

# La peau est-elle vraiment imperméable aux nanoparticules ?

Période : décembre 2014 - mars 2015

**Ludwig VINCHES et Stéphane HALLE** | [ludwig.vinches@gmail.com](mailto:ludwig.vinches@gmail.com)

École de technologie supérieure – Département de Génie mécanique – Montréal – Canada

Mots clés : **couches cutanées, exposition, nanodermatologie, nanoparticules, peau, pénétration, techniques de caractérisation**

L'industrie pharmaceutique et l'industrie des cosmétiques intègrent de plus en plus fréquemment dans leurs produits, des composés chimiques de taille nanométrique inférieure à 100nm, en raison de leurs propriétés particulières. En effet, on trouve couramment des nanoparticules manufacturées (NPM) de dioxyde de titane dans les crèmes solaires, de dioxyde de silice dans les dentifrices, d'argent dans les pansements antibactériens ou encore d'or dans certains traitements contre le cancer (1-3).

Souvent considérée comme une barrière infranchissable, la peau fait l'objet depuis quelques années d'études approfondies sur son comportement et surtout son efficacité à maintenir les NPM dans l'environnement extérieur. L'emploi répété de produits cosmétiques ou de crèmes antibactériennes augmente le contact direct de ces NPM avec les premières couches cutanées. Les études réalisées ont souvent révélé le passage de nanoparticules à travers la peau lorsque celle-ci est lésée et parfois même intacte (4-6).

Le premier article rapporte de récents travaux sur la pénétration de NPM à travers la peau humaine et leur interaction avec des cellules cutanées en culture. Le second reprend la même problématique en utilisant de nombreuses techniques pour mesurer la profondeur de pénétration de nanoparticules d'argent à travers la peau de porc. Enfin, le troisième article présente différentes méthodologies de préparation d'échantillons de peau et différentes techniques d'analyses permettant d'observer la pénétration de NPM d'or à travers la peau humaine. Il illustre également l'intérêt que peut présenter la microscopie par rayons X pour l'observation de nanoparticules inorganiques.

Ces trois publications soulignent la nécessité d'utiliser, en nanodermatologie, différents types de modèles (peau et cellules) et différentes techniques de mesure de la pénétration des nanoparticules à travers les couches cutanées.

## Interaction de nanoparticules dermatologiquement pertinentes avec des cellules de peau humaine

Vogt A., Rancan F., Ahlberg S., Nazemi B., Choe C.S., Darwin M.E., Hadam S., Blume-Peytavi U., Loza K., Diendorf J., Epple M., Graf C., Rühl E., Meinke M.C., Lademann J. Interaction of dermatologically relevant nanoparticles with skin cells and skin *Beilstein J. Nanotechnology* 2014;5:2363-2373.

### Résumé

Dans cette étude et dans leurs travaux précédents, les auteurs ont mesuré la profondeur de pénétration de diverses nanoparticules manufacturées (NPM<sup>1</sup>) à travers la peau humaine. Ils ont utilisés des NPM de dioxyde de titane, d'argent et de silice. Les charges de surface des NMP de silice peuvent être modifiées. Le choix des NPM est relatif à leur utilisation et donc à l'objectif qu'elles pénètrent les couches cutanées en profondeur (traitements dermiques) ou non (crèmes solaires). Les auteurs ont à leur disposition cinq techniques de détection (techniques de microscopie et cytométrie en flux). Des analyses par microscopie à fluorescence révèlent tout d'abord que l'internalisation cellulaire dépend de la taille des NPM mais aussi du type de NPM. En effet, elle est observable pour des NPM de silice de 42 nm mais pas pour des tailles supérieures à 75 nm. Dans une autre étude, ces auteurs ont observé l'internalisation cellulaire pour des NPM de polystyrène de taille comprise

entre 40 et 200 nm. Ils ont aussi montré que la fonctionnalisation des NPM de silice par des groupes amines (charge de surface positive), n'affecte pas significativement la profondeur de pénétration des cellules de la peau. En effet, la charge accroît la formation d'agglomérats. D'autres mesures effectuées avec les NPM d'argent montrent une profondeur de pénétration très limitée dans le stratum corneum sur une peau intacte ( $4,4 \pm 1,5$ )  $\mu\text{m}$ , pénétration qui augmente légèrement ( $5,1 \pm 2,5$ )  $\mu\text{m}$  lorsque l'intégrité de la couche cornée est diminuée de 70 à 80 %.

Alors que la majorité des NPM pénètre peu ou pas la couche cornée, une partie d'entre elles s'accumule au niveau de vésicules comme les endosomes, ce qui rend possible l'absorption intracellulaire.

### Commentaire

Cette étude vise à établir la profondeur de pénétration de différentes NPM à travers deux modèles-types, sur explants de peau humaine ou porcine et sur cultures de cellules de peau humaine (kératinocytes). Les auteurs basent leurs résultats sur le couplage de techniques d'analyse directes ou indirectes (cytométrie en flux).

Cependant, il est à noter qu'aucune caractérisation de l'état d'agrégation ou d'agglomération des NPM étudiées n'est présentée alors qu'elle devrait être impérativement réalisée. En effet, l'agrégation et l'agglomération sont des phénomènes qui peuvent se produire avant, pendant et après l'exposition aux NPM. Ces effets peuvent jouer un rôle

déterminant sur les interactions avec les cellules de la peau. De la même façon, il aurait été important de connaître la forme des NPM utilisées. Les  $n\text{TiO}_2$ ,  $n\text{SiO}_2$  et  $n\text{Ag}$  peuvent se présenter sous différentes formes allotropiques<sup>2</sup> ou encore sous forme de précipité. Ce facteur forme pourrait être tout aussi déterminant que les phénomènes d'agrégation et d'agglomération.

Afin de compléter cette étude, il serait souhaitable de n'utiliser qu'un type de NPM (composition chimique unique) et de faire varier des paramètres comme la forme ou le mode d'application. Il faudrait aussi mettre en place un protocole expérimental permettant de quantifier les NPM selon la profondeur de pénétration.

### Étude de la pénétration de nanoparticules d'argent *ex vivo* dans la peau de porc par microscopie à fluorescence, microscopie Raman et microscopie Raman par diffusion de surface améliorée

Zhu Y., Choe C., Ahlberg S., Meinke M.C., Alexiev U., Lademann J., Darvin M.E. Penetration of silver nanoparticles into porcine skin *ex vivo* using fluorescence lifetime imaging microscopy, Raman microscopy, and surface-enhanced Raman scattering microscopy *Journal of Biomedical Optics* 2014;20(5):051006-1-051006-8.

#### Résumé

Dans ce second article, les auteurs ont mesuré la profondeur de pénétration de NPM d'argent à travers de la peau d'oreille de porc. Les nanoparticules sont fonctionnalisées avec du poly-N-vinylpyrrolidone (PVP<sup>3</sup>) et sont en suspension dans l'eau. Après un dépôt de NPM d'argent, les échantillons de peau sont maintenus dans un incubateur pendant vingt-quatre heures à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> et 100% d'humidité relative. Comme dans le premier article, plusieurs techniques de caractérisation ont été utilisées et comparées, comme la tomographie à deux photons avec une technique d'imagerie par fluorescence (TPT-FLIM<sup>4</sup>), la microscopie confocale Raman (CRM<sup>5</sup>) ou encore la microscopie Raman par diffusion de surface améliorée (SERS<sup>6</sup>).

Les résultats obtenus avec la TPT-FLIM montrent les NPM d'argent atteignent une profondeur comprise entre 12 et 14 µm. Il est à noter que le profil de concentration diminue drastiquement (environ 80%) entre 0 et 4 µm. Les résultats issus de la CRM<sup>7</sup> concluent à une disparition totale des NPM d'argent à une profondeur de (11,1 ± 2,1) µm. Enfin, les données SERS montrent une profondeur de pénétration (15,6 ± 8,3) µm pouvant dépasser l'épaisseur du stratum corneum. Il est donc possible que de faibles quantités de NPM d'argent, à l'état de traces, traversent le stratum corneum et entrent en contact avec des cellules viables par l'intermédiaire, entre autre, des follicules pileux.

#### Commentaire

À l'instar du premier article, cette étude rapporte les résultats obtenus par différentes techniques sur l'évaluation de la profondeur de pénétration de nanoparticules d'argent à travers la peau de porc. La multiplicité des techniques de caractérisation des NPM, amenant à une convergence des résultats, est un excellent point de départ pour établir une méthodologie de mesure normalisée de la pénétration des nanoparticules à travers la peau. En effet, bien que des travaux de plus en plus nombreux soient réalisés sur ce sujet, la plupart diffèrent sur la méthode de préparation des échantillons, les paramètres d'exposition et surtout les techniques de mesure et de caractérisation.

Comme mentionné pour l'article précédent, aucune caractérisation de l'état d'agrégation ou d'agglomération des NPM étudiées n'a été réalisée. De plus, à aucun moment la forme des nAg n'est discutée. Ces deux paramètres (état d'agrégation et forme) pourraient être déterminants pour une meilleure compréhension du passage des NPM à travers les différentes couches cutanées.

### Pénétration de nanoparticules d'or, sphériques et en bâtonnets, à travers de la peau humaine intacte ou endommagée.

Grafá C., Nordmeyerb D., Ahlbergb S., Raabec J., Vogtb A., Lademannb J., Rancanb F., Rühla E. Penetration of spherical and rod-like gold nanoparticles into intact and barrier-disrupted human skin *Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications* 2015; doi: 10.1117/12.2079719.

#### Résumé

Cette étude a pour but d'évaluer la pénétration de nanoparticules d'or, sphériques (80 nm) ou sous forme de bâtonnets (247 x 22 nm), à travers la peau humaine saine ou endommagée par des lésions mécaniques faites de piqûres. Les échantillons de peau utilisés ont été prélevés, après consentement, sur l'abdomen de patients de chirurgie esthétique. Les auteurs ont choisi de comparer différents protocoles de préparation des échantillons de peau tels que les techniques de cryoconservation, comme la congélation par immersion et la lyophilisation. Les résultats de cette recherche ont été obtenus grâce à une combinaison de différentes imagerie, comme la microscopie électronique à balayage (MEB<sup>7</sup>) couplée à une analyse par spectroscopie à rayons X et à dispersion d'énergie (EDX<sup>8</sup>) et la microscopie à rayons X (STXM<sup>9</sup>). La discussion de ces résultats, combinée à l'analyse des différents protocoles de préparation des échantillons, a révélé que les paramètres physiques (taille et géométrie) des particules n'influencent aucunement leur absorption par la peau. Cependant, ils ont démontré qu'une peau saine ne présente aucune trace de nanoparticules alors qu'au contraire, une peau endommagée par piqûres montre l'absorption de nanoparticules et la présence de celles-ci dans le derme profond, à des distances comprises entre 50 et 100µm de la zone de contact.

### Commentaire

L'objectif principal de cette étude était d'étudier la pénétration des nanoparticules d'or sphériques et sous forme de bâtonnets à travers la peau humaine. Les auteurs ont fait le choix d'étudier différents protocoles de préparation des échantillons et de techniques d'analyses. En attestent les résultats obtenus qui évoquent les problèmes rencontrés, induits par le protocole expérimental ou par la technique de mesure en elle-même.

Cette étude a cependant permis de mettre en évidence qu'une peau saine ne semble pas être sujette à l'absorption de nanoparticules d'or au-delà du stratum corneum contrairement à une peau endommagée par piqûres. Les auteurs précisent d'autre part, qu'une perte de nanoparticules peut survenir lors du processus de lyophilisation faussant ainsi les résultats obtenus. Il aurait été appréciable que les auteurs donnent un avis concernant la non-absorption de la peau saine, et les possibles facteurs influençant le phénomène : nature chimique des particules ou encore leur état d'agglomération.

Cette étude a démontré que l'analyse faite par STXM, essentiellement basée sur la sélectivité chimique, semble être prometteuse pour la détection des nanoparticules inorganiques, des médicaments et tout autre vecteur nanométrique qui pourrait être employé en médecine.

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces articles mettent l'emphase sur la complexité de l'évaluation de l'efficacité de la peau vis-à-vis de la pénétration des NPM. Ces travaux s'appuient sur une utilisation de multiples technologies de pointe nécessaires pour caractériser les nanoparticules abondamment intégrées dans les produits cosmétiques (7) et certains produits pharmaceutiques (8). Cependant plusieurs questions restent encore sans réponse. Quels sont les effets de l'agglomération, de la fonctionnalisation de surface (stérique ou électronique) ou encore du facteur de forme des NPM sur leur pénétration à travers la peau ?

Au vu de ces trois publications, il apparaît urgent de compléter nos connaissances sur les paramètres intrinsèques aux NPM jouant un rôle important dans la compréhension de leur passage à travers les différentes couches cutanées.

Parfaire nos connaissances permettra une amélioration possible dans le choix des NPM entrant dans la composition de produits utilisés pour la protection cutanée.

### GENERAL CONCLUSION

*These articles highlight the complexity of the skin effectiveness evaluation against ENP10 penetration. They are based on the use of multiple advanced technologies needed to characterize widely integrated nanoparticles in cosmetics (7) and some pharmaceuticals (8). However, several questions remain unanswered. What are the effects of agglomeration, surface functionalization (steric or electronic) or the nanoparticles shape on their penetration through the skin?*

*Considering these three publications, it appears urgent to improve our knowledge of the different parameters characterizing the ENP which can play an important role in understanding the passage of nanoparticles through the different skin layers.*

*Gaining knowledge may improve the selection of ENPs included in the formulation of products used for dermal protection.*

### Lexique

- (1) NPM : Nanoparticules manufacturées
- (2) Allotropique : Qualificatif indiquant la possibilité de certains corps d'exister sous forme cristalline ou moléculaire différentes
- (3) PVP (Poly-N-vinylpyrrolidone) : Polymère azoté utilisé comme stabilisant dans les suspensions de nanoparticules
- (4) TPT-FLIM: Two-Photons Tomography Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
- (5) CRM: Confocal Raman Microscopy
- (6) SERS: Surface-Enhanced Raman Scattering Microscopy
- (7) MEB : Microscopie électronique à balayage
- (8) EDX: Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie
- (9) STXM : Microscopie à rayons X
- (10) ENP : Engineered nanoparticles

### Publications de référence

- (1) **Sadrieh N, Wokovich AM, Gopee NV et al.** Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO<sub>2</sub> Particles. *Toxicological Sciences* 2010;**115**:156-166.
- (2) **Benn T, Cavanagh B, Hristovski K et al.** The release of nanosilver from consumer products used in the home. *J Environ Qual* 2010;**39**:1875 - 1882.
- (3) **Ghosh P, Han G, De M, Kim CK, Rotello VM** Gold nanoparticles in delivery applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008;**60**:1307-1315.

- (4) **Labouta HI, El-Khordagui LK, Kraus T et al.** Mechanism and determinants of nanoparticle penetration through human skin. *Nanoscale* 2011;**3**:4989-4999.
- (5) **Wu J, Liu W, Xue C et al.** Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters* 2009;**191**:1-8.
- (6) **Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP et al.** Effects of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin. *Nano Letters* 2007;**7**:155-160.
- (7) **Sulistiyani S** Review of applications nanoparticles of TiO<sub>2</sub> and ZnO in sunscreen. *Proceeding of International Conference On Research, Implementation And Education Of Mathematics And Sciences* 2014.
- (8) **Mornet S, Vasseur S, Grasset F et al.** Magnetic nanoparticle design for medical applications. *Progress in solid state chemistry* 2006; **34**(2-4):237-247.

### Revue de la littérature

- (1) **Choi J, Kim H, Oh SM et al.** Skin Corrosion and Irritation Test of Sunscreen Nanoparticles using Reconstructed 3D Human Skin Model. *Environmental Health and Toxicology* 2014; doi: 10.5620/eht.2014.29.e2014004.
- (2) **Yuna JW, Yoona YK, Kang B et al.** The toxicity and distribution of iron oxide–zinc oxide core-shell nanoparticles in C57BL/6 mice after repeated subcutaneous administration. *Journal of Applied Toxicology* 2014; DOI 10.1002/jat.3102
- (3) **Wang L, Wang J** Skin Penetration of Inorganic and Metallic Nanoparticles. *Journal of Shanghai Jiaotong University* 2014;**19** (6):691-697

### Autres publications identifiées

- (1) **Gulson B, McCall M, Korsch M et al.** Small Amounts of Zinc from Zinc Oxide Particles in Sunscreens Applied Outdoors Are Absorbed through Human Skin. *Toxicological Sciences* 2010;**118**:140-149.  
*Cette publication met en évidence la pénétration, à travers la peau, de nanoparticules manufacturées (oxyde de zinc) contenues dans les crèmes solaires. Elle montre que les nanoparticules sont toujours détectables dans le sang et les urines après cinq jours suivant la fin de l'application. Elle montre aussi que les concentrations retrouvées chez les sujets femelles sont plus importantes que celles mesurées chez les sujets males.*
- (2) **Larese FF, D'Agostin F, Crosera M et al.** Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* 2009;**255**:33-37.  
*Cet article détaille une mesure de la pénétration des nanoparticules d'argent à travers la peau humaine intacte ou endommagée. La méthodologie a été établie afin de simuler le plus fidèlement possible les conditions naturelles. Les auteurs concluent à une pénétration faible mais détectable dans le stratum corneum mais aussi dans des couches cutanées plus profondes.*
- 3) **Song Z, Kelf TA, Sanchez WH et al.** Characterization of optical properties of ZnO nanoparticles for quantitative

imaging of transdermal transport. *Biomedical Optics Express* 2011;**2**:3321-3333.

*Cet article détaille une nouvelle méthode de mesure de l'absorption des nanoparticules à travers la peau. Les auteurs utilisent la microscopie optique non linéaire transdermique qui offre un contraste élevé en ce qui concerne les nanoparticules d'oxyde de zinc étudiées. Seule une accumulation de nanoparticules a été observée à la surface de la peau.*

### Conflits d'intérêts

Les auteurs déclarent :

- n'avoir aucun conflit d'intérêt  
 avoir un ou plusieurs conflits d'intérêt