules.

Les résultats de l'étude, qui ont impliqué 3 modèles de peau, 3 formulations différentes (solution, hydrogel et émulsion) et 3 techniques analytiques, ont permis de repositionner ce modèle pour les études de perméation par rapport à d'autres modèles tels que le modèle reconstruit EpiSkin® et le modèle de référence, c'est-à-dire les biopsies de peau humaine. Les résultats ont montré que la membrane Strat-M® présentait une fonction barrière cutanée plus similaire à celle de la peau humaine que l'EpiSkin® RHE. Cependant, elle ne parvient pas à reproduire intégralement l'interaction complexe entre la peau et la formulation. Malgré cette limite, la membrane Strat-M® constitue un modèle abordable et reproductible qui peut être utilisé pour le criblage de molécules actives avant formulation.

Les travaux menés dans l'axe 2 représentent une première étape pour la compréhension de la perméation d'une molécule active dans les différents modèles de peau car elle n'implique qu'une molécule modèle, la résorcine, une molécule hydrophile de petite masse moléculaire. En perspective, il serait intéressant de tester un large panel de molécules actives de diverses polarités afin de mieux caractériser la perméabilité à travers le modèle synthétique et de repositionner ainsi son utilisation par rapport à la peau humaine et au modèle d'épiderme reconstruit (EpiSkin®). Il serait également intéressant de tester la perméabilité sur plusieurs modèles de peau reconstruits, qu'ils soient commerciaux ou fabriqués en interne dans les laboratoires de recherche. Dans un second temps, il serait judicieux de déterminer la répartition de ces molécules par micro-spectroscopie confocale Raman dans les différentes couches du Strat-M® et de comparer les profils obtenus avec ceux des EpiSkin® et des peaux humaines afin de mieux comprendre les dynamiques moléculaires et les voies de diffusion dans les différentes couches.

VI.4 Résultats et perspectives de l'axe 3 :

Lors de la réalisation des expérimentations de l'axe 2, nous avons rencontré différentes difficultés, notamment liées à la durée d'utilisation limitée des modèles d'épiderme reconstruits (EpiSkin®) après leur livraison (48 heures). Cette contrainte a compliqué la planification des expériences, qui étaient nombreuses en raison de la conception expérimentale. En conséquence, nous avons dû reconsidérer la question du stockage des EpiSkin®. Ainsi, dans l'axe 3, nous avons étudié l'effet du stockage sur la fonction de barrière des EpiSkin®.

Tout d'abord, nous avons examiné le stockage par congélation des EpiSkin® pour le comparer aux méthodes couramment utilisées et approuvées par les autorités réglementaires pour la peau humaine. Les résultats ont montré que la congélation affaiblissait la fonction de barrière des EpiSkin®, entraînant une perméation de 3 à 6 fois supérieure à celle des EpiSkin® frais (non congelés), selon la température et la durée de congélation.

Ensuite, nous avons proposé comme alternative un procédé de fixation chimique. Ainsi, les EpiSkin® ont été fixés chimiquement avec de la formaline et ont été stockés à 4°C jusqu'au jour des expériences de perméation. Les résultats de cette étude ont montré que la formaline affecte les composants biochimiques des EpiSkin® (protéines et lipides) dans une moindre mesure. De plus, le processus de fixation des EpiSkin® donne des résultats presque similaires à ceux des EpiSkin® frais, avec seulement une différence de 10 à 20 % en termes de masse cumulée après 12 heures de perméation, par rapport aux EpiSkin® frais, et ce après 21 jours de stockage après livraison.

Les résultats de l'axe 3 sont très encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives quant à l'utilisation d'un processus de stockage par fixation à la formaline, qui n'a jamais été testé auparavant sur la peau. Dans ce contexte, nous avons également testé le stockage à long terme, c'est-à-dire 3 mois et 12 mois, conformément aux périodes de congélation autorisées par les autorités réglementaires pour la peau humaine.

Les résultats préliminaires de perméation révèlent qu'après 12 heures d'exposition, les quantités cumulées de caféine étaient 1,3 fois supérieures pour les EpiSkin® fixés pendant 12 mois et 1,1 fois supérieures pour les EpiSkin® fixés pendant 3 mois, par rapport aux EpiSkin® frais. Ces résultats préliminaires sont prometteurs, mais pour renforcer leur validité, il est essentiel d'obtenir des résultats histologiques détaillés grâce à des coupes et des colorations. Cela permettra une meilleure compréhension du mécanisme de stockage à long terme dans la peau.

Dans cette optique, l'utilisation de la micro-spectroscopie confocale Raman sur des coupes transversales pourrait fournir des informations à l'échelle moléculaire sur la caractérisation et

la détermination des interactions moléculaires entre les composants biochimiques de la peau (lipides et protéines) et l'agent fixateur (la formaline). Le modèle EpiSkin® se distingue par sa standardisation et sa validation, ce qui le rend particulièrement résistant à la fixation à la formaline. Afin de généraliser cette approche, il serait pertinent d'évaluer plusieurs modèles reconstruits, qu'ils soient de nature industrielle ou cultivés en interne. Parmi les options à considérer, on peut citer les modèles "Full skin" d'EpiSkin® ou le modèle EpiDerm® de MatTek.

VI.5 Résultats et perspectives de l'axe 4 :

Les travaux expérimentaux de l'axe 4 viennent compléter les axes précédents en démontrant l'apport essentiel de la CRM dans les études d'objectivation de la peau humaine. Notre objectif était de répondre concrètement aux questions soulevées lors des études antérieures sur l'utilisation de cette technique appliquée à la peau, en mettant l'accent sur ses critères de performance analytique, dans le but d'une utilisation non seulement qualitative ou semi-quantitative, mais quantitative.

La littérature a clairement établi que la CRM est une technique polyvalente pour le suivi des processus biologiques et chimiques, la caractérisation de la peau, ainsi que la distribution des ingrédients actifs à travers les différentes couches cutanées, que ce soit in vitro ou in vivo. Cependant, les limites et les performances analytiques de cette technique n'ont jamais été explorées spécifiquement dans le but de quantifier la pénétration des ingrédients actifs dans la peau. C'est pourquoi nous avons réalisé, pour la première fois, une évaluation des performances analytiques de la CRM pour la quantification des actifs dans le stratum corneum humain.

Cette étude a abouti à la création d'un modèle in vitro de stratum corneum humain isolé, permettant de contrôler la quantité d'actifs dans le SC et d'établir une courbe d'étalonnage pour une approche quantitative par CRM. Ce modèle expérimental a été validé par une technique de référence, à savoir la Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC). Par la suite, le modèle in vitro a été associé à des approches chimiométriques multivariées, permettant de calculer des critères de performance tels que les limites de détection, la sensibilité, la sélectivité, la linéarité et la robustesse d'un modèle prédictif pour déterminer la quantité d'actifs présents dans la peau à partir des spectres Raman.

En perspective des travaux de l'axe 4, nous avons l'intention de tester plusieurs molécules ayant des structures chimiques différentes, ce qui induit des réponses Raman différentes. Ces réponses Raman, associées à des analyses chimiométriques, permettront d'estimer les performances analytiques de la technique qui varient en fonction de la réponse Raman des molécules testées.

L'objectif est de créer une base de données regroupant des modèles mathématiques de relations quantitatives structure-activité (QSAR) pour plusieurs molécules, afin de prédire des critères de performance tels que les limites de détection, la sensibilité et la sélectivité de chaque molécule en fonction de sa structure. Ces études permettront d'évaluer des critères de performance numériques démontrant la polyvalence et la fiabilité de la CRM.

L'utilisation de la CRM avec une configuration in vivo, telle que le système gen2-SCA de chez RiverD, ouvre de nouvelles perspectives pour les tests d'efficacité in vivo sur des volontaires humains. Dans ce contexte, une étude d'envergure est en cours, en collaboration avec un partenaire industriel, Eurofins Spincontrol, pour mesurer l'effet des produits cosmétiques sur l'hydratation et le renforcement de la barrière cutanée des volontaires. Cette étude représente un défi majeur car elle vise à mettre en évidence des variations très subtiles entre les volontaires, ce qui pourrait mettre à l'épreuve la sensibilité de la CRM. Afin de convaincre notre partenaire industriel de l'absence de risque pour les volontaires, il a fallu développer un protocole in vitro permettant de démontrer le caractère non invasif de l'approche Raman. Cette étude a confirmé expérimentalement, pour la première fois, le caractère non invasif de la CRM lors d'une exposition séquentielle aux deux lasers pendant un total de 45 minutes. Ce protocole expérimental, développé in vitro, ouvre des perspectives pour l'utilisation de cet appareil à la fois in vivo et in vitro pour des profilages en Z de la pénétration de molécules actives dans des explants de peau humaine, sans passer par l'étape de coupe tout en préservant l'intégrité et l'hydratation de l'explant.

La CRM pourrait constituer une alternative au Tape stripping (TS), technique légèrement invasive qui implique l'arrachage de la couche cornée de la peau et qui est controversée en raison de ses résultats peu répétables et peu reproductibles en raison de la nécessité de peser les bandes adhésives utilisées, des variations d'un opérateur à l'autre et des différences individuelles entre les caractéristiques de la peau. De plus, elle est impossible à exécuter lorsque le temps d'incubation avec le produit dépasse 8 heures.

La micro-spectroscopie confocale Raman (CRM), décrite dans la littérature, peut servir d'outil de caractérisation des composés biochimiques de la peau, ce qui permet d'évaluer et de contrôler la qualité de différents modèles de peau (chapitres III et IV). Associée à d'autres techniques analytiques telles que la spectrométrie de masse, la CRM pourrait améliorer la compréhension globale de la diffusion cutanée des molécules actives. Les travaux de thèse montrent comment la CRM pourrait contribuer aux approches quantitatives en offrant des profils de distribution, à condition de développer des approches de validation avec une méthode de référence et d'établir

des modèles prédictifs de la quantité de molécule active présente dans les différentes couches de la peau (chapitre 5).

Ce travail de thèse, incluant l'utilisation de méthodes chimiométriques, a permis d'évaluer les performances de la CRM dans ce domaine et confirme sa complémentarité avec les techniques de référence, telles que l'HPLC. En plus de son aspect quantitatif, l'aspect non invasif de la CRM en fait une technique privilégiée pour les études de diffusion cutanée in vivo, permettant de suivre en temps réel et in situ la pénétration des actifs cosmétiques dans la peau de volontaires humains de manière totalement non invasive. Cette technique doit être prise en main par la communauté des analystes afin de déterminer d'autres critères de performance analytiques et des protocoles validés qui permettront de convaincre les autorités compétentes d'inclure cette approche dans les recommandations concernant l'étude de la perméation et de la pénétration cutanée des molécules actives.

REFERENCES:

1. Dancik Y, Bigliardi PL, Bigliardi-Qi M (2015) What happens in the skin? Integrating skin permeation kinetics into studies of developmental and reproductive toxicity following topical exposure. Reprod Toxicol 58:252–281

2. Choi MJ, Maibach HI (2005) Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. Am J Clin Dermatol 6:215–223

3. van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra JA (2014) The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids 1841:295–313

4. Van Smeden J, Bouwstra JA (2016) Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. Skin Barrier Funct 49:8–26

5. Vávrová K, Kováčik A, Opálka L (2017) Ceramides in the skin barrier. Eur Pharm J 64:28–35

6. Niehues H, Bouwstra JA, El Ghalbzouri A, Brandner JM, Zeeuwen PL, van den Bogaard EH (2018) 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. Exp Dermatol 27:501–511

7. Nakatsuji T, Chiang HI, Jiang SB, Nagarajan H, Zengler K, Gallo RL The microbiome extends to subepidermal compartments of normal skin. Nat Commun. 2013; 4: 1431. Revolut. Study Indentifying Microb. Communities Can Penetrate Reside Deep. Layers Skin

8. Böhling A, Bielfeldt S, Himmelmann A, Keskin M, Wilhelm K-P (2014) Comparison of the stratum corneum thickness measured in vivo with confocal Raman spectroscopy and confocal reflectance microscopy. Skin Res Technol 20:50–57

9. Egawa M, Hirao T, Takahashi M (2007) In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles obtained with Raman spectroscopy. Acta Derm Venereol 87:4–8

10. Sandby-Moller J, Poulsen T, Wulf HC (2003) Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits. Acta Derm Venereol 83:410–413

11. Haftek M (2015) Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. Cell Tissue Res 360:483–490

12. Boncheva M, de Sterke J, Caspers PJ, Puppels GJ (2009) Depth profiling of Stratum corneum hydration in vivo: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. Exp Dermatol 7

13. Menon GK, Cleary GW, Lane ME (2012) The structure and function of the stratum corneum. Int J Pharm 435:3–9

14. Elias PM, Gruber R, Crumrine D, Menon G, Williams ML, Wakefield JS, Holleran WM, Uchida Y (2014) Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids 1841:314–318

15. Halling-Overgaard A-S, Kezic S, Jakasa I, Engebretsen KA, Maibach H, Thyssen JP (2017) Skin absorption through atopic dermatitis skin: a systematic review. Br J Dermatol 177:84–106

16. Bouwstra JA, Groenink HWW, Kempenaar JA, Romeijn SG, Ponec M (2008) Water distribution and natural moisturizer factor content in human skin equivalents are regulated by environmental relative humidity. J Invest Dermatol 128:378–388

17. Fowler J (2012) Understanding the role of natural moisturizing factor in skin hydration. Pr Dermatol 9:36–40

18. Iwai I, KUNIzAWA N, Yagi E, Hirao T, Hatta I (2013) Stratum corneum drying drives vertical compression and lipid organization and improves barrier function in vitro. Acta Derm Venereol 93:138–143

19. Proksch E (2018) pH in nature, humans and skin. J Dermatol 45:1044–1052

20. Elias PM (2017) The how, why and clinical importance of stratum corneum acidification. Exp Dermatol 26:999–1003

21. Lane ME (2013) Skin penetration enhancers. Int J Pharm 447:12–21

22. Liu Y, Lunter DJ (2020) Systematic investigation of the effect of non-ionic emulsifiers on skin by confocal raman spectroscopy—A comprehensive lipid analysis. Pharmaceutics 12:223

23. Jepps OG, Dancik Y, Anissimov YG, Roberts MS (2013) Modeling the human skin barrier — Towards a better understanding of dermal absorption. Adv Drug Deliv Rev 65:152–168

24. Lai-Cheong JE, McGrath JA (2013) Structure and function of skin, hair and nails. Medicine (Baltimore) 41:317–320

25. Ritschel WA, Hussain AS (1988) The principles of permeation of substances across the skin. Methods Find Exp Clin Pharmacol 10:39–56

26. Jung S-E, Kang HY, Lee E-S, Kim YC (2015) Changes of epidermal thickness in vitiligo. Am J Dermatopathol 37:289–292

27. Koehler MJ, Vogel T, Elsner P, König K, Bückle R, Kaatz M (2010) In vivo measurement of the human epidermal thickness in different localizations by multiphoton laser tomography. Skin Res Technol 16:259–264

28. Andrews SN, Jeong E, Prausnitz MR Transdermal Delivery of Molecules is Limited by Full Epidermis, Not Just Stratum Corneum. 11

29. Cleek RL, Bunge AL (1993) A new method for estimating dermal absorption from chemical exposure. 1. General approach. Pharm Res 10:497–506

30. Wenkers BP, Lippold BC (1999) Skin penetration of nonsteroidal antiinflammatory drugs out of a lipophilic vehicle: influence of the viable epidermis. J Pharm Sci 88:1326–1331

31. Bäsler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM (2016) The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. J Controlled Release 242:105–118

32. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R (2014) Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. Arch Toxicol 88:2135–2190

33. Aprile S, Serafini M, Pirali T (2019) Soft drugs for dermatological applications: recent trends. Drug Discov Today 24:2234–2246

34. Ita KB (2016) Prodrugs for transdermal drug delivery–trends and challenges. J Drug Target 24:671–678

35. Sloan KB, Wasdo SC, Rautio J (2006) Expert Review. Pharm. Res. 23:

36. Dancik Y, Anissimov YG, Jepps OG, Roberts MS (2012) Convective transport of highly plasma protein bound drugs facilitates direct penetration into deep tissues after topical application. Br J Clin Pharmacol 73:564–578

37. Vogt A, Hadam S, Heiderhoff M, Audring H, Lademann J, Sterry W, Blume-Peytavi U (2007) Morphometry of human terminal and vellus hair follicles. Exp Dermatol 16:946–950

38. Luther N, Darvin ME, Sterry W, Lademann J, Patzelt A (2012) Ethnic differences in skin physiology, hair follicle morphology and follicular penetration. Skin Pharmacol Physiol 25:182–191

39. Schaefer H, Watts F, Brod J, Illel B (1990) Follicular penetration. Predict Percutaneous Penetration Methods Meas Model 163:732

40. Caussin J, Gooris GS, Janssens M, Bouwstra JA (2008) Lipid organization in human and porcine stratum corneum differs widely, while lipid mixtures with porcine ceramides model human stratum corneum lipid organization very closely. Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr 1778:1472–1482

41. Franz TJ (1975) Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. J Invest Dermatol 64:190–195

42. Löffler H, Dreher F, Maibach HI (2004) Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. Br J Dermatol 151:746–752

43. Monteiro-Riviere NA (2010) Toxicology of the Skin. CRC Press

44. Oshizaka T, Kikuchi K, Kadhum WR, Todo H, Hatanaka T, Wierzba K, Sugibayashi K (2014) Estimation of skin concentrations of topically applied lidocaine at each depth profile. Int J Pharm 475:292–297

45. Pirot F, Kalia YN, Stinchcomb AL, Keating G, Bunge A, Guy RH (1997) Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo. Proc Natl Acad Sci 94:1562–1567

46. Poblet E, Jimenez F, Escario-Travesedo E, Hardman JA, Hernández-Hernández I, Agudo-Mena JL, Cabrera-Galvan JJ, Nicu C, Paus R (2018) Eccrine sweat glands associate with the human hair follicle within a defined compartment of dermal white adipose tissue. Br J Dermatol 178:1163–1172

47. Wilke K, Martin A, Terstegen L, Biel SS (2009) Neurobiology of skin appendages: eccrine, apocrine, and apoeccrine sweat glands. Neuroimmunol Skin Basic Sci Clin Pract 167–175

48. OECD (2004) Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris

49. Yousef S, Liu X, Mostafa A, Mohammed Y, Grice JE, Anissimov YG, Sakran W, Roberts MS (2016) Estimating maximal in vitro skin permeation flux from studies using non-sink receptor phase conditions. Pharm Res 33:2180–2194

50. OCDE (2004) Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method.

51. European Commission. Directorate-General for Health and Consumers (2010) Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. European Commission, BE

52. Tfayli A, Bonnier F, Farhane Z, Libong D, Byrne HJ, Baillet-Guffroy A (2014) Comparison of structure and organization of cutaneous lipids in a reconstructed skin model and human skin: spectroscopic imaging and chromatographic profiling. Exp Dermatol 23:441–443

53. EMA C (2018) Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products.

54. FDA U (2018) Bioanalytical method validation guidance for industry, US Department of Health and Human Services. Food Drug Adm Cent Drug Eval Res CDER Cent Vet Med CVM Biopharm 1–44

55. Use C for MP for H (2006) European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man. Lond. UK Eur. Med. Agency

56. Organization WH (2006) Dermal absorption. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation and World Health Organization, and produced within the framework of the Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals

57. Liu Y, Krombholz R, Lunter DJ (2021) Critical parameters for accurate monitoring of caffeine penetration in porcine skin using confocal Raman spectroscopy. Int J Pharm 607:121055

58. Liu Y, Lunter DJ (2021) Profiling skin penetration using PEGylated emulsifiers as penetration enhancers via confocal Raman spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Eur J Pharm Biopharm 166:1–9

59. Franz TJ, Lehman PA, Franz SF, North-Root H, Demetrulias JL, Kelling CK, Moloney SJ, Gettings SD (1993) Percutaneous penetration of N-nitrosodiethanolamine through human skin (in vitro): comparison of finite and infinite dose applications from cosmetic vehicles. Fundam Appl Toxicol 21:213–221

60. Kwak S, Brief E, Langlais D, Kitson N, Lafleur M, Thewalt J (2012) Ethanol perturbs lipid organization in models of stratum corneum membranes: An investigation combining differential scanning calorimetry, infrared and 2H NMR spectroscopy. Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr 1818:1410–1419

61. Sil BC, Alvarez MP, Zhang Y, Kung C, Hossain M, Iliopoulos F, Luo L, Crowther JM, Moore DJ, Hadgraft J (2018) 3D-printed Franz type diffusion cells. Int J Cosmet Sci 40:604–609

62. Supe S, Takudage P (2021) Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. Skin Res Technol 27:299–308

63. Kocsis D, Kichou H, Döme K, Varga-Medveczky Z, Révész Z, Antal I, Erdő F (2022) Structural and Functional Analysis of Excised Skins and Human Reconstructed Epidermis with Confocal Raman Spectroscopy and in Microfluidic Diffusion Chambers. Pharmaceutics 14:1689

64. Yeung C, Chen S, King B, Lin H, King K, Akhtar F, Diaz G, Wang B, Zhu J, Sun W (2019) A 3D-printed microfluidic-enabled hollow microneedle architecture for transdermal drug delivery. Biomicrofluidics 13:064125

65. Wagner H, Kostka K-H, Lehr C-M, Schaefer UF (2000) Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. Pharm Res 17:1475–1481

66. Herbig ME, Houdek P, Gorissen S, Zorn-Kruppa M, Wladykowski E, Volksdorf T, Grzybowski S, Kolios G, Willers C, Mallwitz H (2015) A custom tailored model to investigate skin penetration in porcine skin and its comparison with human skin. Eur J Pharm Biopharm 95:99–109

67. Kalia YN, Pirot F, Potts RO, Guy RH (1998) Ion mobility across human stratum corneum in vivo. J Pharm Sci 87:1508–1511

68. Rawlings AV, Matts PJ (2005) Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. J Invest Dermatol 124:1099–1110

69. Pershing LK, Nelsona JL, Corlett JL, Shrivastava SP, Hare DB, Shah VP (2003) Assessment of dermatopharmacokinetic approach in the bioequivalence determination of topical tretinoin gel products. J Am Acad Dermatol 48:740–751

70. World Health Organization. Regional Office for the Eastern Mediterranean (2008) List of basic sources in English for a medical faculty library. 117

71. Bravo D, Rigley TH, Gibran N, Strong DM, Newman-Gage H (2000) Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. Burns 26:367–378

72. Barbero AM, Frasch HF (2016) Effect of frozen human epidermis storage duration and cryoprotectant on barrier function using two model compounds. Skin Pharmacol Physiol 29:31–40

73. Dennerlein K, Schneider D, Göen T, Schaller KH, Drexler H, Korinth G (2013) Studies on percutaneous penetration of chemicals–impact of storage conditions for excised human skin. Toxicol In Vitro 27:708–713

74. Nielsen JB, Plasencia I, Sørensen JA, Bagatolli LA (2011) Storage conditions of skin affect tissue structure and subsequent in vitro percutaneous penetration. Skin Pharmacol Physiol 24:93–102

75. Payne OJ, Graham SJ, Dalton CH, Spencer PM, Mansson R, Jenner J, Azeke J, Braue E (2013) The effects of sulfur mustard exposure and freezing on transdermal penetration of tritiated water through ex vivo pig skin. Toxicol In Vitro 27:79–83

76. Swarbrick J, Lee G, Brom J (1982) Drug permeation through human skin: I. Effects of storage conditions of skin. J Invest Dermatol 78:63–66

77. Ge L, Huang Z, Wei H (2011) Skin graft preservation. Skin Grafts-Indic. Appl. Curr. Res.

78. Verbeken G, Verween G, De Vos D, Pascual B, De Corte P, Richters C, De Coninck A, Roseeuw D, Ectors N, Rose T (2012) Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. Cell Tissue Bank 13:1–7

79. Jakasa I, Kezic S (2008) Evaluation of in-vivo animal and in-vitro models for prediction of dermal absorption in man. Hum Exp Toxicol 27:281–288

80. Barbero AM, Frasch HF (2009) Pig and guinea pig skin as surrogates for human in vitro penetration studies: a quantitative review. Toxicol In Vitro 23:1–13

81. Godin B, Touitou E (2007) Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. Adv Drug Deliv Rev 59:1152–1161

82. Chantasart D, Li SK, He N, Warner KS, Prakongpan S, Higuchi WI (2004) Mechanistic studies of branched-chain alkanols as skin permeation enhancers. J Pharm Sci 93:762–779

83. Ross JH, Reifenrath WG, Driver JH (2011) Estimation of the percutaneous absorption of permethrin in humans using the parallelogram method. J Toxicol Environ Health A 74:351–363

84. Gordon S, Daneshian M, Bouwstra J, Caloni F, Constant S, Davies DE, Dandekar G, Guzman CA, Fabian E, Haltner E (2015) Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology. Altex 32:327–378

85. Planz V, Lehr C-M, Windbergs M (2016) In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. J Controlled Release 242:89–104

86. Huet F, Severino-Freire M, Chéret J, Gouin O, Praneuf J, Pierre O, Misery L, Le Gall-Ianotto C (2018) Reconstructed human epidermis for in vitro studies on atopic dermatitis: A review. J Dermatol Sci 89:213–218

87. Bernerd F, Marionnet C, Duval C (2012) Solar ultraviolet radiation induces biological alterations in human skin in vitro: relevance of a well-balanced UVA/UVB protection. Indian J Dermatol Venereol Leprol 78:15

88. OECD (2018) OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 234: Fish Sexual Development Test (FSDT). Organization for Economic Cooperation and Development Paris, France

89. Küchler S, Strüver K, Friess W (2013) Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. Expert Opin Drug Metab Toxicol 9:1255–1263

90. Netzlaff F, Kaca M, Bock U, Haltner-Ukomadu E, Meiers P, Lehr C-M, Schaefer UF (2007) Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin® in comparison to various human skin preparations☆. Eur J Pharm Biopharm 66:127–134

91. Schäfer-Korting M, Bock U, Diembeck W, et al (2008) The Use of Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the Validation Study. Altern Lab Anim 36:161–187

92. Schäfer-Korting M, Mahmoud A, Borgia SL, Brüggener B, Kleuser B, Schreiber S, Mehnert W (2008) Reconstructed epidermis and full-thickness skin for absorption testing: influence of the vehicles used on steroid permeation. Altern Lab Anim 36:441–452

93. Silva NH, Rodrigues AF, Almeida IF, Costa PC, Rosado C, Neto CP, Silvestre AJ, Freire CS (2014) Bacterial cellulose membranes as transdermal delivery systems for diclofenac: in vitro dissolution and permeation studies. Carbohydr Polym 106:264–269

94. Uchida T, Yakumaru M, Nishioka K, Higashi Y, Sano T, Todo H, Sugibayashi K (2016) Evaluation of a Silicone Membrane as an Alternative to Human Skin for Determining Skin Permeation Parameters of Chemical Compounds. Chem Pharm Bull (Tokyo) 64:1338–1346

95. Jung YJ, Yoon J-H, Kang NG, Park SG, Jeong SH (2012) Diffusion properties of different compounds across various synthetic membranes using Franz-type diffusion cells. J Pharm Investig 42:271–277

96. Haq A, Goodyear B, Ameen D, Joshi V, Michniak-Kohn B (2018) Strat-M® synthetic membrane: Permeability comparison to human cadaver skin. Int J Pharm 547:432–437

97. Uchida T, Kadhum WR, Kanai S, Todo H, Oshizaka T, Sugibayashi K (2015) Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. Eur J Pharm Sci 67:113–118

98. Haq A, Dorrani M, Goodyear B, Joshi V, Michniak-Kohn B (2018) Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. Int J Pharm 539:58–64

99. Simon A, Amaro MI, Healy AM, Cabral LM, de Sousa VP (2016) Comparative evaluation of rivastigmine permeation from a transdermal system in the Franz cell using synthetic membranes and pig ear skin with in vivo-in vitro correlation. Int J Pharm 512:234–241

100. Byrne HJ, Bielfeldt S, Bonnier F, et al (2022) Monitoring Dermal Penetration and Permeation Kinetics of Topical Products; the Role of Raman Microspectroscopy. SSRN Electron J. https://doi.org/10.2139/ssrn.4030268

101. Luo L (2015) Topical and transdermal delivery of caffeine. Int J Pharm 10

102. Anissimov YG, Jepps OG, Dancik Y, Roberts MS (2013) Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. Adv Drug Deliv Rev 65:169–190

103. Roberts MS (2013) Solute-vehicle-skin interactions in percutaneous absorption: The principles and the people. Skin Pharmacol Physiol 26:356–370

104. LaCourse WR, LaCourse ME (2023) General instrumentation in HPLC. In: Liq. Chromatogr. Elsevier, pp 61–73

105. Lough WJ, Wainer IW (1995) High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice. cRc press

106. Yandamuri N, Srinivas Nagabattula KR, Kurra SS, Batthula S, Nainesha Allada LPS, Bandam P (2013) Comparative study of new trends in HPLC: a review. Int J Pharm Sci Rev Res 23:52–57

107. Corradini D, Eksteen E, Eksteen R, Schoenmakers P, Miller N (1998) Handbook of HPLC. CRC Press

108. Sommer L (2012) Analytical absorption spectrophotometry in the visible and ultraviolet: the principles. Elsevier

109. Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Springer

110. Larkin P (2011) Chapter 1-introduction: infrared and Raman spectroscopy. Infrared Raman Spectrosc 1:1–5

111. Larkin P (2011) General outline and strategies for IR and Raman spectral interpretation. Infrared Raman Spectrosc 117–133

112. Franzen L, Windbergs M (2015) Applications of Raman spectroscopy in skin research—from skin physiology and diagnosis up to risk assessment and dermal drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 89:91–104

113. Baker MJ, Byrne HJ, Chalmers J, Gardner P, Goodacre R, Henderson A, Kazarian SG, Martin FL, Moger J, Stone N (2018) Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: state of play and future challenges. Analyst 143:1735–1757

114. Byrne HJ, Baranska M, Puppels GJ, Stone N, Wood B, Gough KM, Lasch P, Heraud P, Sulé-Suso J, Sockalingum GD (2015) Spectropathology for the next generation: Quo vadis? Analyst 140:2066–2073

115. Raman CV, Nilakantan P (1928) Nature.

116. Bumbrah GS, Sharma RM (2016) Raman spectroscopy–Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. Egypt J Forensic Sci 6:209–215

117. Bocklitz TW, Guo S, Ryabchykov O, Vogler N, Popp J (2016) Raman based molecular imaging and analytics: a magic bullet for biomedical applications!? Anal Chem 88:133–151

118. Das RS, Agrawal YK (2011) Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. Vib Spectrosc 57:163–176

119. Butler HJ, Ashton L, Bird B, Cinque G, Curtis K, Dorney J, Esmonde-White K, Fullwood NJ, Gardner B, Martin-Hirsch PL (2016) Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. Nat Protoc 11:664–687

120. Caspers PJ, Nico C, Bakker Schut TC, Sterke J, Pudney PDA, Curto PR, Illand A, Puppels GJ (2019) Method to quantify the in vivo skin penetration of topically applied materials based on confocal RAMAN spectroscopy. Transl Biophotonics. https://doi.org/10.1002/tbio.201900004

121. Everall NJ (2000) Confocal Raman microscopy: why the depth resolution and spatial accuracy can be much worse than you think. Appl Spectrosc 54:1515–1520

122. Iliopoulos F, Caspers PJ, Puppels GJ, Lane ME (2020) Franz Cell Diffusion Testing and Quantitative Confocal Raman Spectroscopy: In Vitro-In Vivo Correlation. Pharmaceutics 12:887

123. Everall NJ (2000) Modeling and measuring the effect of refraction on the depth resolution of confocal Raman microscopy. Appl Spectrosc 54:773–782

124. Tfayli A, Piot O, Draux F, Pitre F, Manfait M (2007) Molecular characterization of reconstructed skin model by Raman microspectroscopy: Comparison with excised human skin. Biopolymers 87:261–274

125. Tfaili S, Gobinet C, Josse G, Angiboust J-F, Manfait M, Piot O (2012) Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. The Analyst 137:3673–3682

126. Caspers PJ, Lucassen GW, Wolthuis R, Bruining HA, Puppels GJ (1998) In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin. Biospectroscopy 4:S31–S39

127. Bruneel JL Lassegues. JC, & Sourisseau, C.(2002). J Raman Spectrosc 33:815

128. Crowther JM, Matts PJ, Kaczvinsky JR (2012) Changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration by moisturizers. Treat Dry Skin Syndr Art Sci Moisturizers 545–560

129. Crowther JM, Sieg A, Blenkiron P, Marcott C, Matts PJ, Kaczvinsky JR, Rawlings AV (2008) Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo. Br J Dermatol 159:567–577

130. de Azevedo JR, Bolzinger M-A, Briançon S, Chevalier Y, Dancik Y (2021) Confocal Raman Microspectroscopy in the Assessment of Skin Barrier Function and Drug Penetration. In: Percutaneous Absorpt. CRC Press, pp 799–836

131. dos Santos L, Tippavajhala VK, Mendes TO, da Silva MGP, Fávero PP, Téllez Soto CA, Martin AA (2019) Evaluation of penetration process into young and elderly skin using confocal Raman spectroscopy. Vib Spectrosc 100:123–130

132. Essendoubi M, Gobinet C, Reynaud R, Angiboust JF, Manfait M, Piot O (2016) Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy. Skin Res Technol 22:55–62

133. Lunter D, Daniels R (2014) Confocal Raman microscopic investigation of the effectiveness of penetration enhancers for procaine delivery to the skin. J Biomed Opt 19:126015

134. Mateus R, Abdalghafor H, Oliveira G, Hadgraft J, Lane ME (2013) A new paradigm in dermatopharmacokinetics – Confocal Raman spectroscopy. Int J Pharm 444:106–108

135. Tfaili S, Josse G, Angiboust J-F, Manfait M, Piot O (2014) Monitoring caffeine and resveratrol cutaneous permeation by confocal Raman microspectroscopy: Raman follow-up of skin permeation. J Biophotonics 7:676–681

136. Pereira AFM, Rodrigues BVM, Neto LPM, et al (2021) Confocal Raman spectroscopy as a tool to assess advanced glycation end products on solar-exposed human skin. Vib Spectrosc 114:103234

137. Tfayli A, Piot O, Pitre F, Manfait M (2007) Follow-up of drug permeation through excised human skin with confocal Raman microspectroscopy. Eur Biophys J 36:1049–1058

138. Alonso C, Carrer V, Barba C, Coderch L (2018) Caffeine delivery in porcine skin: a confocal Raman study. Arch Dermatol Res 310:657–664

139. Franzen L, Anderski J, Windbergs M (2015) Quantitative detection of caffeine in human skin by confocal Raman spectroscopy – A systematic in vitro validation study. Eur J Pharm Biopharm 95:110–116

140. Tfaili S, Gobinet C, Josse G, Angiboust J-F, Baillet A, Manfait M, Piot O (2013) Vibrational spectroscopies for the analysis of cutaneous permeation: experimental limiting factors identified in the case of caffeine penetration. Anal Bioanal Chem 405:1325–1332

141. Ali SM, Bonnier F, Lambkin H, Flynn K, McDonagh V, Healy C, Lee TC, Lyng FM, Byrne HJ (2013) A comparison of Raman, FTIR and ATR-FTIR micro spectroscopy for imaging human skin tissue sections. Anal Methods 5:2281–2291

142. Stella A, Bonnier F, Tfayli A, Yvergnaux F, Byrne HJ, Chourpa I, Munnier E, Tauber C (2020) Raman mapping coupled to self-modelling MCR-ALS analysis to estimate active cosmetic ingredient penetration profile in skin. J Biophotonics 13:e202000136

143. Förster M, Bolzinger M-A, Montagnac G, Briançon S (2011) Confocal Raman microspectroscopy of the skin. Eur J Dermatol 21:851–863

144. Chrit L, Bastien P, Biatry B, Simonnet J-T, Potter A, Minondo AM, Flament F, Bazin R, Sockalingum GD, Leroy F (2007) In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: assessment of a new moisturizing agent, pMPC. Biopolym Orig Res Biomol 85:359–369

145. Chrit L, Bastien P, Sockalingum GD, Batisse D, Leroy F, Manfait M, Hadjur C (2006) An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerol-based hydration cream. Skin Pharmacol Physiol 19:207–215

146. Tippavajhala VK, Magrini TD, Matsuo DC, Silva MG, Favero PP, De Paula LR, Martin AA (2018) In vivo determination of moisturizers efficacy on human skin hydration by confocal raman spectroscopy. AAPS PharmSciTech 19:3177–3186

147. Xiao C, Moore DJ, Rerek ME, Flach CR, Mendelsohn R (2005) Feasibility of tracking phospholipid permeation into skin using infrared and Raman microscopic imaging. J Invest Dermatol 124:622–632

148. Pudney PD, Mélot M, Caspers PJ, Van Der Pol A, Puppels GJ (2007) An in vivo confocal Raman study of the delivery of trans-retinol to the skin. Appl Spectrosc 61:804–811

149. Mélot M, Pudney PD, Williamson A-M, Caspers PJ, Van Der Pol A, Puppels GJ (2009) Studying the effectiveness of penetration enhancers to deliver retinol through the stratum cornum by in vivo confocal Raman spectroscopy. J Controlled Release 138:32–39

150. Liland KH, Almøy T, Mevik B-H (2010) Optimal choice of baseline correction for multivariate calibration of spectra. Appl Spectrosc 64:1007–1016

151. German MJ, Hammiche A, Ragavan N, Tobin MJ, Cooper LJ, Matanhelia SS, Hindley AC, Nicholson CM, Fullwood NJ, Pollock HM (2006) Infrared spectroscopy with multivariate analysis potentially facilitates the segregation of different types of prostate cell. Biophys J 90:3783–3795

152. Bro R, Smilde AK (2014) Principal component analysis. Anal Methods 6:2812–2831

153. Jamieson LE, Byrne HJ (2017) Vibrational spectroscopy as a tool for studying drug-cell interaction: Could high throughput vibrational spectroscopic screening improve drug development? Vib Spectrosc 91:16–30

154. Calvo NL, Kaufman TS, Maggio RM (2015) A PCA-based chemometrics-assisted ATR-FTIR approach for the classification of polymorphs of cimetidine: Application to physical mixtures and tablets. J Pharm Biomed Anal 107:419–425

155. Rajalahti T, Kvalheim OM (2011) Multivariate data analysis in pharmaceutics: a tutorial review. Int J Pharm 417:280–290

156. Wold S, Sjöström M, Eriksson L (2001) PLS-regression: a basic tool of chemometrics. Chemom Intell Lab Syst 58:109–130

157. Keating ME, Nawaz H, Bonnier F, Byrne HJ (2015) Multivariate statistical methodologies applied in biomedical Raman spectroscopy: assessing the validity of partial least squares regression using simulated model datasets. Analyst 140:2482–2492

158. Arlot S, Celisse A (2010) A survey of cross-validation procedures for model selection.

159. Guo S, Bocklitz T, Neugebauer U, Popp J (2017) Common mistakes in cross-validating classification models. Anal Methods 9:4410–4417

160. Hibbert DB (2016) Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations 2016). Pure Appl Chem 88:407–443

161. Leger MN, Ryder AG (2006) Comparison of derivative preprocessing and automated polynomial baseline correction method for classification and quantification of narcotics in solid mixtures. Appl Spectrosc 60:182–193

Hichem KICHOU

Approches chromatographiques et spectroscopiques appliquées à l'étude de la pénétration d'actifs dans la peau

Résumé en français :

La peau joue un rôle fondamental en tant que barrière protectrice contre les agressions extérieures. Cependant, pour évaluer l'efficacité des produits dermatologiques et cosmétiques, il est essentiel de comprendre la capacité des ingrédients actifs (IA) à pénétrer et/ou traverser la peau. Les tests de diffusion cutanée sont des méthodes indispensables pour étudier cette interaction entre la peau et les produits pharmaceutiques ou cosmétiques et mesurer la pénétration et la perméation des IA. À l'heure actuelle, menés selon les recommandations des autorités compétentes, ces tests ne fournissent que des informations partielles sur la biodisponibilité des IAs et leur distribution dans les différentes couches de la peau. Les objectifs principaux de cette thèse sont les suivants : (i) développer une approche analytique multi-techniques pour répondre aux besoins d'objectivation des produits cosmétiques, afin de déterminer les profils et les cinétiques de pénétration des IA, et d'étudier les interactions moléculaires au niveau de la peau, (ii) évaluer les avantages et les performances analytiques de la micro-spectroscopie confocale Raman (CRM) en tant que technique non invasive et polyvalente appliquée à la peau. Une approche bio-analytique a donc été mise en place pour l'objectivation des produits cosmétiques. Elle combine l'approche classique utilisant les cellules de diffusion associée à la chromatographie liquide haute performance, et différentes techniques analytiques, telles que la micro-spectroscopie confocale Raman utilisée comme outil de caractérisation, et l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse utilisée comme outil d'analyse des lipides. Les travaux de cette thèse ont permis d'étudier les dynamiques moléculaires et les interactions entre les formulations et la peau dans divers modèles de peau, tels que le modèle synthétique Strat-M®, le modèle reconstruit EpiSkin® et les explants de peau humaine. De plus, ils ont mis en évidence l'effet du stockage sur la fonction de barrière des EpiSkin®. Enfin, les performances analytiques de la microspectroscopie confocale Raman (CRM) appliquée à la peau ont été estimées pour la première fois, en utilisant un modèle in vitro de stratum corneum humain isolé, permettant de contrôler la quantité d'actif dans le SC et d'établir une courbe d'étalonnage par des approches chimiométriques multivariées, pour mettre en place une approche quantitative par CRM. En conclusion, les travaux de cette thèse ont démontré la complémentarité des différentes techniques analytiques pour l'objectivation des produits cosmétiques, ainsi que l'apport de la CRM associée à la chimiométrie appliquée à la peau humaine.

Mots clés : Tests de diffusion cutanée, Approche bioanalytique multi-techniques, Microspectoscopie Cofocale Raman , Chimiométrie, modèles de peaux, Produits topiques.

Summary :

The skin plays a fundamental role as a protective barrier against external aggressions. However, to assess the effectiveness of dermatological and cosmetic products, it is essential to understand the capacity of active ingredients (AI) to penetrate and/or cross the skin. Skin diffusion tests are indispensable methods for studying this interaction between the skin and pharmaceutical or cosmetic products, and for measuring the penetration and permeation of AI. Currently, conducted according to the recommendations of competent authorities, these tests only provide partial information on the bioavailability of AIs and their distribution in the different layers of the skin. The main objectives of this thesis are as follows: (i) to develop a multi-technique analytical approach to meet the needs of cosmetic product assessment, in order to determine the profiles and kinetics of AI penetration and study molecular interactions at the skin level, (ii) to evaluate the advantages and analytical performance of confocal Raman microspectroscopy (CRM) as a non-invasive and versatile technique applied to the skin. A bio-analytical approach has been implemented for the evaluation of cosmetic products. It combines the classical approach using diffusion cells associated with high-performance liquid chromatography, and various analytical techniques such as confocal Raman microspectroscopy used as a characterization tool, and HPLC coupled with mass spectrometry used as a lipid analysis tool. The work of this thesis has allowed the study of molecular dynamics and interactions between formulations and the skin in various skin models, such as the synthetic Strat-M® model, the reconstructed EpiSkin® model, and human skin explants. Moreover, it has highlighted the effect of storage on the barrier function of EpiSkin®. Finally, the analytical performance of confocal Raman microspectroscopy (CRM) applied to the skin has been estimated for the first time, using an in vitro model of isolated human stratum corneum, allowing the control of active ingredient quantity in the SC and the establishment of a calibration curve through multivariate chemometric approaches, to implement a quantitative approach using CRM. In conclusion, the work of this thesis has demonstrated the complementarity of different analytical techniques for the assessment of cosmetic products, as well as the contribution of CRM associated with chemometrics applied to human skin.

Keywords : Skin diffusion tests, multi-technique bioanalytical approach, Confocal Raman Microspectroscopy, Chemometrics, skin models, topical products.