

ALEXANDRA DUQUE FERNANDEZ

**VALIDATION D'UN MODÈLE DE SUBSTITUTS  
CUTANÉS PATHOLOGIQUES POUR DES ÉTUDES  
DERMOPHARMACOLOGIQUES**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en pharmacie  
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE PHARMACIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2008

© Alexandra Duque Fernandez, 2008

## Résumé

Il est présentement difficile de tester les médicaments anti-psoriasiques sur de nombreux échantillons de peaux pathologiques en raison de problèmes éthiques, de disponibilité et de variations interindividuelles. Ainsi, les formulations de médicaments proposées à la population atteinte de psoriasis ne sont pas bien adaptées à leur situation réelle. La pénétration cutanée de drogues est une méthode qui offre un grand potentiel et qui plus est particulièrement attrayante comparativement aux méthodes conventionnelles d'injection ou d'administration orale. Le principal objectif de notre étude est de présenter un nouveau modèle de substituts cutanés pathologiques faits à partir de cellules de patients psoriasiques et selon la méthode d'auto-assemblage, afin de tester la pénétration de différentes molécules et de vérifier si le substitut est similaire au tissu pathologique *in vivo*. En comparaison à la peau normale humaine et à la peau de souris, une fonction barrière efficace a été observée pour les substituts de peau faits à partir de cellules de patients sains lorsque les molécules suivantes ont été appliquées: l'acide benzoïque, la caféine et l'hydrocortisone. Il est connu dans la littérature que les peaux de patients psoriasiques sont plus perméables. Cette même caractéristique a été observée pour les substituts cutanés préparés à partir de cellules de patients psoriasiques. Ces tests de pénétration cutanée sont un premier pas vers la validation d'un modèle de substituts cutanés pathologiques, précisément psoriasiques, en vue de pouvoir le considérer en tant qu'outil efficace pour des études dermopharmacologiques d'agents anti-psoriasiques.

## **Avant-Propos**

En premier lieu, j'aimerais remercier ma directrice de recherche Dre Roxane Pouliot pour sa direction judicieuse et son encouragement sans faille, pour m'avoir permis de travailler à un projet qui m'a donné de nouveaux défis de vie non seulement au niveau scientifique mais également au niveau personnel. Je remercie aussi Dr. François Auger pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son prestigieux laboratoire.

J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'équipe Psoriasis, spécialement Jessica Jean et Agathe Ferland pour leur grande disponibilité et leur appui.

Je remercie Rina Guignard, Lucie St-Pierre, Nathalie Tremblay, Marie-France Champigny et Anne-Marie Moisan pour les différentes formations qu'elles m'ont prodiguées au cours de mon projet et de façon générale, je remercie tous les membres du laboratoire LOEX.

Je remercie mon amie Jocelyne pour son support et sa collaboration lors de la correction du français.

Dans ce rêve impliquant la poursuite de mes études, je ne suis pas seule, deux autres personnes très importantes pour moi y sont également impliquées; mon mari et ma fille. À Guido, je te remercie pour ton accompagnement et appui constants. À Alejandra, pour la joie qu'elle me donne et qui m'encourage à continuer.

Spécialement, je remercie ma famille et surtout ma mère, pour le sacrifice qu'elle a fait de me laisser partir afin de vivre mon rêve.

Merci à Dieu de veiller toujours sur nous.

*À ma mère pour sa bonté et sa sagesse et à  
qui j'admire et j'aime profondément. À mon  
père, à qui je rends hommage et qui  
demeurera toujours dans mon cœur.*

## Table des matières

Résumé.....	ii
Avant-Propos .....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures .....	viii
Liste des abréviations.....	x
Chapitre 1 Introduction .....	1
1.1 Peau.....	3
1.1.1 Épiderme .....	4
1.1.1.1 Cellules de l'épiderme .....	4
1.1.1.2 Couches de l'épiderme.....	6
1.1.1.3 Différenciation épidermique .....	6
1.1.2 Homéostasie.....	9
1.1.3 Derme.....	9
1.2 Absorption percutanée .....	10
1.2.1 Physiologie de l'absorption percutanée .....	10
1.2.2 Bicouches lipidiques intercellulaires .....	11
1.2.3 Routes de l'absorption percutanée.....	12
1.2.3.1 <u>La voie transépidermique</u> .....	13
1.2.3.2 <u>La voie transfolliculaire</u> .....	14
1.2.4 Facteurs influençant l'absorption percutanée .....	16
1.2.4.1 Facteurs biologiques .....	16
1.2.4.2 Facteurs physico-chimiques:.....	20
1.2.5 Mécanismes de l'absorption percutanée .....	24
1.2.6 Métabolisme des médicaments dans la peau .....	25
1.3 Méthodes d'étude de l'absorption percutanée .....	26
1.3.1 Méthodes <i>in vivo</i> pour l'étude de l'absorption percutanée .....	26
1.3.2 Méthodes <i>in vitro</i> pour l'étude de l'absorption percutanée .....	27
1.4 Psoriasis .....	29
1.4.1 Histologie.....	29
1.4.2 Facteurs déclenchants .....	29
1.4.3 Physiopathologie.....	30
1.5 Psoriasis et absorption percutanée .....	31
1.6 Modèles animaux du psoriasis .....	34
1.7 Génie tissulaire.....	35
1.7.1 Génie tissulaire et psoriasis.....	38
1.8 Problématique .....	44
1.9 Hypothèses et objectifs de recherche .....	44
1.9.1 Hypothèse générale.....	44
1.9.2 Hypothèse spécifique .....	44
1.9.3 Objectif général.....	45
1.9.4 Objectifs spécifiques.....	45
Chapitre 2 Matériel et méthodes .....	46

2.1 Lignées cellulaires .....	46
2.1.1 Lignées saines .....	46
2.1.2 Lignées psoriasiques .....	46
2.2 Extraction cellulaire .....	46
2.3 Culture cellulaire et production de substituts cutanés par la méthode d'auto- assemblage .....	48
2.3.1. Décongélation et ensemencement des fibroblastes.....	48
2.3.2. Décongélation et ensemencement des kératinocytes .....	49
2.4 Substituts cutanés.....	50
2.5 Molécules .....	52
2.6 Démarche expérimentale pour l'absorption percutanée .....	53
2.7 Analyse statistique des données.....	55
Chapitre 3 Résultats .....	56
3.1 Caractéristiques de chaque peau .....	56
3.1.1 Substitut de peau normale humaine (SPNH) .....	56
3.1.2 Substituts psoriasiques (SPS).....	57
3.2 Résultats en pourcentage de la radioactivité cumulée et récupérée pour chacune des molécules étudiées .....	59
3.2.1 Acide benzoïque.....	60
3.2.2 Caféine .....	68
3.2.3 Hydrocortisone.....	77
Chapitre 4 Discussion .....	89
4.1 Échantillons de peau .....	89
4.1.1 Comparaison entre les substituts de peau normale humaine (SPNH) et la peau normale humaine (PNH) .....	89
4.1.2 Comparaison entre les substituts de peau normale humaine (SPNH) et les substituts de peau psoriasique (SPS).....	91
4.2 Évaluation de la fonction barrière.....	93
4.2.1 Acide Benzoïque.....	93
4.2.2 Caféine .....	95
4.2.3 Hydrocortisone.....	97
Chapitre 5 Conclusions et recommandations.....	99
Bibliographie.....	102

## Liste des tableaux

Tableau 1: Couches de l'épiderme .....	6
Tableau 2: Excrétion de triamcinolone acétonide dans l'urine après application topique sur peaux psoriasique et normale.....	32
Tableau 3: Anomalies dans la fonction barrière par rapport à la sévérité du phénotype psoriasique .....	33
Tableau 4: Nombre de corps lamellaires selon le type de psoriasis .....	34
Tableau 5: Différents types de substituts de peau créés par génie tissulaire .....	39
Tableau 6: Avantages et inconvénients reliés aux différents modèles de substituts cutanés créés par génie tissulaire.....	39
Tableau 7: Comparaison de l'efficacité barrière de deux modèles de substituts cutanés en utilisant différentes molécules .....	40
Tableau 8: Caractérisations morphologiques de différents modèles de peau reconstruite ...	42
Tableau 9: Valeurs moyennes de perméabilité ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de différents modèles d'épidermes reconstruits commercialement disponibles comparées à celles trouvées pour des épidermes normaux de peaux humaine et animale .....	43
Tableau 10: Banque de lignées cellulaires psoriasiques.....	46
Tableau 11: Molécules radioactives utilisées pour les études d'absorption percutanée.....	52
Tableau 12: Démarche expérimentale .....	54
Tableau 13: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'acide benzoïque .....	60
Tableau 14: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'acide benzoïque .....	63
Tableau 15: Résultats combinés des pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'acide benzoïque provenant des expériences 1 et 2 .....	65
Tableau 16: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de la caféine .....	68
Tableau 17: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de la caféine .....	71
Tableau 18: Résultats combinés des pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de la caféine provenant des expériences 1, 2 et 3 .....	75
Tableau 19: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'hydrocortisone .....	77
Tableau 20: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'hydrocortisone .....	82
Tableau 21: Résultats combinés des pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'hydrocortisone provenant de toutes les expériences.....	87

## Liste des figures

Figure 1: La peau .....	3
Figure 2: Structures et différenciation épidermiques.....	8
Figure 3: Représentation "briques et mortier" de composants structuraux et fonctionnels du SC.....	12
Figure 4: Voies de pénétration cutanée au sein du SC.....	14
Figure 5: Absorption d'une molécule à travers la peau.....	15
Figure 6: La modification du SC permettant d'améliorer la pénétration percutanée.....	24
Figure 7: Cellules de Franz.....	28
Figure 8: Extraction du derme et de l'épiderme.....	47
Figure 9: Extraction cellulaire.....	48
Figure 10: Production de substituts cutanés par la méthode d'auto-assemblage.....	50
Figure 11: Cellule à diffusion de type Franz.....	54
Figure 12: Caractéristiques macroscopiques et histologiques du substitut de peau normale humaine.....	56
Figure 13: Caractéristiques macroscopiques de substituts cutanés psoriasiques faits à partir des cellules d'une femme de 46 ans (A) et faits à partir des cellules d'une femme de 65 ans (B).....	57
Figure 14: Caractéristiques histologiques d'un substitut de peau normale humaine (A) et d'un substitut psoriasique fait à partir des cellules d'une femme de 46 ans (B).....	58
Figure 15: Caractéristiques histologiques d'un substitut de peau normale humaine (A) et d'un substitut psoriasique fait à partir des cellules d'une femme de 65 ans (B).....	58
Figure 16: Profils de pénétration cutanée de l'acide benzoïque pour les différents échantillons testés.....	62
Figure 17: Profils de pénétration cutanée de l'acide benzoïque pour les différents échantillons testés.....	64
Figure 18: Profils de pénétration cutanée de l'acide benzoïque pour les différents échantillons testés (expériences 1 et 2).....	67
Figure 19: Profils de pénétration cutanée de la caféine pour les différents échantillons testés.....	70
Figure 20: Profils de pénétration cutanée de la caféine pour les différents échantillons testés.....	73
Figure 21: Profil de pénétration cutanée de la caféine utilisant la peau de souris.....	74
Figure 22: Profils de pénétration cutanée de la caféine pour les différents échantillons testés (expériences 1, 2 et 3).....	76
Figure 23: Profils de pénétration cutanée de l'hydrocortisone pour les différents échantillons testés.....	79
Figure 24: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant la peau de souris.....	80
Figure 25: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant la peau normale humaine.....	81
Figure 26: Profils de pénétration cutanée de l'hydrocortisone pour les différents échantillons testés.....	84
Figure 27: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant nos substituts de peau normale humaine.....	85

Figure 28: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant la peau normale humaine.....	86
Figure 29: Profils de pénétration cutanée de l'hydrocortisone pour les différents échantillons testés (expériences 1, 2, 3, 4, 5, 6).....	88

## Liste des abréviations

OCDE:	Organisation de Coopération et Développement Économique
SC:	Stratum corneum
TEWL:	Perte d'eau transépidermale (Transepidermal water loss)
NMF:	Le facteur naturel d'hydratation (Natural moisturizing factor)
PNH:	Peau normale humaine
SPNH:	Substitut de peau normale humaine
PS:	Peau de souris
SPS46:	Substitut de peau psoriasique 46 fait à partir des cellules d'une femme de 46 ans
SPS65:	Substitut de peau psoriasique 65 fait à partir des cellules d'une femme de 65 ans

## Chapitre 1 Introduction

L'administration transcutanée de médicaments est une technique non invasive qui permet d'évaluer, sur le plan local et systémique, l'activité de médicaments topiques ou encore l'innocuité de médicaments, cosmétiques et autres agents susceptibles d'entrer en contact avec l'épiderme. Les tests *in vitro* de diffusion à travers la peau sont une des premières étapes poursuivies dans l'élaboration d'une drogue transdermique. À cette fin, plusieurs modèles d'instruments ont été envisagés afin, entre autre, d'éviter les tests sur les animaux vivants. Les cellules de Franz sont reconnues pour être d'excellents outils permettant des études *in vitro* de la diffusion de drogues transdermiques. Cependant, dans le but de tester de nouvelles formulations dermatopharmaceutiques pour peaux malades (peau psoriasique par exemple), il n'en demeure pas moins que ces méthodes *in vitro* emploient soit de la peau normale humaine (ne présentant donc pas les caractéristiques pathologiques des peaux d'individus qui utiliseront ces traitements) ou soit de la peau animale saine (ne se rapprochant pas souvent des caractéristiques cutanées humaines) ou bien encore des membranes artificielles (s'éloignant davantage des caractéristiques d'une peau malade). Par ailleurs, concernant la pathologie du psoriasis, aucun modèle animal n'affiche pour l'instant un développement certain et convenable de cette dernière et l'obtention d'échantillons de peaux psoriasiques (fraîche ou cadavérique congelée) est rare et très coûteuse.

Les récents progrès biotechnologiques effectués dans le domaine du génie tissulaire permettent aujourd'hui de concevoir, mettre au point et de fabriquer des biomatériaux pouvant remplacer des tissus ou des organes. Il fut démontré que la reconstruction tissulaire pouvait s'appliquer à plusieurs tissus tels que la peau, les vaisseaux sanguins, le cartilage, les os et la cornée. Notre équipe de recherche a récemment démontré que la méthode d'auto-assemblage (qui consiste, par génie tissulaire, à fabriquer des substituts cutanés complètement autologues, c'est-à-dire sans matériel exogène, et composés à la fois d'un derme et d'un épiderme) est une méthode de reconstruction tissulaire pouvant facilement s'adapter à la fabrication de substituts pathologiques, c'est-à-dire fabriqués avec des cellules isolées de biopsies de patients atteints de maladies cutanées graves, tel le psoriasis.

Le psoriasis est une dermatose très complexe et encore mal comprise. On ne connaît pas de cure pour cette maladie. La fréquence de la maladie est estimée à 2% de la population mondiale, soit près de 80 millions d'individus, dont environ 20 millions sont affectés par les formes modérées à graves de la maladie. C'est une maladie imprévisible qui peut avoir un effet dévastateur sur la santé physique ou mentale d'une personne. Une personne atteinte sur cinq exige des hospitalisations fréquentes. Ici au pays, un million de Canadiens souffriraient de cette maladie de la peau. Puisqu'il est présentement impossible de tester les médicaments anti-psoriasiques sur de nombreux échantillons pathologiques (problèmes d'éthique, de disponibilité, de variations interindividuelles, etc.) les formulations de médicaments proposées à la population psoriasique ne sont pas bien adaptées à leur situation réelle. Le besoin d'outils novateurs et efficaces pour l'évaluation de nouvelles formulations dermopharmaceutiques demeure indispensable.

## 1.1 Peau

La peau est ce matériau qui recouvre entièrement le corps. Chez l'adulte moyen, sa superficie varie entre 1,2 et 2,2 m<sup>2</sup>, pèse environ 4 kg (ou 7 % de la masse corporelle totale) et son épaisseur varie entre 1,5 et 4 mm (Elaine, 2005).

La peau est composée de trois couches: L'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1).

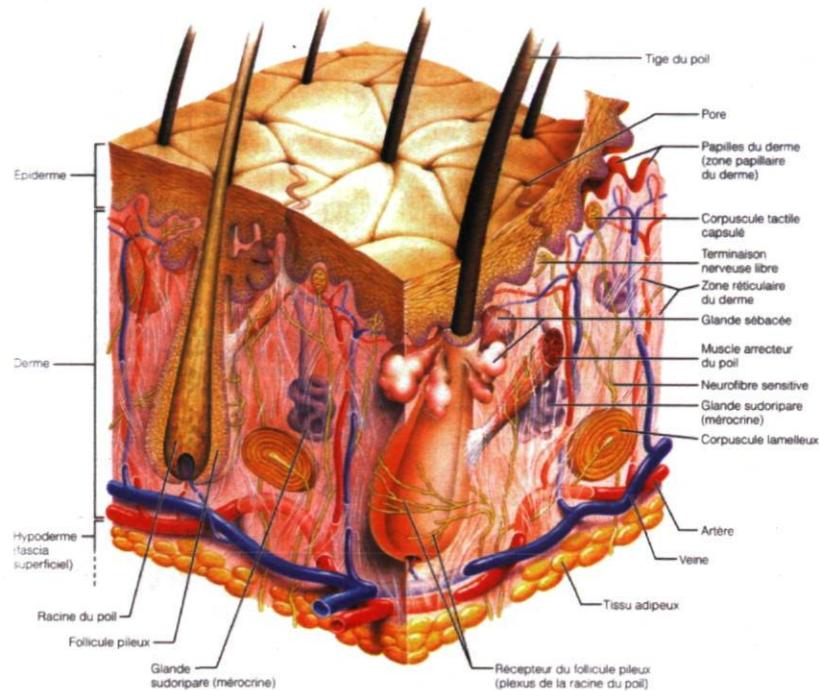


Figure 1: La peau

(Tirée de: Elaine N. Marieb, Anatomie et physiologie humaines, 2005)

### 1.1.1 Épiderme

L'épiderme humain est un tissu crucial qui produit une barrière robuste, flexible et auto-réparatrice entre les organes internes de notre corps et notre environnement (Jager, 2004). Sa fonction principale est de protéger le corps de la déshydratation (Proksch, 2005), de la perte de nutriments et des effets indésirables provenant de toutes substances qui entrent en contact avec la peau. De plus, il contribue à la protection contre les organismes qui vivent autour de nous; par exemple: les animaux, les plantes, les champignons et les micro-organismes (Jager, 2004). En général, la barrière de l'épiderme nous protège de tous les dangers potentiels qu'ils soient physiques, chimiques ou mécaniques (Nemes, 1999) et se présente sous la forme d'un épithélium stratifié, squameux, kératinisé, qui se compose de quatre types de cellules et de quatre ou cinq couches distinctes selon le type de peau (épaisse ou mince).

#### 1.1.1.1 Cellules de l'épiderme

L'épiderme contient plusieurs types de cellules soit: les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Merkel et les macrophagocytes intraépidermiques.

##### a. Kératinocytes

Les kératinocytes (*ker*: corne) produisent la kératine, une protéine fibreuse qui confère aux cellules de l'épiderme leurs propriétés protectrices. Les kératinocytes sont étroitement liés les uns aux autres par des desmosomes. Ils proviennent de cellules qui se divisent de façon quasi continue par mitose et qui sont situées dans la partie la plus profonde de l'épiderme (couche basale). À mesure que les kératinocytes sont poussés vers la surface de la peau par les nouvelles cellules, ils commencent à produire la kératine molle qui va devenir leur constituant majeur. Les kératinocytes meurent durant leur migration vers la surface de la peau. Ces cellules ne sont alors plus guère que des membranes plasmiques remplies de kératine.

Certaines régions du corps, telles les paumes des mains et les plantes des pieds sont régulièrement soumises à des frictions. Ainsi, l'épiderme de ces dernières présente le

renouvellement épidermique le plus rapide du corps et prend entre 25 et 30 jours. La production des kératinocytes et la formation de kératines y sont accélérées par rapport à d'autres régions de notre corps où le renouvellement prend entre 25 et 45 jours (Elaine, 2005). Il faut environ 14 jours pour que les kératinocytes achèvent leur voyage du *stratum basal* au *stratum corneum* (SC) et 14 jours de plus avant que les cornéocytes ne soient perdus à la surface de la peau humaine saine. De ce fait, tout changement dans le processus de la différenciation épidermique normale survenant au niveau du *stratum basal*, ne sera reflété à la surface de la peau, que dans 3 à 4 semaines (Proksch, 2005).

#### **b. Mélanocytes**

Les mélanocytes, beaucoup moins nombreux que les kératinocytes, sont des cellules épithéliales de forme étoilée qui synthétisent un pigment appelé mélanine (*melas*: noir). On les trouve dans les couches profondes de l'épiderme. À mesure que la mélanine se constitue et s'accumule dans les mélanosomes, qui sont des granules limités par une membrane, les protéines motrices l'acheminent le long des filaments d'actine jusqu'à l'extrémité des prolongements mélanocytaires, d'où elle est absorbée par les kératinocytes avoisinants. Les granules de mélanine s'accumulent sur la face du noyau des kératinocytes tournée vers le milieu externe et forment ainsi une sorte de bouclier pigmentaire qui protège le noyau contre les effets dévastateurs des rayons ultraviolets du soleil (Elaine, 2005).

#### **c. Cellules de Langerhans**

Les cellules de Langerhans sont les prolongements des macrophagocytes intraépidermiques. Ces cellules sont produites dans la moelle osseuse avant de migrer vers l'épiderme. Ce sont des macrophagocytes qui contribuent à l'activation des cellules de notre système immunitaire. Leurs minces prolongements s'étendent au milieu des kératinocytes en formant un réseau plus ou moins continu.

#### **d. Cellules de Merkel**

Les cellules de Merkel sont situées à la jonction de l'épiderme et du derme. Ces cellules sont hémisphériques, chacune est, d'une part, étroitement liée à la terminaison d'une

neurofibre sensitive appelée *corpuscule tactile non capsulé*, ou disque de Merkel et, d'autre part, associée aux kératinocytes voisins par des microvillosités qui s'insèrent dans les replis de leur membrane.

### 1.1.1.2 Couches de l'épiderme

L'organisation typique de l'épiderme en quatre couches révèle qu'à l'intérieur des kératinocytes, tout le programme de différenciation vise à produire cette barrière (Jager, 2004).

Tableau 1: Couches de l'épiderme

COUCHES	CELLULES	STRATES	FORME	CARACTÉRISTIQUES
Basale ou germinative	Kératinocytes jeunes, mélanocytes (10-25 %) et Merkel	1	Cuboïdale (Jager, 2004)	Cellules prolifératives non différenciées
Épineuse	Kératinocytes	Plusieurs strates	Polyédrique	Prékératine Granules de mélanine macrophagocytes intraépidermiques
Granuleuse	Kératinocytes	3 – 5	Aplatie	Granules de kératohyaline (Downing, 2000) et lamellés
Claire (dans la peau épaisse)	Kératinocytes	Quelques strates	Aplatie	Cellules mortes
Cornée	Cornéocytes	20 – 30	Squameuse	Kératine Cellules mortes

### 1.1.1.3 Différenciation épidermique

Toutes les cellules de l'épiderme sont produites par la division et la prolifération des kératinocytes du *stratum basal*. Ces cellules progressent alors par le *stratum spinosum* et le

*stratum granulosum*. Dans le voyage des kératinocytes vers la surface de la peau, ils mûrissent et développent des vésicules remplies de lipides. En atteignant la couche épidermique finale, le SC, les kératinocytes s'aplatissent et perdent leurs noyaux, se remplissant de fibres de kératine (Downing, 2000). Cette transformation est appelée cornification. Les kératinocytes morts sont connus sous le nom de cornéocytes et ce sont ces cellules qui offrent une barrière à la peau (figure 2). En effet, la fonction la plus importante des couches épidermiques inférieures semble être la production du SC. La transformation entière, point par point, des kératinocytes en cornéocytes est appelée la différenciation épidermique. Pendant ce processus, des kératines spécifiques et des protéines d'enveloppe cornée aussi bien que des lipides sont formés (Proksch, 2005).

Ainsi, cette barrière entre le corps et l'environnement est constamment maintenue par la production des kératinocytes de la couche interne de l'épiderme qui subissent un processus de différenciation terminale (Nemes, 1999). Ces cellules fournissent protection contre les agressions chimiques et mécaniques et, ensemble, avec les lipides intercellulaires, confèrent l'imperméabilité à la peau. Une grande partie de cette fonction barrière est fournie par l'enveloppe cornifiée de la cellule, un polymère de protéines-lipides très dur, structure formée en dessous de la membrane cytoplasmique qui subséquentement va résider à l'extérieur de la cellule cornifiée morte (Nemes, 1999). Le polymère consiste en une enveloppe de protéines et une enveloppe de lipides. On pense que l'enveloppe de protéines contribue aux propriétés biomécaniques des enveloppes cornifiées des cellules grâce à son enchaînement en croix de protéines structurales spécialisées à toutes les deux unions d'isopeptides de disulfide et de N-( $\gamma$ -glutamyl) lysine. Certaines des protéines structurales impliquées sont l'involucrine et la loricrine, petites protéines riches en proline, des filaments de kératine, d'élafine, de cystatine A et des protéines de desmosomes (Nemes, 1999).

L'enveloppe lipidique est à l'extérieur et est unie de façon covalente à l'enveloppe de protéines par des liens esters ; cette enveloppe consiste en une couche monomoléculaire de  $\omega$ -hydroxycéramides qui sert à couvrir la cellule tel un téflon et qui permet à ces céramides d'interagir avec les lipides intercellulaires lamellaires à l'image d'un velcro (Nemes, 1999).

De nombreuses réactions biochimiques ont lieu durant la transition de la couche basale au SC incluant la synthèse de kératines spécifiques basales (K5 et K14) et suprabasales (K1 et K10) (Proksch, 2006).

Les cornéocytes ont une épaisseur moyenne d'environ  $1\mu\text{m}$  et une aire de surface moyenne approximativement de  $1000\mu\text{m}^2$ . Cette aire de surface est dépendante de l'âge, de la localisation anatomique et des conditions qui influencent la prolifération épidermique comme les radiations ultraviolets (Marks, 1983). La taille du cornéocyte augmente avec l'âge en reflétant l'accru du temps de passage dans le SC. Dans la plupart des sites du corps, le SC a entre 12 et 16 couches de cornéocytes aplatis (Zhen, 1991).

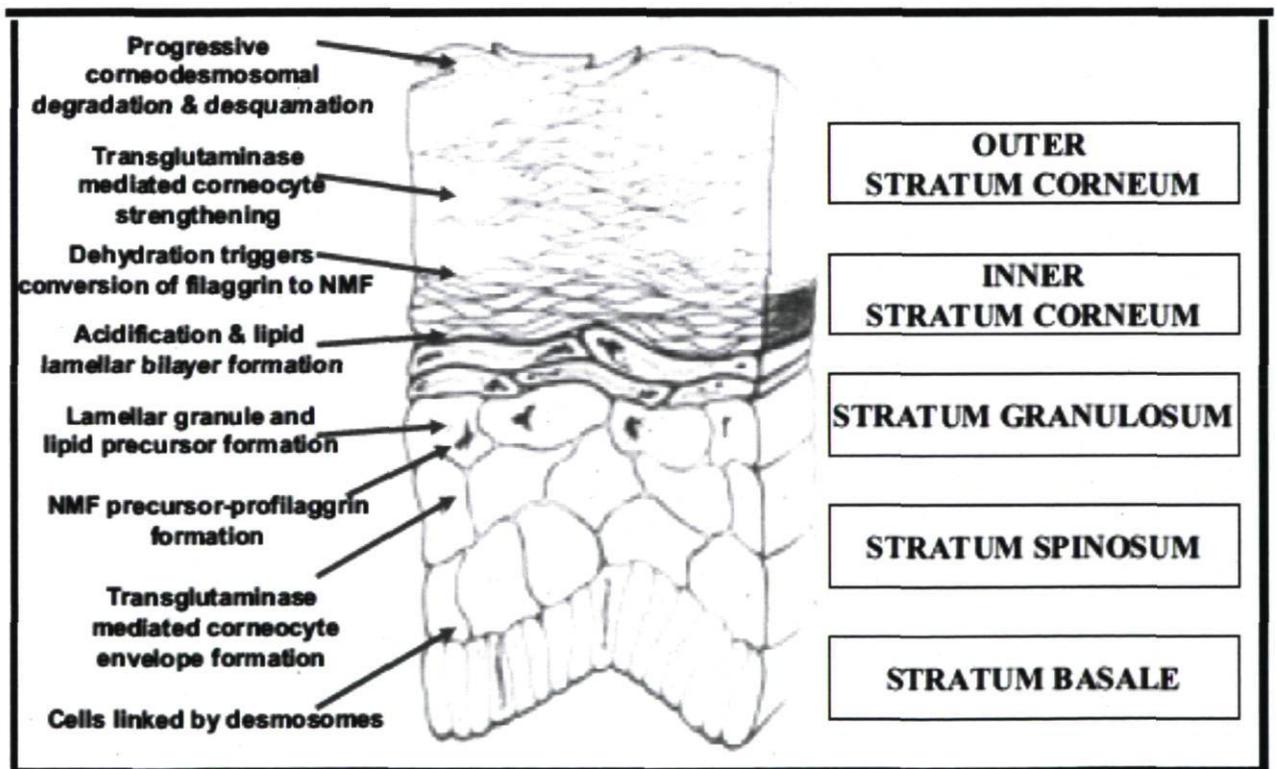


Figure 2: Structures et différenciation épidermiques

(Tirée de Rawlings, 1994).

### 1.1.2 Homéostasie

La desquamation des cornéocytes se produit de façon régulière à la surface de la peau, de telle sorte qu'une prolifération constante de cellules dans la couche basale la plus interne doit être régulée pour garantir l'homéostasie de l'épiderme (Jager, 2004). Une exposition excessive au soleil finit par endommager la peau et ce, en dépit des effets protecteurs de la mélanine. On assiste alors à une agglutination des fibres élastiques donnant à la peau un aspect tanné, ainsi qu'à une dépression temporaire du système immunitaire et, parfois, à une altération de l'ADN (mutations) qui peut en quelques dizaines d'années produire un cancer de la peau. Les individus à la peau foncée sont plus rarement atteints de cancers de la peau que ceux qui ont la peau pâle. Chez eux, ce sont les régions les moins pigmentées (plante du pied et lit des ongles) qui sont touchées, ce qui démontre à quel point la mélanine constitue un écran solaire efficace (Elaine, 2005).

### 1.1.3 Derme

Le derme (*derma* : peau) est constitué de tissu conjonctif à la fois résistant et flexible. Cette couche est composée de fibroblastes, de fibrocytes, de macrophagocytes, de mastocytes et de globules blancs. Sa matrice gélatineuse est imprégnée d'une grande quantité de collagène, d'élastine et de réticuline. Cette couche est riche en neurofibres, en vaisseaux sanguins et en vaisseaux lymphatiques. La majorité des follicules pileux, des glandes sébacées et sudoripares résident dans le derme mais proviennent de l'épiderme.

Le derme est formé de deux couches, soit la zone papillaire et la zone réticulaire. La zone papillaire est une mince couche de tissu conjonctif aréolaire composée de fibres de collagène et d'élastine entrelacées qui permet le passage de nombreux vaisseaux sanguins ainsi que de neurofibres. La partie supérieure est constellée de projections mamillaires, appelées papilles du derme, qui donnent à sa surface externe un relief accidenté. De nombreuses papilles du derme sont pourvues de bouquets capillaires, d'autres abritent des terminaisons nerveuses libres (récepteurs de la douleur) et des récepteurs du toucher, également appelées corpuscules tactiles capsulés.

La zone réticulaire, plus profonde, s'étend sur environ 80 % de l'épaisseur du derme. Elle est composée de tissu conjonctif dense irrégulier. Sa matrice extracellulaire renferme d'épais faisceaux de fibres de collagène enchevêtrées, différemment orientées mais pour la plupart parallèles à la surface de la peau. Les fibres de collagène du derme confèrent à la peau la résistance qui lui est nécessaire pour la protéger contre différentes agressions extérieures. De plus, elles fixent l'eau et contribuent ainsi à l'hydratation de la peau. Les fibres d'élastine procurent à la peau la capacité de retrouver sa forme après un étirement (Elaine, 2005).

## **1.2 Absorption percutanée**

L'une des principales fonctions de la peau est la fonction barrière qui s'exerce dans les deux sens, entre l'environnement externe et l'intérieur du corps. D'abord, elle empêche l'entrée dans le corps d'agents exogènes indésirables, tels les microbes (Proksch, 2005). Elle évite la perte d'eau transépidermique, d'électrolytes et d'autres constituants du corps humain et empêche la pénétration de molécules de l'environnement. Cette fonction barrière n'est cependant pas infaillible et c'est cette perméabilité relative qui est mise à profit pour le passage de médicaments à travers la peau. Le passage d'une molécule à travers la peau peut être voulu lorsqu'il s'agit d'un produit actif susceptible d'effectuer une action thérapeutique au sein de la peau elle-même ou au niveau systémique.

### **1.2.1 Physiologie de l'absorption percutanée**

L'absorption percutanée est la pénétration d'une molécule déposée à la surface de la peau au travers du *SC* et des couches sous-jacentes jusqu'au sang. De par sa composition et organisation lipidique, le *SC* est la couche limitante pour l'absorption percutanée. La perte d'eau cutanée, une fonction qui dépend de la nature complexe de sa couche extérieure, le *SC*, doit être soigneusement régulée par l'épiderme. En effet, le *SC* est sélectivement perméable, hétérogène, protège contre la dessiccation et les agressions de l'environnement tout en conservant une quantité d'eau suffisante permettant à la peau de fonctionner dans des environnements arides. Ainsi, une petite perte d'eau hydratera les couches extérieures du *SC*, maintiendra sa flexibilité et facilitera les réactions enzymatiques conduisant à la

maturation du SC (Rawlings, 1994; Rawlings, 2005). La capacité du SC à conserver l'eau est fortement dépendante du phénotype des cornéocytes, de leur organisation spatiale, de la composition précise et de l'emballage physique des lipides extracellulaires ainsi que de la présence de composés fortement hygroscopiques trouvés en grande partie dans les cornéocytes (Rawlings, 2004).

Les cornéocytes kératinisés sont les cellules cornifiées du SC qui ont approximativement 15 nm d'épaisseur d'enveloppe de protéines (do Couto, 2005). Comme il a été mentionné auparavant, cette enveloppe est formée à l'intérieur de la membrane plasmique dans les cellules terminales différenciées et est très insoluble (Nemes, 1999; Steinert, 1999). L'information sur l'organisation moléculaire du SC est importante pour le traitement des maladies de la peau, la libération percutanée de médicaments ainsi que l'apparence esthétique et cosmétique de la peau (White, 1988).

### **1.2.2 Bicouches lipidiques intercellulaires**

La barrière du SC est souvent comparée à un mur de briques, dans lequel les kératinocytes différenciés ou les cornéocytes sont représentés par les briques submergées dans une matrice continue de lipides spécialisés, le ciment, qui assure l'union de la structure entière (figure 3) (Elias, 1983). Les lipides empêchent la perte d'eau et les cornéocytes protègent contre l'abrasion continue des dommages physiques et chimiques (Harding, 2004). Les couches de lipides intercellulaires forment une bicouche lipidique qui est obtenue par le déversement du contenu des corps lamellaires expulsés par les kératinocytes du *stratum spinosum* et *granulosum* se déplaçant vers le haut du SC. Les phospholipides, les sphingolipides et les constituants de la membrane plasmique sont activés par des enzymes présents aussi dans les corps lamellaires et sont transformés dans le SC en acides gras libres et en céramides (Elias, 2000). La bicouche lipidique intercellulaire du SC, de par son caractère unique en termes de composition, d'organisation et de propriétés physiques, joue un rôle essentiel dans la conservation de l'eau dans le corps (Feingold, 1990; Grubauer, 1989; Harding, 2004).

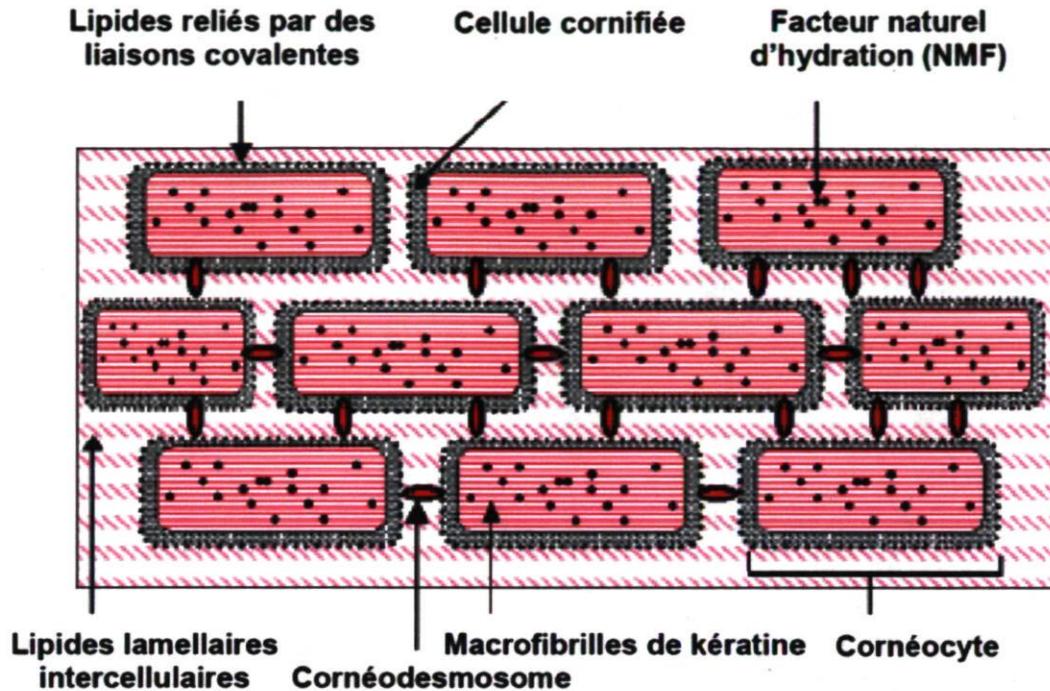


Figure 3: Représentation "briques et mortier" de composants structuraux et fonctionnels du SC

(Tirée de: Harding, 2004).

Il est estimé que la peau doit synthétiser approximativement 100 à 150 mg de lipides par jour pour remplacer la quantité perdue lors de la desquamation normale. Donc, la peau est un des sites les plus actifs pour la synthèse de lipides dans le corps (Elias, 1991; Rawlings, 1995).

### 1.2.3 Routes de l'absorption percutanée

L'absorption percutanée implique le passage d'un médicament au travers de la peau jusqu'aux capillaires qui irriguent le derme, après sa délivrance du système qui l'inclut. Déjà dans la circulation systémique, il est distribué par tout l'organisme jusqu'à atteindre son lieu d'action.

Les molécules peuvent pénétrer dans la peau par trois voies: le *SC* intact, les conduits de la sueur ou les glandes sébacées et les poils (figure 4). La surface du *SC* représente plus de 99 % de la surface de la peau totale disponible pour l'absorption percutanée de la molécule. Les principales étapes impliquées dans l'absorption percutanée incluent l'établissement d'un gradient de concentration, qui fournit la force nécessaire pour le mouvement de la molécule à travers la peau, la sortie de la molécule du véhicule (coefficient de partition) et la diffusion de la molécule à travers les couches de la peau (coefficient de diffusion).

Les caractéristiques nécessaires aux molécules destinées à une application topique incluent une faible masse moléculaire (600 Da), une solubilité adéquate dans l'huile et dans l'eau et un haut coefficient de partition (Barry, 2004). À part de très petites particules, les ions hydrosolubles et les molécules polaires ne pénètrent pas dans le *SC* intact.

Le passage de substances au travers de la peau peut être réalisé par:

### **1.2.3.1 La voie transépidermique**

#### **- Transcellulaire**

La substance traverse les kératinocytes des différentes couches du *SC* en alternant des structures hydrophiles et lipophiles.

#### **- Intercellulaire**

De nature lipidique, c'est la route majoritaire (Elias, 1981). La substance diffuse à travers les espaces intercellulaires (Potts, 1991)

### 1.2.3.2 La voie transfolliculaire

#### - Transfolliculaire

Les molécules diffusent à travers la sécrétion lipophile des follicules pileux et des pores sébacés (Scheuplein, 1973).

Les molécules dont la diffusion à travers le SC est très faible, par leur tendance à former des enchaînements avec la kératine, utilisent la voie transfolliculaire, ce qui réduit leur vitesse de transport. De grosses molécules ayant un groupement polaire comme les stéroïdes, sont celles qui utilisent le plus cette route (Scheuplein, 1967). Cependant, cette dernière constitue moins de 1% de la surface corporelle.

#### - Transudoripare

Quelques composés hydrophiles de faibles poids moléculaires, ainsi que les électrolytes, diffusent au sein du liquide aqueux que contiennent les conduits sudoripares pour atteindre la base de la glande qui se trouve au contact de nombreux vaisseaux sanguins du derme (Pinnagoda, 1990). Cependant, cette voie de pénétration représente uniquement 0.1 % de la surface corporelle.

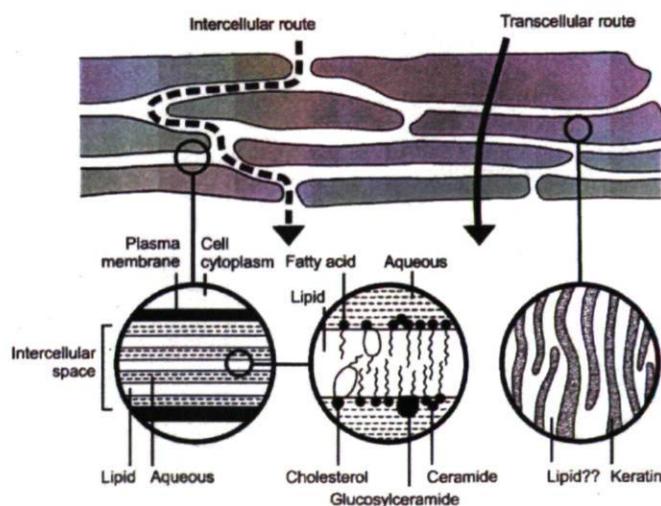


Figure 4: Voies de pénétration cutanée au sein du SC

(Tirée de Williams AC, Barry BW. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 1992; 9: 305-53; with permission from Begell House, Inc).

Les molécules actives dont on souhaite le passage se trouvent le plus souvent au sein d'une formulation. Une fois la phase de contact entre la molécule et la surface de la peau réalisée, la substance active doit quitter le véhicule afin de pénétrer au sein du SC et ce, avec plus ou moins de facilité; le coefficient de partage ( $K_m$ ) caractérise cette étape. La phase qui suit consiste en un remplissage, à grande vitesse, du SC, au sein duquel s'observeront des concentrations décroissantes de la molécule vers les profondeurs. Ce remplissage est caractérisé par sa grande vitesse et les quantités au sein du SC dépendent de l'affinité de la molécule pour cette structure. Le phénomène d'absorption proprement dit s'observe au moment où s'établit un flux constant correspondant au passage dans le tissu vivant d'une certaine quantité de la molécule ayant rempli le SC. Ce flux est proportionnel à la différence de concentration de la substance de part et d'autre du SC. Il est ainsi caractérisé par le coefficient de perméabilité ( $K_p$ ). Une fois le tissu vivant atteint, la molécule peut gagner le derme superficiel et le réseau vasculaire, subir un métabolisme local ou diffuser plus largement (figure 5).

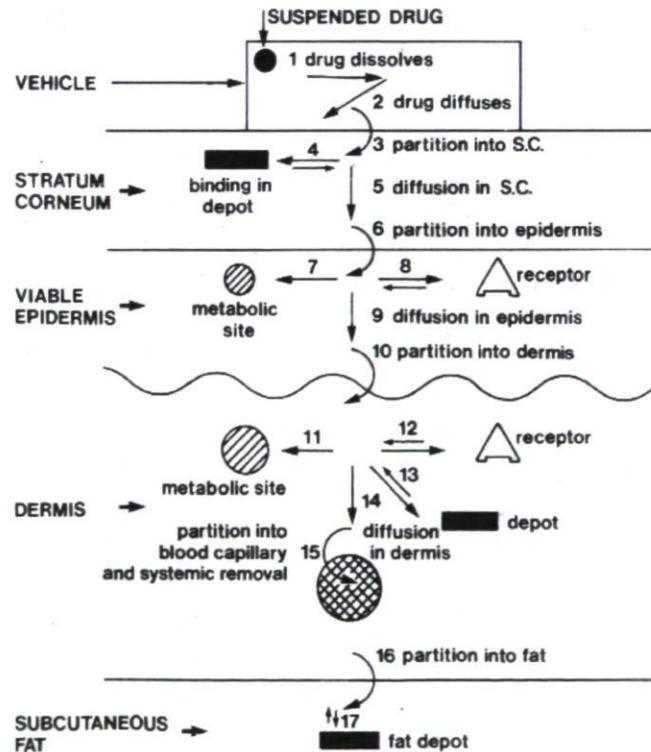


Figure 5: Absorption d'une molécule à travers la peau

(Tirée de: Barry, 1983)

## 1.2.4 Facteurs influençant l'absorption percutanée

Les facteurs qui influencent l'absorption percutanée peuvent être classés en deux grands groupes: les facteurs biologiques et ceux physico-chimiques.

### 1.2.4.1 Facteurs biologiques

Les facteurs biologiques sont relatifs à la nature propre de la peau étant donné qu'il existe une énorme variabilité interindividuelle.

#### a. L'épaisseur et le renouvellement du SC

Dans la peau saine, il est aisé de concevoir que plus le SC est épais, moins l'absorption sera importante. Les régions palmo-plantaires, caractérisées par un SC épais sont ainsi de mauvaises voies de pénétration des médicaments. Le renouvellement du SC auquel succède son élimination progressive participe au ralentissement de l'absorption percutanée. En revanche, tout ralentissement du renouvellement favorisera le maintien d'une concentration importante de principes actifs au sein du SC et facilitera sa pénétration.

#### b. L'hydratation du *stratum corneum*

Le SC couvre la surface entière du corps et est capable de rester doux et flexible dans les conditions ambiantes habituelles. Le caractère hydraté ou non du SC est un facteur influençant de façon conséquente l'absorption percutanée (Blank, 1984; Blank, 1952). L'un des moyens d'augmenter l'hydratation du SC est représentée par l'occlusion qui empêche l'élimination et crée un état d'hydratation apte à faciliter la pénétration des molécules, notamment les molécules moyennement lipophiles. Le SC est composé de kératinocytes différenciés (cornéocytes) et du contenu sécrété par les corps lamellaires (Rawlings, 1994). Les protéines du cornéocyte sont isolées dans le cytosol, tandis que les céramides et d'autres lipides sont enrichis dans l'espace extracellulaire où ils forment une phase continue. L'emballage physique des cornéocytes crée un chemin tortueux à traverser pour des molécules, augmentant efficacement la longueur de diffusion et ainsi l'amélioration de la fonction barrière du SC. Des lipides extracellulaires, fermement organisés comme un lien covalent de la matrice dans une phase cristalline appelée emballage orthorhombique réduisent le taux de flux d'eau à travers le tissu (Rawlings, 2003). La constitution et

l'efficacité de la barrière lipidique dépendent des concentrations absolues et des relatives dimensions des différents lipides (par exemple, céramides, cholestérol et acides gras). Les lectines et les desmosomes trouvés dans le SC aident aussi à maintenir la cohésion structurelle du SC. La réduction du flux d'eau et la perte à travers le tissu ne sont pas les causes uniques de la discontinuité dans l'hydratation entre les différentes couches de cornéocytes. Une rétention sélective d'eau est aussi exigée et le plus important moyen de le faire est de mettre en jeu le facteur naturel d'hydratation du SC, le NMF (natural moisturizing factor).

Aussi, il a été bien établi, dans les désordres hyperprolifératifs de la peau sèche, qu'il y avait un changement dans la composition des lipides du SC. On a observé que la composition de sous-types de céramides changeait et qu'une prédominance de céramides contenant de la sphingosine prenait la place des céramides contenant de la phytosphingosine. En 1986, le travail innovateur de Fulmer et Kramer de Procter & Gamble (P&G) a d'abord identifié les changements de la peau sèche (les niveaux accrus de céramides 2 et 4 et les niveaux réduits de céramides 3) (Fulmer, 1986). L'hydratation du SC a pour conséquence une augmentation dans la perméabilité, surtout quand il s'agit des molécules polaires comme le glycérol (Williams, 2004; Sugibayashi, 1992; Nguyen, 2003; Taylor, 2002). L'eau intracellulaire aide les cornéocytes à conserver leur gonflement et à maintenir ainsi une barrière physiologique, aussi bien que le maintien de la flexibilité de la peau et l'élasticité. Un haut niveau de perte d'eau transépidermale (transepidermal water loss-TEWL) est associé à une perte de contenu d'humidité de la peau, entraînant la perte de gonflement des cornéocytes du SC (Clark, 2004).

Le NMF se retrouve exclusivement dans le SC. Ce dernier est maintenu principalement grâce aux acides aminés et leurs dérivés tels l'acide carboxylique pyrrolidone (PCA), l'acide urocanique, de même que l'acide lactique, l'urée, le citrate et les sucres (Rawlings, 2004).

Les composés du facteur naturel d'hydratation sont présents dans de fortes concentrations au sein des cornéocytes et représentent une hausse de 20-30 % du poids sec du SC (Rawlings, 2004). En absorbant l'eau atmosphérique et en la dissolvant dans leur propre eau

d'hydratation, les composants hygroscopiques du NMF agissent en tant qu'humectants très efficaces (Rawlings, 2004). Biologiquement, cette humidification permet aux couches les plus éloignées du SC de rester hydratées malgré l'action desséchante de l'environnement. Ainsi, en maintenant l'eau libre dans le SC, le NMF facilite aussi des événements biochimiques critiques. L'exemple le plus saisissant est la régulation de plusieurs cornéocytes protéases qui sont en fin de compte responsables de la génération du NMF lui-même.

Il est probable que la perte de NMF soit renforcée par le déclin de la fonction barrière relatif à l'âge (Ghadially, 1995). Les profils typiques de profondeur du SC versus la concentration de NMF (obtenu par le « tape stripping » séquentiel chez des individus âgés) montrent un déclin à la surface de la peau de sujets âgés comparés à de jeunes individus (Rawlings, 1994). Ceci est typique de la peau normale exposée au lavage de savon ordinaire, pendant lequel beaucoup de composants hygroscopiques du NMF, aisément solubles, sont lavés du SC (Scott, 1993). Chaque étape de maturation menant à la formation d'une barrière humectante efficace, incluant le renforcement des cornéocytes, le traitement lipidique et la génération du NMF est influencée par le niveau d'hydratation du SC (Rawlings, 2004).

#### c. La température cutanée

L'augmentation de la température de la peau, notamment au cours des phénomènes inflammatoires, favorise la pénétration de molécules ayant pour conséquence une plus grande pénétration de médicament qui se traduit par l'augmentation du coefficient de diffusion (Chang, 1991).

#### d. Le flux sanguin

L'accélération du flux sanguin cutané participe à l'absorption dans le sens où, en éliminant progressivement les molécules du tissu cutané, elle augmente le gradient de concentration au sein de la peau. Précisément, le temps de permanence des substances dans le derme est réduit ce qui augmente le gradient de concentration en favorisant la diffusion des molécules depuis la surface cutanée vers le derme. Quand, pour une cause quelconque, le flux sanguin

diminue et que les substances ne sont pas drainées à mesure qu'elles pénètrent, ce facteur se convertit alors en un facteur limitant de l'absorption percutanée (Barry, 1983). De cette façon, l'utilisation de vasoconstricteurs peut réduire l'absorption d'autres substances administrées conjointement (Riviere, 1991).

e. L'âge

L'âge est un facteur important à prendre en considération. Il a été démontré que la perméabilité de la peau de jeunes individus était plus grande que celle d'individus plus âgés (Feldmann, 1970). La capacité d'absorption de la peau d'un nouveau-né est le double de celle d'un adulte. Chez le prématuré, la barrière cutanée est insuffisante et l'absorption s'en trouve accrue.

f. Le sexe

Bien que le contenu lipidique de la peau dans des zones déterminées du corps soit différent chez les hommes et les femmes (Cua, 1995), il ne semble pas que le sexe soit un facteur déterminant dans la pénétration percutanée de médicaments (Mc Cormick, 1991).

g. La race

La race peut être cause de différences dans l'absorption percutanée de médicaments. Il a été démontré que la peau d'individus de race noire présentait une perméabilité moindre grâce à sa plus grande densité (Weingand, 1991).

h. La zone d'application

La zone d'application est fondamentale puisque l'épaisseur du *SC* peut varier considérablement. En effet, cette épaisseur est plus importante dans les zones du corps exposées à un plus grand frottement, telles la paume des mains et la plante des pieds (Treffel, 1994).

### 1.2.4.2 Facteurs physico-chimiques:

Les facteurs physico-chimiques sont associés à la formulation d'un principe actif:

#### a. Caractéristiques physico-chimiques du principe actif

La diffusion d'une molécule est facilitée par sa petite taille. En effet, la peau ne peut absorber de substances de poids moléculaires supérieurs à 100 000 daltons. La diffusion à travers la peau est plus grande si la molécule a un poids moléculaire < 0.6 KDa, une solubilité adéquate en eau et en huile (en lien avec un faible point de fusion) et un coefficient de partition élevé optimal (Barry, 2004). De par sa nature à la fois hydrophile et lipophile, le SC permet l'absorption de molécules amphiphiles et moyennement lipophiles, que l'on caractérise par l'indice octanol/eau (Ko/w). Enfin, le pH cutané joue également un rôle dans la fonction barrière. En effet, il a été démontré que le pH acide de la peau favorisait l'ionisation des molécules d'acides forts et des bases diminuant ainsi l'absorption percutanée.

#### b. Coefficient de diffusion

La diffusion d'une molécule au travers une membrane vient déterminer la résistance qui oppose le milieu à sa migration. Cette résistance dépend fondamentalement des caractéristiques de la molécule pénétrante, des interactions possibles avec des molécules du véhicule ou de la membrane, de la viscosité et de la température du milieu. S'il est assumé que les molécules du pénétrant sont similaires entre elles en ce qui concerne la taille et qu'elles adoptent une conformation plus ou moins sphérique, le coefficient de diffusion, D, peut être estimé en appliquant la loi de Stokes-Einstein (Flynn, 1972):

$$D = \frac{KT}{6.\pi.r.\eta} \quad \text{Équation 1}$$

où K est la constante de Boltzman, T la température absolue, r le rayon de la molécule et  $\eta$  la viscosité du milieu.

Comme le démontrent les études réalisées par Marzulli, à partir de cette équation, on peut déduire qu'à mesure que la taille ou le poids moléculaire de la substance est augmenté, la diffusion aura lieu avec une plus grande difficulté (Marzulli, 1965). Cependant, cela n'est pas certain dans tous les cas puisqu'en général une augmentation du poids moléculaire se traduit par une augmentation du caractère lipophile de la molécule et c'est ce facteur qui a une plus grande influence dans la capacité de diffusion de la substance au travers une membrane. Les résultats obtenus par Scheuplein pour la série homologue des alcools aliphatiques en témoignent également (Scheuplein, 1973). D'un autre côté, les molécules qui ont des groupements polaires tels les stéroïdes anti-inflammatoires, peuvent former des enchaînements avec les composants de la membrane conduisant à l'obtention de constantes de diffusion faibles (Hadgraft, 1979).

c. Coefficient de distribution

Le caractère lipophile d'un composé est un facteur éminent dans l'absorption transdermique. À l'heure d'établir des corrélations entre absorption et lipophilie, l'affinité relative qu'un soluté présente pour le milieu aqueux qui l'entoure et la membrane cutanée marque son passage au travers de la peau (Beetge, 2000). Pour la détermination du coefficient de distribution (P), on a recourt à un système biphasé, de façon à ce que:

$$P=Cd/Ca \quad \text{Équation 2}$$

où Cd et Ca sont les concentrations de la substance dans le solvant organique et dans l'eau, respectivement. Il existe des études qui démontrent que plus la lipophilie du composé est grande, plus grande sera sa perméabilité au travers de la peau (Cordero, 1997; Modamio, 2000). Cependant, un coefficient de distribution élevé n'est pas toujours indicateur d'une plus grande perméabilité puisque des substances hautement lipophiles peuvent s'accumuler dans le SC, ce qui complique l'absorption postérieure (Wepierre, 1967; Cross, 2003).

d. pH

Puisque beaucoup de médicaments sont des acides et des bases faibles, il est important de tenir compte de l'influence du pH. En effet, la proportion dans laquelle ils se trouvent ionisés dépend autant du pKa du composé que du pH du liquide biologique dans lequel se trouve le médicament (Grouthamel, 1971). On a pu observer que la forme non ionisée d'un médicament présente un plus grand coefficient de distribution lipides-eau que la forme correspondante ionisée. Ainsi, il faudrait atteindre une plus grande perméabilité dans le SC pour la fraction non ionisée. Or, la pénétration d'espèces ionisées au travers de la peau est possible ce qui empêche de la considérer négligeable (López, 1996).

e. Nature de la formulation

Un médicament est composé par un ou plusieurs principes actifs qui se trouvent intégrés dans une formulation comportant de nombreux ingrédients. La nature même de l'excipient joue un rôle dans la pénétration transcutanée. Certaines molécules comme l'éthanol, le DMSO (diméthylsulfoxyde) et l'eau favorisent l'absorption percutanée. Un excipient au pH acide, favorisant l'ionisation, diminuera la pénétration des molécules qu'il contient. Le véhicule est une forme de transport du principe actif étant donné que ce dernier n'est jamais appliqué directement, c'est-à-dire de façon pure sur la peau. Les ingrédients accompagnant un principe actif peuvent être inactifs ou jouer un rôle actif tel que faciliter la pénétration. Le véhicule idéal doit répondre à un certain nombre de critères. Entre autres il doit être:

- facile à appliquer et à enlever
- non toxique, non irritant, non allergénique
- chimiquement stable
- empêcher le développement des bactéries
- acceptable sur le plan cosmétique
- ne pas avoir d'actions pharmacologiques
- faciliter le passage transdermique du médicament (Surber, 2000)

Différents types de formulations et excipients existent:

-Poudre: Système galénique constitué de particules solides. Les poudres possèdent des pouvoirs lubrifiants, antiseptiques et desséchants.

-Suspension: Système galénique fluide dans lequel le principe actif ou certains adjuvants ne sont pas solubilisés. Lorsque la consistance du produit est semi-solide, on parle de pâte.

-Pâte: Système galénique semi-solide contenant une proportion élevée de poudre (> 10 %). Les pâtes ont des propriétés absorbantes, émoullientes et protectrices.

-Gel: Système galénique transparent à phase unique dont la consistance est obtenue par addition de polymères. Il existe des gels aqueux, huileux et alcoolisés.

-Pommade: Système galénique à phase unique, semi-solide et anhydre dans lequel le principe actif est dissout ou dispersé. Il existe des pommades hydrophiles (mélange de polyéthylène glycol) et lipophiles (vaseline).

-Émulsion: Système galénique à deux phases non miscibles, aqueuse et huileuse, dont la stabilité est assurée par des émulsifiants. Les dénominations lait, lotion ou crème sont fonction de la consistance du produit.

f. Modulation de l'absorption percutanée en fonction du véhicule

L'effet pharmacologique est obtenu quand le principe actif est libéré de son véhicule puis pénètre dans la peau. Cependant, lorsqu'une action à la surface de la peau est recherchée, la formulation doit retenir les molécules actives au niveau du SC en les empêchant de pénétrer en profondeur. Le véhicule a un rôle important sur ces différentes étapes et la profondeur de l'action percutanée peut être modulée grâce à son optimisation. Additionnellement à la régulation de la pénétration du principe actif par l'utilisation de différents véhicules, on peut aussi incorporer des substances chimiques pour améliorer la pénétration en modifiant la structure du SC. Ces substances peuvent modifier le SC par fluidisation, altération de la polarité, séparation de phases, ou extraction lipidique. D'autres substances plus puissantes peuvent agir sur les desmosomes ou sur d'autres structures protéiques pour dénaturiser la kératine ou former des vacuoles dans les cornéocytes (figure 6).

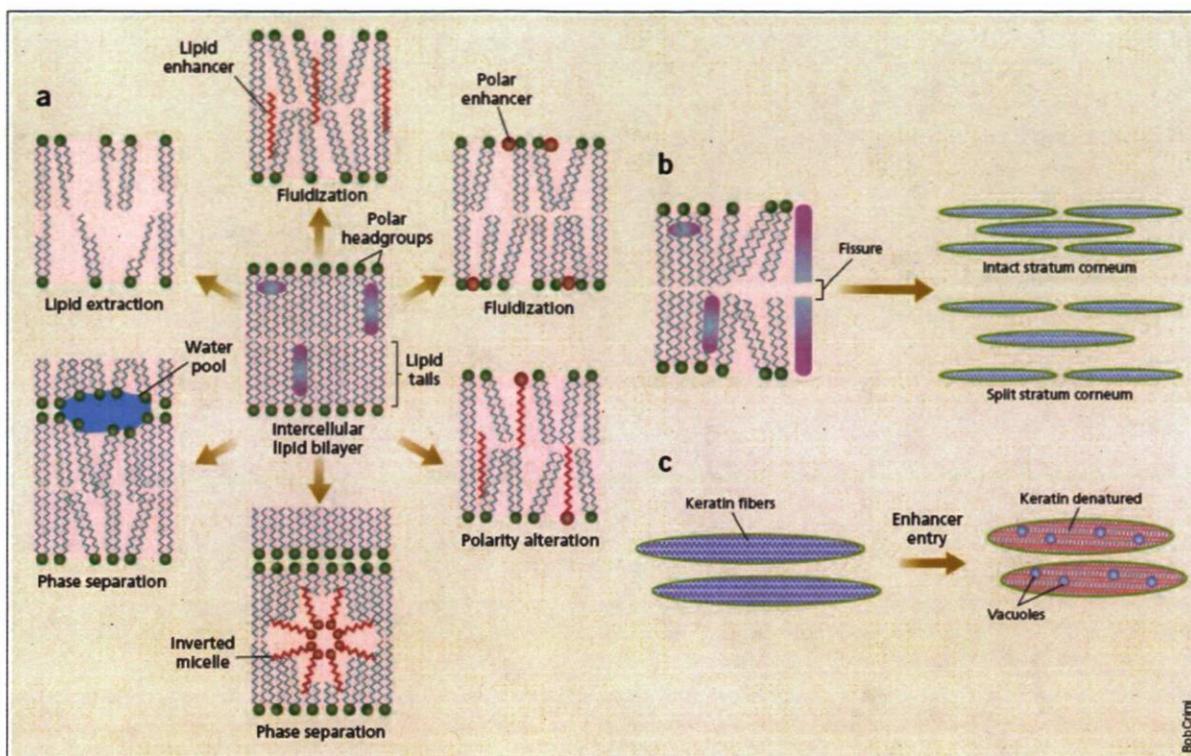


Figure 6: La modification du SC permettant d'améliorer la pénétration percutanée

(Tirée de: Barry, 2004).

Pour améliorer l'absorption percutanée plusieurs substances utilisent différents processus de pénétration en combinaison. La complexité de ces interactions dans un tissu biologique nécessite des prédictions *in silico* et plusieurs études de pénétration cutanée avant que ne puissent être incorporées toutes ces substances dans le développement de formulations.

### 1.2.5 Mécanismes de l'absorption percutanée

La loi de Fick qui régit de façon générale le passage d'une substance à travers une membrane peut être transposée à la peau. Elle permet de prédire les quantités absorbées ( $Q$ ) en fonction de la concentration ( $C$ ) par la formule:

$$Q = K_p \times F \times t \times C \quad \text{Équation 3}$$

où  $F$  est la surface d'application,  $t$  le temps d'application et  $K_p$ , le coefficient de perméabilité.  $K_p$  est défini par le produit du coefficient de partage ( $K_m$ ), du coefficient de diffusion ( $D$ ) au sein du  $SC$ , divisé par  $e$ , l'épaisseur de  $SC$ :

$$K_p = \frac{K_m \times D}{e} \quad \text{Équation 4}$$

Pour calculer  $K_p$ , il importe donc de connaître  $D$ , qui est spécifique à la molécule et  $K_m$  qui est aussi spécifique à la molécule mais également à l'excipient. L'utilisation de cette équation est purement théorique.

La pénétration d'une molécule peut être exprimée en pourcentage de la dose appliquée. Cela n'est possible que lorsqu'on se trouve dans la situation dite de dose finie, où tout ce qui a été déposé sur la peau a été utilisé et lorsque le flux d'absorption a donc été réduit jusqu'à s'annuler. Le pourcentage d'absorption n'est bien entendu valable que pour une formulation caractérisée par la concentration en principes actifs, les caractéristiques de l'excipient, etc., et ne peut être appliqué à des formulations différentes. On donne classiquement un pourcentage d'absorption de la cortisone de 3 %, de l'hydrocortisone de 2 %, de la bétaméthasone de 0,7 %. Des molécules comme la caféine ou l'acide benzoïque ont des pourcentages maximaux d'absorption (d'une dose unique) de plus de 40 %.

### 1.2.6 Métabolisme des médicaments dans la peau

Jusqu'à la moitié des années soixante-dix, le  $SC$  était considéré comme métaboliquement inactif, un tissu homogène pareil à un film en plastique (Scheuplein, 1971). Au cours des trente années qui ont suivi, les scientifiques ont montré que ce tissu était structurellement diversifié et biochimiquement actif et ne pouvait être traité comme inerte. Le  $SC$  possède une activité métabolique et, en effet, agit comme un biosenseur sophistiqué qui envoie des signaux à l'épiderme viable, pour répondre à des stress externes (Harding, 2004).

L'épiderme viable contient une variété de systèmes enzymatiques capables de métaboliser des médicaments qui atteignent ce compartiment, y compris les CYPs, l'époxyde hydrolase,

les transférases comme les N-acétyl-transférases et diverses autres enzymes incluant les glucuronyl transférases et les sulfatases (Baron, 2001). Par exemple, l'isoforme spécifique CYP26A1 métabolise l'acide rétinoïque et peut contrôler son niveau dans la peau (White, 1997; Baron, 2001). Ainsi, les réactions de biotransformation comprennent des réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de conjugaison avec l'acide glucuronique, l'acide sulfurique et le glutathion en plus des réactions de méthylation. Le spectre des réactions métaboliques qui se déroulent au sein de la peau est comparable d'un point de vue qualitatif, mais non quantitatif, à celui que l'on observe au niveau hépatique (Täuber, 1989). Or, un médicament passant au travers de la peau pourra soit: être activé par ce métabolisme, être métabolisé en une drogue inactive ou ne pas être métabolisé.

### **1.3 Méthodes d'étude de l'absorption percutanée**

Les méthodes pour mesurer l'absorption et la libération dermique dans la peau peuvent être divisées en deux catégories: *In vivo* et *in vitro*.

#### **1.3.1 Méthodes *in vivo* pour l'étude de l'absorption percutanée**

Les méthodes *in vivo* sont celles qui utilisent des animaux. Parmi leurs avantages, on trouve la génération de cinétiques systémiques, des informations métaboliques et des taux plasmatiques d'une substance si les méthodes analytiques le permettent. Aussi, la méthode du «tape stripping» (l'arrachement du SC) consiste à mesurer les concentrations du principe actif au sein de ces couches et d'en prédire les quantités absorbées.

Quant aux inconvénients, ils sont nombreux; l'utilisation d'animaux vivants, le besoin de matériel radiomarqué, des difficultés dans la détermination de la première phase de l'absorption et les différences de perméabilité entre l'espèce de préférence, le rat et la peau humaine. La peau animale est généralement plus perméable et peut donc surestimer l'absorption percutanée chez l'homme.

### 1.3.2 Méthodes *in vitro* pour l'étude de l'absorption percutanée

La méthode *in vitro* a été décrite en détails dans un certain nombre de monographies (Kemppainen B.W, 1990; Bronaugh, 1991; Chemicals, 1993; Diembeck W, 1999; Howes D, 1996; Schaefer, 1996; Roberts, 1998; Franz, 1975); et va comme suit: la préparation à essayer est appliquée à la surface de la peau excisée, elle-même montée sur une cellule à diffusion. Le liquide récepteur, qui doit avoir une capacité adéquate à solubiliser la substance d'essai est maintenu au contact de la peau dès le temps d'application et ce, jusqu'à la fin du prélèvement dans le compartiment récepteur. Ainsi, la préparation étudiée reste sur la peau pour une période de temps déterminée par l'expérimentateur.

Les échantillons prélevés du compartiment receveur, à des temps précis, permettent de vérifier la masse de la substance d'essai (incluant n'importe quel métabolite significatif) passant à travers la peau. À la fin de l'étude, la dose délogement, c'est-à-dire les quantités restantes dans la peau et celles trouvées dans le liquide récepteur sont mesurées. Ces données sont complémentaires et nécessaires pour calculer l'absorption totale de la substance dans la peau (OECD, 2003). Les cellules de diffusion sont utilisées depuis de nombreuses années pour évaluer la pénétration transcutanée d'une molécule. Ce modèle statique est amélioré en agitant la solution réceptrice au moyen d'un agitateur magnétique. Des prélèvements d'une faible quantité de liquide sont effectués à intervalles de temps réguliers, pour doser les concentrations recueillies. Les cellules dynamiques, dotées d'un système de renouvellement de la phase réceptrice ont une mise en œuvre plus compliquée que les cellules statiques et l'interprétation des concentrations mesurées est difficile en raison de la mauvaise définition de la phase réceptrice sans cesse renouvelée.



Figure 7: Cellules de Franz.

Les avantages de la méthode *in vitro* sont nombreux: elle peut être utilisée tout aussi bien avec de la peau humaine qu'avec de la peau d'autres espèces, plusieurs mesures peuvent être faites du même sujet ou de sujets différents, aucune expérimentation n'est réalisée sur l'animal de son vivant, les conditions d'étude peuvent être contrôlées, une gamme plus large de formes physiques peut être examinée (c'est-à-dire par exemple des formes solides ou granules), et enfin, l'impact des dommages à la peau peut être évalué. De plus, la méthode *in vitro* peut être utilisée avec des molécules non radiomarquées largement métabolisées. Par contre, une des limites associées à une approche *in vitro* vient du fait que le flux sanguin périphérique ne peut pas être entièrement reproduit. Cependant, l'absorption dans la peau est principalement un processus passif qui peut être étudié *in vitro* en utilisant des conditions expérimentales appropriées. Plusieurs données ont déjà été répertoriées pour un nombre important de produits chimiques et viennent confirmer l'utilité de cette méthode (Bronaugh, 1982; Scott, 1987; Bronaugh, 1986; Scott, 1991). La peau de beaucoup d'espèces de mammifères, incluant la peau humaine, peut être utilisée. La littérature présente plusieurs références où l'absorption entre différentes espèces et régions de peau différentes est discutée (Bronaugh, 1991; Schaefer, 1996; Scott, 1991).

## **1.4 Psoriasis**

Le psoriasis est une maladie d'étiologie inconnue qui affecte 2 % de la population mondiale (Ben-Shabat, 2005; Langley, 2005). On voit généralement le psoriasis chez de jeunes adultes ou ceux d'un certain âge, mais rarement chez de jeunes enfants. Le psoriasis est une maladie chronique qui peut se prolonger la vie durant. Le psoriasis typique consiste en des plaques de peau rouge bien définies avec une échelle argentée qui aboutit souvent au saignement des pointes lorsqu'enlevées. Les sites les plus communs et persistants sont les coudes, les genoux et le cuir chevelu, mais n'importe quel secteur de la peau peut être impliqué, y compris les paumes et la plante des pieds, menant à une morbidité significative voire même à l'incapacité. Il y a un certain nombre de modes de traitements tant locaux que systémiques pour le psoriasis. Chaque patient exige un traitement individuel basé sur le concept que cela ne devrait pas être plus mauvais que la maladie en termes de: malaise, fait d'être laid ou complications médicales potentielles, dépenses et temps investi (Dubertret, 2001; Cross, 2003; Lebwohl, 2005; Krueger, 2005; Nielsen, 2005; Ben-Shabat, 2005).

### **1.4.1 Histologie**

Le psoriasis se caractérise histologiquement par une hyperacanthose (hypertrophie de la couche de Malpighi de l'épiderme) et une hyperpapillomatose (allongement des crêtes de la couche basale de l'épithélium malpighien et des papilles dermiques qui les séparent) témoignant du renouvellement excessivement rapide de l'épiderme, associé à un trouble de la différenciation aboutissant à une parakératose (dermatose caractérisée par un trouble vers la couche cornée des cellules épidermiques) continue ou discontinue (Dubertret, 2001).

### **1.4.2 Facteurs déclenchants**

Il est possible d'identifier des facteurs responsables du déclenchement du psoriasis tels: changements de saisons, frottements cutanés et grattages qui déclenchent chez certains patients l'apparition de plaques psoriasiques (réalisant le classique phénomène de Köbner).

Ailleurs, la poussée sera provoquée par la prise d'un médicament (bêtabloquant, antipaludéen de synthèse, lithium) ou par l'arrêt rapide d'une corticothérapie générale

donnée pour une autre raison. Chez l'enfant, les infections streptococciques jouent un rôle important. Quelquefois, la poussée apparaîtra à la suite d'une toxidermie ou d'un eczéma de contact. Le rôle du stress est important chez 30 à 40 % des patients. De ce fait, il est fréquent d'observer l'apparition d'un psoriasis après un deuil ou lors d'une situation conflictuelle qui ne parvient pas à s'extérioriser (Dubertret, 2001).

### 1.4.3 Physiopathologie

Le psoriasis est une affection à composante génétique dont la révélation et les poussées sont provoquées par des facteurs de l'environnement et entretenues par une réaction inflammatoire chronique. Cette pathologie est associée à une atteinte familiale dans 30 à 40 % des cas. Chez les jumeaux, l'atteinte de l'un s'accompagne dans près de 70 % des cas de l'atteinte de l'autre, ce qui souligne tout à la fois l'existence d'un terrain génétique et l'importance de l'environnement (Farber, 1974; Brandrup, 1982). L'étude de grandes familles psoriasiques a permis de repérer des régions chromosomiques associées à la maladie. Ces régions ne sont pas les mêmes d'une famille à l'autre, mais trois régions ont été identifiées avec une certaine fréquence par différentes équipes (*Psoriasis susceptibility 1* –PSORS 1: chromosome 6p; PSORS 2: chromosome 17q; PSORS 3: chromosome 4) (Horton, 2004; Tomfohrde, 1994; Gudjonsson, 2007).

La maladie est une cicatrisation qui n'en finit pas. En effet, l'agression de la couche cornée de la peau normale provoque l'activation de protéases dans les kératinocytes de la région sous cornée et cette dernière aboutit, par des mécanismes inconnus, à une augmentation de la prolifération des kératinocytes de la couche basale. L'activation de ces protéases par les agressions épidermiques superficielles est inhibée beaucoup plus tardivement chez les psoriasiques que chez les sujets normaux. Lorsque cette activité n'est pas inhibée, on voit apparaître une plaque de psoriasis clinique et histologique. Ces protéases sous cornées sont activées en permanence dans toutes les plaques de psoriasis. Tout se passe donc comme si le psoriasis résultait d'un défaut d'inhibition de la cicatrisation épidermique, aboutissant à une prolifération permanente et entretenue par une inflammation secondaire.

Le psoriasis résulte aussi d'une anomalie au niveau des interactions entre le derme et l'épiderme: les fibroblastes psoriasiques, pris aussi bien dans les lésions qu'en dehors des lésions, sont capables d'entraîner une hyperprolifération des kératinocytes normaux (Saiag, 1985; Krueger, 1997). Les molécules responsables de ce phénomène sont en cours d'identification. Il existe dans le sérum des patients psoriasiques des molécules non identifiées capables d'accentuer ce phénomène. La greffe sur la souris immunodéficiente de peaux non lésées et lésées de patients psoriasiques et de peaux de sujets normaux montre que l'hyperprolifération épidermique psoriasique persiste après la greffe, même en l'absence de toute cellule inflammatoire. Cette anomalie épidermique ne s'exprime pas et ne persiste qu'en présence de cellules dermiques (Sugai, 1998; Briggaman, 1980).

Cette pathologie est entretenue par les polynucléaires neutrophiles. Ces derniers sont attirés sous la couche cornée psoriasique par des substances chimiotactiques nombreuses, activées localement. La libération des enzymes lysosomiales des polynucléaires neutrophiles déclenche des dégâts importants sous la couche cornée, réalisant un véritable *stripping* permanent qui active la prolifération épidermique. Cette inflammation sous cornée peut donc entretenir la maladie. Une aplasie entraîne d'ailleurs une disparition momentanée des lésions. Le psoriasis est une maladie auto-immune puisqu'il a été parfaitement démontré que les lymphocytes T jouaient un rôle majeur dans l'entretien de cette dernière. Elle serait également de nature psychosomatique. La symétrie des plaques, la relation évidente de certaines poussées avec le stress et la découverte du rôle majeur des neuromédiateurs dans le contrôle de l'homéostasie cutanée font suspecter un rôle important du système nerveux dans la localisation des plaques et le contrôle des poussées.

## **1.5 Psoriasis et absorption percutanée**

La fonction barrière réduite de la peau est observée pour un certain nombre de conditions pathologiques incluant l'ichtyose (Bodin, 2001; Riviere, 1992; Oestmann, 1993; Williams, 1993), le psoriasis (Monteiro-Riviere, 1990; Riviere, 1991; Imokawa, 1991; Werner, 1985; Blank, 1964), la dermatite atopique et la dermatite de contact. Il est généralement admis que cela peut être attribué aux changements structuraux du SC (Schaefer, 1996). Ces

derniers peuvent résulter de l'abrasion, l'extraction de lipides par des solvants ou des détergents forts, l'exposition aux liquides alcalins ou acides puissants, l'absence d'une enzyme ou d'une protéine structurelle dans les tissus viables sous-jacents ou peuvent être rapprochés de la formation incorrecte du SC résultant d'une augmentation de la prolifération des kératinocytes (Pedersen, 2004; Lavrijsen, 1993), comme dans le cas du psoriasis.

Tableau 2: Excrétion de triamcinolone acétonide dans l'urine après application topique sur peaux psoriasique et normale

SECTEUR DE PEAU	PREPARATION APPLIQUÉE	EXCRÉTION (%)	TEMPS (H)
PEAU PSORIASIQUE NON LÉSIONNELLE	0.1% CREME	0.4	72
PEAU PSORIASIQUE LÉSIONNELLE	0.1% CREME	4.3	72
PEAU SAINE	0.1% CREME	1.4	72

(Tiré de: Schaefer, 2004).

Dans le psoriasis, la formation de la couche cornée est dérangée et le flux d'eau est augmenté (Motta, 1994). Le groupe de Motta a examiné trois caractéristiques:

1. La perte d'eau transépidermique de la peau non lésionnelle et lésionnelle
2. L'extraction des lipides provenant de plaques psoriasiques
3. La distribution de céramides dans les plaques psoriasiques comparativement à celle trouvée au sein de SC normaux

Les résultats biochimiques concernant les lipides ont été comparés aux taux de perte d'eau transépidermique au sein des mêmes lésions. Pour évaluer le changement potentiel dans la distribution des céramides, les lipides, tant de la plaque psoriasique que du SC normal, ont été extraits par la méthode de Bligh-Dyer, séparés par HPLC et évalués quantitativement par densitométrie informatisée. Le flux d'eau a été mesuré comme la perte d'eau transépidermique en utilisant un évaporimètre. Les résultats entre la peau non lésionnelle ou lésionnelle psoriasique et la peau contrôle d'âge apparié ont été statistiquement évalués. En

comparaison avec le SC normal, les plaques psoriasiques ont montré des quantités significativement diminuées en céramides 1 (Motta, 1994). Les valeurs de perte d'eau transépidermique de plaques psoriasiques en comparaison à la peau contrôle et celles entre la peau psoriasique lésionnelle en comparaison à la peau non lésionnelle étaient significatives. Enfin, il a été démontré que dans le psoriasis, la distribution des céramides est changée et peut être liée spécifiquement à un défaut survenant au cours de la différenciation des kératinocytes (Motta, 1994).

Dans le travail de Ghadially et *coll.* l'homéostasie de la fonction barrière a été, tant fonctionnellement que structurellement, davantage perturbée dans une peau présentant un psoriasis érythrodermique et en plaque actif que dans celle présentant un psoriasis de plaque chronique et sebopsoriasique (tableau 3). Ainsi, les mécanismes connus de réparation de la barrière, qui comprennent la production de corps lamellaires et la formation d'une bicouche extracellulaire ont probablement des anomalies qui se traduisent par une fonction barrière défectueuse (tableau 4). Ces découvertes sont compatibles avec l'hypothèse que tous les deux, l'apparition initiale du psoriasis (le phénomène Koebner) et le changement du phénotype de la maladie conduisent à des changements dans la fonction barrière (Ghadially, 1996).

Tableau 3: Anomalies dans la fonction barrière par rapport à la sévérité du phénotype psoriasique

	Involved Skin TEWL (g/m <sup>2</sup> /h)	Significance	Uninvolved Skin TEWL (g/m <sup>2</sup> /h)
Erythroderma (n = 3)	36.4 ± 2.26 p ≤ 0.005	p ≤ 0.001	3.5 ± 1.0
Active Plaque (n = 8)	16.1 ± 0.97 p ≤ 0.005	p ≤ 0.001	3.9 ± 0.4
Chronic Plaque (n = 12)	9.0 ± 1.9	p < 0.05	4.1 ± 0.5
Normal (n = 8)			4.8 ± 0.4

(Tiré de Ghadially, 1996).

Dans ce travail (Ghadially et *coll.*), la perte d'eau transépidermique (TEWL) a été mesurée chez des patients ayant différents phénotypes du psoriasis. Les mesures ont été prises de régions affectées et d'une région adjacente de peau non lésionnelle. Le phénotype le plus sévère (érythrodermique) a montré le plus haut TEWL, approximativement dix fois plus que la peau non lésionnelle. Les résultats sont présentés comme étant la moyenne  $\pm$  SEM.

Tableau 4: Nombre de corps lamellaires selon le type de psoriasis

Case #:	Erythroderma					Active Plaque			Chronic Plaque								Sebopsoriasis
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8	1
Lamellar Body # (↑↑, ↑, N)	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑	N	N	N	N	↑	N	N	N	N
Lamellar Body Structure	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Size	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

(Tiré de Ghadially, 1996).

Le phénotype psoriasique le plus sévère (érythrodermique) montre des corps lamellaires normaux en nombre considérablement accru ce qui suggère une tentative, qu'a l'épiderme, de réparer la fonction barrière. ↑↑, considérablement accrue; ↑, modérément accrue; N, normal.

## 1.6 Modèles animaux du psoriasis

Généralement, le psoriasis ne se présente pas que chez l'homme mais le manque de modèles animaux adéquats a de grandes répercussions dans la recherche de la pathogenèse de cette maladie (Gudjonsson, 2007). Au cours des vingt dernières années, différents modèles transgéniques et reconstruits du psoriasis ont été développés (Barker, 2004). Malgré leurs limites, ces derniers ont démontré que dans la peau, l'hyperplasie de kératinocytes, l'hyperplasie vasculaire et l'immunité régulée par les cellules sont en étroite corrélation. Les modèles de peaux psoriasiques lésionnelles ou non lésionnelles, greffés sur des souris immunodéficientes sont les seuls modèles qui incorporent la génétique, l'immunologie et les changements phénotypiques de la maladie.

Il y a différents inconvénients dans l'utilisation des souris en tant que modèle animal. Entre autres, nous pouvons nommer les suivants:

- L'épiderme de souris ne comprend généralement que 2 à 3 couches de kératinocytes qui représentent le quart de l'épaisseur de l'épiderme humain et présentent un renouvellement épidermique plus rapide (Berking, 2002).
- Le derme humain est plus épais que le derme de souris et contient moins de follicules pileux.
- La régénération de blessures dans la souris se présente sans formation de cicatrices hypertrophiques (Khavari, 2006).
- Le système immunitaire est différent entre la souris et l'homme (Godfrey, 2000).

## 1.7 Génie tissulaire

Les modèles de culture cellulaire pour la reconstruction de tissus et d'organes sont des outils développés grâce à la recherche fondamentale et qui aident à mieux comprendre les fonctions du corps. Ils sont destinés à simplifier les procédures expérimentales pour mieux comprendre les phénomènes biologiques et par conséquent, quand ils sont suffisamment caractérisés, peuvent aussi être utilisés pour la recherche appliquée (Poumay, 2007).

Dans la biologie de la peau et ses multiples pathologies, le développement des cultures de kératinocytes en monocouches a permis d'élucider la plupart des caractéristiques fonctionnelles et structurelles de ce type cellulaire. Les modèles plus sophistiqués, créés pour reconstruire entièrement l'épiderme différencié, ont suivi les cultures en monocouches. La reconstruction épidermique par génie tissulaire produit toutes les couches typiques trouvées *in vivo* et rend le modèle plus sophistiqué en permettant l'étude de la différenciation des kératinocytes et la production de la couche cornée. En plus de son intérêt pour la recherche fondamentale, l'épiderme reconstruit offre actuellement beaucoup d'intérêt pour la recherche appliquée, particulièrement en tant qu'alternative à l'utilisation d'animaux de laboratoire au sein des industries chimique, pharmaceutique et cosmétique

(Poumay, 2007). Ainsi, la plupart des études de l'épiderme via des modèles de culture cellulaire ont été développées pour répondre aux questions de base sur la production, la maintenance, la fonctionnalité et la réparation de la barrière épidermique.

Au niveau des études *in vitro*, différents protocoles ont été développés en utilisant des échantillons de peaux humaines ou animales (Hadgraft, 2001) et adoptés dans les directives 428 de l'organisation de coopération et de développement économiques (OCDE, 2004). Cependant, pour des raisons légales et éthiques, l'utilisation d'une telle sorte d'échantillons est souvent limitée. De plus, la pertinence des conclusions provenant de données animales pour la peau humaine est toujours douteuse. Donc, l'OCDE suggère des études d'absorption percutanée utilisant des modèles de peau humaine reconstruite lorsque l'équivalence des données est prouvée (OCDE, 2003).

Au niveau des applications cliniques de peaux reconstruites par génie tissulaire, on retrouve les ulcères veineux et diabétiques des pieds, les brûlures, les blessures post-chirurgicales et post-traumatiques. Ainsi, le but premier d'une peau reconstruite est de réaliser rapidement la fermeture complète des blessures et de rétablir les fonctions de la peau normale. Pour réaliser cela, la peau reconstruite doit fournir une fonction barrière afin d'empêcher la perte d'eau transépidermique et les infections (Johnson, 2000).

Au cours des 30 à 40 dernières années, des modèles *in vitro* ont été développés dans plusieurs laboratoires de recherche et les modèles de peau sont devenus progressivement disponibles auprès de différentes sociétés commerciales (Faller, 2002). Les modèles *in vitro* ont comme avantages d'empêcher le recrutement de volontaires pour une étude spécifique et réduisent aussi le nombre d'animaux de laboratoire utilisés. De plus, ces modèles permettent une séparation claire entre les composantes cellulaires cutanées qui peuvent ainsi être analysées individuellement.

Plus récemment, certains modèles ont été commercialisés et sont connus sous les noms suivants: EpiSkin, SkinEthic et EpiDerm. Ces derniers montrent des similitudes raisonnables au tissu humain *in vivo* en termes de morphologie, composition en lipides et

marqueurs biochimiques. Ces modèles ont été identifiés en tant qu'outils utiles pour l'étude de la phototoxicité, de la corrosivité et de l'irritation. Des protocoles d'essai ont été développés en vue de telles applications. Pour l'acceptation de ces essais par les autorités, les études de validation sont actuellement en cours. Les premiers résultats indiquent leur convenance pour les expériences de transport des molécules et de tout autre xénobiotique à travers la peau. Cependant, la fonction barrière de ces modèles humains d'épidermes reconstruits semble être beaucoup moins développée que celle d'une peau normale *in vivo*. Perfectionner les modèles d'épidermes humains, particulièrement au niveau de la fonction barrière, demeure donc un défi important dans ce domaine de recherche (Netzlaff, 2005).

Les modèles ont aussi été utilisés afin de valider leur pertinence pour des études toxicologiques et pharmacologiques cutanées (Netzlaff, 2005). En effet, ils présentent une différenciation semblable à l'épiderme normal humain *in vivo* et représentent des modèles reproductibles dans un environnement contrôlé (Ponec, 2000). Par conséquent, des facteurs qui pouvaient influencer les résultats finaux comme la variabilité de la source de la peau (donneurs) ou les différents sites anatomiques du corps sont ainsi éliminés. Cependant, il n'y a pas encore de modèle idéal. Chaque modèle a ses avantages particuliers et certaines limites persistent toujours empêchant ainsi une utilisation généralisée.

Reconstruire l'épiderme *in vitro* pour l'analyse de ses différents composants afin d'identifier et de comprendre son comportement dans un environnement normal ou sous d'autres conditions représente toujours un défi. Toutefois, les progrès réalisés dans ce domaine, parallèlement à ceux de la biologie cellulaire, ont permis des analyses détaillées de chacun des composants isolés démontrant ainsi leur contribution respective à la fonction du tissu complet (Poumay, 2007). Dans la reconstruction de la peau, les modèles simples donnent des réponses aux questions posées sur le fonctionnement de l'épiderme et de ses composantes. Les modèles plus sophistiqués cherchent à comprendre la fonction principale de l'épiderme, sa fonction barrière et selon le chercheur Poumay, une course est maintenant enclenchée afin de déterminer qui mettra au point le meilleur modèle (Poumay, 2007). En général, le plus grand défi pour tous les laboratoires de génie tissulaire est de garantir la

reproductibilité du modèle, d'en comprendre toutes les caractéristiques et de pouvoir assurer sa permanence sur le marché (Poumay, 2007).

### 1.7.1 Génie tissulaire et psoriasis

La recherche sur le psoriasis et par conséquent le développement des stratégies thérapeutiques ont été gênés par l'absence de modèles appropriés de la maladie. La souris immunodéficiente (SCID) a été employée comme modèle *in vivo*, où les plaques psoriasiques transplantées sur l'animal ont maintenu les caractéristiques cliniques, histologiques et immunologiques de la maladie pendant un temps suffisant permettant d'évaluer l'efficacité de composés thérapeutiques potentiels (Raychaudhuri, 2001). Cependant, les modèles animaux peuvent devenir inadéquats en raison de différences allogéniques pouvant causer des réponses immunes différentes. Diverses tentatives pour modéliser des aspects de la maladie *in vitro* ont été rapportées en utilisant les cultures en monocouche de kératinocytes stratifiés (Saiag, 1985; Chapman, 1990; Mils, 1994; Van Ruissen, 1996; Van Ruissen, 1996). Quelques études précédentes ont démontré l'importance de l'interférence entre les kératinocytes et les fibroblastes en modélisant la maladie *in vitro* (Krueger, 1990; Konstantinova, 1996). Les études décrites par Barker en 2004 ont été effectuées pour comparer la prolifération et l'expression de gènes dans des modèles de peau dérivés de cellules normales à celles dérivées de cellules psoriasiques lésionnelles et non lésionnelles, dans le but de développer un modèle de peau psoriasique *in vitro* qui pourrait être employé comme outil valable dans la recherche fondamentale et la découverte de médicaments (Barker, 2004). Cette étude a démontré que la reconstruction de la peau à partir de donneurs psoriasiques donne un système de culture permettant à beaucoup de gènes d'être exprimés. Les conditions de culture optimisées ont permis de mettre en évidence des différences importantes entre les cellules normales et psoriasiques maintenues en culture.

Les modèles soutiennent l'hypothèse que les kératinocytes et les fibroblastes des individus souffrant du psoriasis possèdent des différences inhérentes comparativement à des individus normaux, contribuant ainsi au phénotype de la maladie. Les modèles développés précédemment ont pu fournir un point de départ pour étudier les mécanismes de la

croissance de kératinocytes et l'expression anormale de gènes dans le psoriasis. Les tableaux 5 et 6 présentent les matériaux utilisés ainsi que les avantages et inconvénients pour différents types de substituts de peau créés par génie tissulaire.

Tableau 5: Différents types de substituts de peau créés par génie tissulaire

Product name	Company	Materials	
		Epidermis	Dermis
Epicel <sup>32</sup>	Genzyme tissue repair	Living cultured autologous keratinocytes	None
Alloderm <sup>44,45</sup>	Life cell	None	Salt processed, human cadaveric skin with acellular dermis
Integra <sup>46,47</sup>	Integra life sciences	Silastic membrane	Bovine tendon collagen and shark glycosaminoglycan
Dermagraft-TC <sup>49</sup>	Advanced tissue sciences	Silicone polymer	Nylon-mesh with non-viable cultured foreskin-derived dermal fibroblasts and their products
Dermagraft <sup>48</sup>	Advanced tissue sciences	None	Living human neonatal foreskin-derived dermal fibroblasts on a bioabsorbable polyglactin mesh without silastic layer
Apligraf <sup>50</sup>	Organogenesis	Living human neonatal foreskin-derived keratinocytes	Living human neonatal foreskin-derived dermal fibroblasts and bovine tendon-derived collagen plus the fibroblast-produced matrix and growth factors

(Tiré de: Lee, 2000).

Tableau 6: Avantages et inconvénients reliés aux différents modèles de substituts cutanés créés par génie tissulaire.

Product name	Type	Advantages	Disadvantages
Epicel <sup>32</sup>	Epidermal Autograft	Coverage of large areas; permanent wound coverage; minimal risk of disease transmission	2-3 wks intervals for cultivation; fragile, difficult to handle
Alloderm <sup>44,45</sup>	Dermal Allograft	Immediate wound coverage; no immunological reaction	Allograft supply, preservation; virus screening; two steps procedure
Integra <sup>46,47</sup>	Dermal Replacement	Immediate wound coverage; allow ultra-thin split-thickness skin autografts	Complete wound excision; two steps procedure; susceptible to infection
Dermagraft <sup>48</sup>	Dermal Replacement	Immediate availability	Multiple applications
Apligraf <sup>50-54</sup>	Composite graft	Immediate availability; single step (no requirement for subsequent skin grafting); easy handling	Limited viability

(Tiré de: Lee, 2000).

Comme nous pouvons le constater à la lecture des deux derniers tableaux, l'utilisation des substituts cutanés en vue d'applications cliniques présente encore certaines lacunes et quelques limites. En ce qui concerne la recherche fondamentale, leur utilisation y est très

valorisée et en fait des outils plus qu'intéressants pour une meilleure compréhension de la physiologie de la peau normale humaine ainsi que pathologique.

Dans une étude réalisée par Schmook et *coll.*, les auteurs ont comparé les propriétés de pénétration de la peau humaine, de la peau de cochon et de la peau de rat avec des modèles de peau reconstruite Graftskin® LSE® (équivalent de peau vivante) et SkinEthic® HRE (épiderme humain reconstruit) en évaluant quatre (4) molécules reconnues pour une utilisation dermatologique au niveau topique (l'acide salicylique, l'hydrocortisone, le clotrimazole et la terbinafine). Les molécules qu'ils ont utilisées ont différentes caractéristiques de polarité. Ci-après, le résumé des résultats qu'ils ont obtenus (Schmook, 2001):

Tableau 7: Comparaison de l'efficacité barrière de deux modèles de substituts cutanés en utilisant différentes molécules

<b>MOLÉCULE</b>	<b>Graftskin® LSE® Qualité de la barrière cutanée</b>	<b>SkinEthic® Qualité de la barrière cutanée</b>
Acide salicylique	Adéquate	Perméable  (les concentrations observées ont été similaires à celles obtenues avec la peau humaine; un flux 7 fois supérieur)
Hydrocortisone	Très perméable	Très perméable
Clotrimazole	Très perméable  (un flux 900 fois plus grand et 50 fois plus concentré, que ce qui est observé avec la peau humaine)	(Une perméabilité d'un facteur 800 fois plus grand que pour une peau normale humaine)
Terbinafine	Très perméable	

(Adapté de: Schmook, 2001)

La conclusion de ce travail est que les modèles de peau reconstruite, qui sont actuellement disponibles, ne peuvent pas être vus, en général, comme étant très représentatifs de ce qui

est obtenu pour une peau normale humaine lors d'études de pénétration *in vitro* (Schmook, 2001).

Tableau 8: Caractérisations morphologiques de différents modèles de peau reconstruite

Model	EpiDerm irritation model (EPI-200-F)	EpiDerm penetration model (EPI-606A)	Episkin irritation model	Episkin penetration model	SkinEthic Irritation penetration models	RE-DED	Native skin
<i>Tissue architecture</i>							
Stratification	All epidermal strata (SB,SS SG, SC)	All epidermal strata (SB, SS SG, SC)	All epidermal strata (SB, SS, SG, SC)	All epidermal strata SB,SS SG, SC)	All epidermai Strata (SB, SS SG, SC)	All epidermal strata (SB, SS SG, SC)	All epidemiai strata (SB, SS, SG, SC)
Number of viable cell layers	7-14	6-8	7-10	7	5-9	6-10	7-12
Epidermal thickness, um	83-100	28-43	24-69	38-48	23-59	40-60	80-90
<i>Basement membrane</i>							
Lamina densa/lucida	Patchy	Patchy	Patchy	Patchy	Patchy	Continuous	Continuous
Hemidesmosomes	Present in about 50% cultures	Present in about 50% cultures	Rare presence	Rare	Present	Present	Present
<i>Stratum basale</i>							
Cell shape	Columnar to round	Columnar to round	Round and irregular	Round and irregular	Columnar to Round	Columnar to round	Columnar
Intracellular lipid droplets	Present	Present	Present	Present	Occasionally present	Absent	Absent
Stratum spinosum							
Cell shape	Upper layers: cell flattening	Upper layers: cell flattening	Flat and irregular shape	Flat and irregular shape	Flat	Upper layers: cell flattening	Upper layers: cell flattening
Intracellular lipid droplets	Occasionally present	Absent	Absent				
<i>Stratum granulosum</i>							
Lammelar bodies	Normal, numerous	Normal, numerous	Normal, numerous				
Keratohyalin granules	Stellate and rounded	Stellate and rounded	Rounded and enlarged	Rounded and enlarged	Stellate and rounded	Stellate	Stellate
<i>Stratum corneum</i>							
Number of SC cell layers	16-25	16-25	15-24	60-100	14-24	15-20	15-20
SC thickness, um	12-28	12-28	17-37	73-102	15-32	14-17	10-12
Arrangement of SC layers	Loosely packed	Loosely packed	Densely packed	Densely packed	Densely packed in Some cultures	Loosely packed	Loosely packed
Lamellar body extrusión at SG/SC interface	Complete, rapid	Complete, rapid	Retarded; occasionally LB present in upper SC	Retarded; occasionally LB present in upper SC	Retarded in some cultures	Complete, rapid	Complete, rapid
Intracorneocyte Lipid droplets	Occasionally present	Occasionally present	Regularly present	Regularly present	Regularly present	Absent	Absent
Interacellular lipid organization	Regular lamellar	Regular lamellar	Locally lamellar	Locally lamellar		Regular lamellar	Regular lamellar
Repeat distance of lamellar phase		12 nm				12 nm	6.4 and 13.4 nm
Crystalline cholesterol	Present	Present	Present	Present	Present	Present	Mostly absent

SB = Stratum basale; SS = stratum spinosum; SG = stratum granulosum; SC = stratum comeum; LB = lamellar body.

(Tiré de: Ponec, 2002).

L'un des critères les plus importants pour l'évaluation du fonctionnement de n'importe quel système de culture de peau *in vitro* est la formation d'une barrière protectrice compétente à la perméabilité étant donné que les composés appliqués au niveau topique passent premièrement par le SC avant d'agir sur les cellules viables. La conclusion de cette étude qui fait référence au tableau 8 est que tous les modèles de peau sont prometteurs ou adéquats pour étudier l'effet des substances chimiques appliquées topiquement, mais les déviations observées dans l'homéostasie des tissus et dans les propriétés de la fonction barrière doivent être améliorées (Ponec, 2002). Le tableau 9 permet d'apprécier les différences de perméabilité de certains modèles envers la caféine et la testostérone (Schäfer-Korting; 2006).

Tableau 9: Valeurs moyennes de perméabilité ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de différents modèles d'épidermes reconstruits commercialement disponibles comparées à celles trouvées pour des épidermes normaux de peaux humaine et animale

	<b>Épidermes humains</b> perméabilité ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	<b>Peaux murines</b> perméabilité ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	<b>SkinEthic</b> perméabilité ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	<b>EpiDerm</b> perméabilité ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	<b>EpiSkin</b> perméabilité ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
<b>Caféine</b>	1,12 +/- 1,18	0,48 +/- 0,41	73,65 +/- 36,58	4,87 +/- 2,67	51,25 +/- 9,84
<b>Testostérone</b>	0,32 +/- 0,27	0,07 +/- 0,15	4,47 +/- 0,57	2,36 +/- 0,90	1,53 +/- 0,47

(Adapté de Schäfer-Korting, 2006)

## 1.8 Problématique

Dans le but de tester de nouvelles formulations dermopharmaceutiques pour peaux malades, les tests *in vitro* emploient actuellement **de la peau normale humaine** qui ne présente pas les caractéristiques pathologiques des peaux d'individus qui utiliseront ces traitements, **de la peau animale saine** qui possède des caractéristiques et sentiers enzymatiques différents de la peau humaine et **des membranes artificielles** qui s'éloignent davantage des caractéristiques d'une peau humaine et malade et où aucun sentier enzymatique n'est possible. En plus, malgré tous les efforts scientifiques, aucun modèle animal n'affiche pour l'instant un développement certain et convenable du psoriasis et l'obtention d'échantillons de peaux psoriasiques, fraîche ou cadavérique congelée, est rare et très coûteuse.

## 1.9 Hypothèses et objectifs de recherche

### 1.9.1 Hypothèse générale

Les cellules psoriasiques isolées de patients malades conserveront, dans des conditions de culture adéquates, leurs caractéristiques pathologiques assez longtemps pour permettre de concevoir un tissu pathologique et de l'utiliser à des fins dermopharmacologiques.

### 1.9.2 Hypothèse spécifique

- Les substituts cutanés sains préparés selon la méthode d'auto-assemblage offriront une barrière cutanée similaire, sinon meilleure, que celle de substituts cutanés préparés à partir d'autres méthodes de génie tissulaire présentées dans la littérature.
- Les substituts psoriasiques présenteront une barrière cutanée qualitativement efficiente mais plus perméable que les autres types d'échantillons testés.

### **1.9.3 Objectif général**

Le but de notre étude a été de réaliser des tests d'absorption percutanée en utilisant des substituts sains et psoriasiques, préparés selon la méthode d'auto-assemblage, afin de comparer leur fonction barrière à celle de peaux normales humaine et de souris. Nous avons réalisé les expériences avec les différents types de substituts suivants:

- Fibroblastes sains et kératinocytes sains (contrôles)
- Fibroblastes psoriasiques et kératinocytes psoriasiques (différentes lignées cellulaires)

### **1.9.4 Objectifs spécifiques**

Évaluer et comparer la pénétration cutanée de différentes molécules radioactives, soit l'acide benzoïque, la caféine et l'hydrocortisone en utilisant des substituts sains et psoriasiques (deux lignées cellulaires différentes) à celles de peaux normales humaine et de souris.

## Chapitre 2 Matériel et méthodes

### 2.1 Lignées cellulaires

#### 2.1.1 Lignées saines

Pour créer les substituts sains, les cellules provenant de réductions mammaires et disponibles au sein de notre laboratoire, soit la lignée femme 21 ans pour les fibroblastes et la lignée femme 26 ans pour les kératinocytes, ont été choisies.

#### 2.1.2 Lignées psoriasiques

Pour les substituts pathologiques, deux lignées cellulaires psoriasiques de la banque dont dispose notre groupe de recherche soit les lignées: femme 46 ans et femme 65 ans ont été utilisées (tableau 10).

Tableau 10: Banque de lignées cellulaires psoriasiques

Numéro	Sexe	Âge	Site de la biopsie	Étendue du psoriasis
1	Femme	51	dos	< 10 %
2	Femme	35	dos	40 %
3	Femme	51	dos	15 %
4	Femme	65	dos	20 %
5	Homme	38	dos	< 10 %
6	Homme	49	dos	< 10 %
7	Femme	46	dos	15 %
8	Femme	69	dos	15 %
9	Homme	51	dos	< 10 %
10	Femme	47	cuisse droite	20 %
11	Femme	36	dos	± 5 %

### 2.2 Extraction cellulaire

Le transport des biopsies nécessite un milieu adéquat pour une bonne conservation des tissus jusqu'au laboratoire. Le morceau de peau est ensuite rincé avec un tampon phosphate stérile (PBS) contenant de la pénicilline, de la gentamicine ainsi que de la fungizone pour

éliminer toute trace de milieu. Les biopsies sont ensuite coupées en deux à l'aide d'un scalpel afin que l'enzyme qui doit séparer le derme de l'épiderme (thermolysine) puisse faire effet plus rapidement. La solution de thermolysine doit être fraîche et les morceaux de peau mis en contact avec celle-ci pendant 16h à 4°C. Les deux couches de peau peuvent ainsi être séparées (Figure 8).

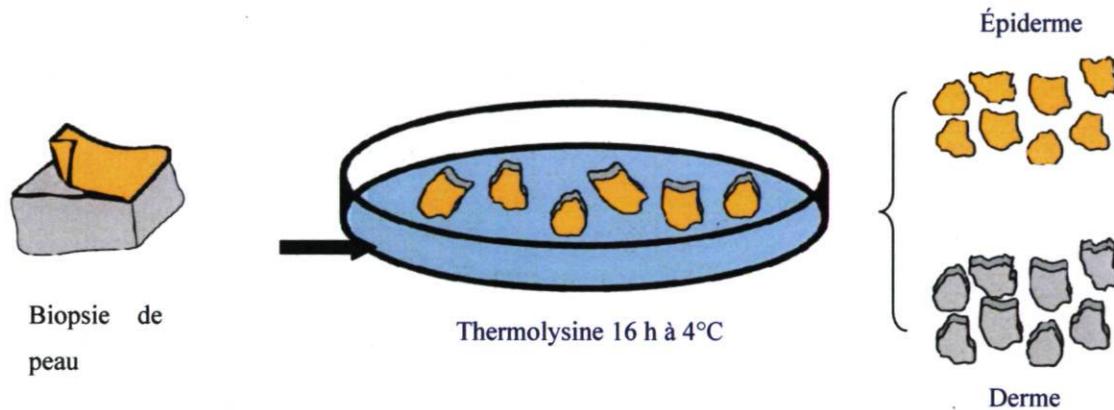


Figure 8: Extraction du derme et de l'épiderme

(Tirée du séminaire de Jessica Jean)

Pour isoler les cellules épithéliales, il faut mettre l'épiderme dans 20 ml de trypsine à 37°C pendant 30 minutes (Figure 9). La réaction est arrêtée avec la même quantité de milieu de culture (DME Ham's 5% SVF-sérum de veau foetal). Les cellules sont récupérées grâce à une centrifugation (10 minutes à 1180 rpm-révolutions par minute).

Pour isoler les fibroblastes, il faut digérer la section de peau avec 20 ml d'une solution fraîche de collagénase (0,125U de collagénase H dans du milieu DME 10% SVF avec pénicilline et gentamicine) pendant 4 heures à 37°C sur une plaque agitatrice (Figure 9). La réaction est arrêtée avec 20 ml de milieu de culture. Les cellules sont aussi récupérées grâce à une centrifugation (10 minutes à 1180 rpm).

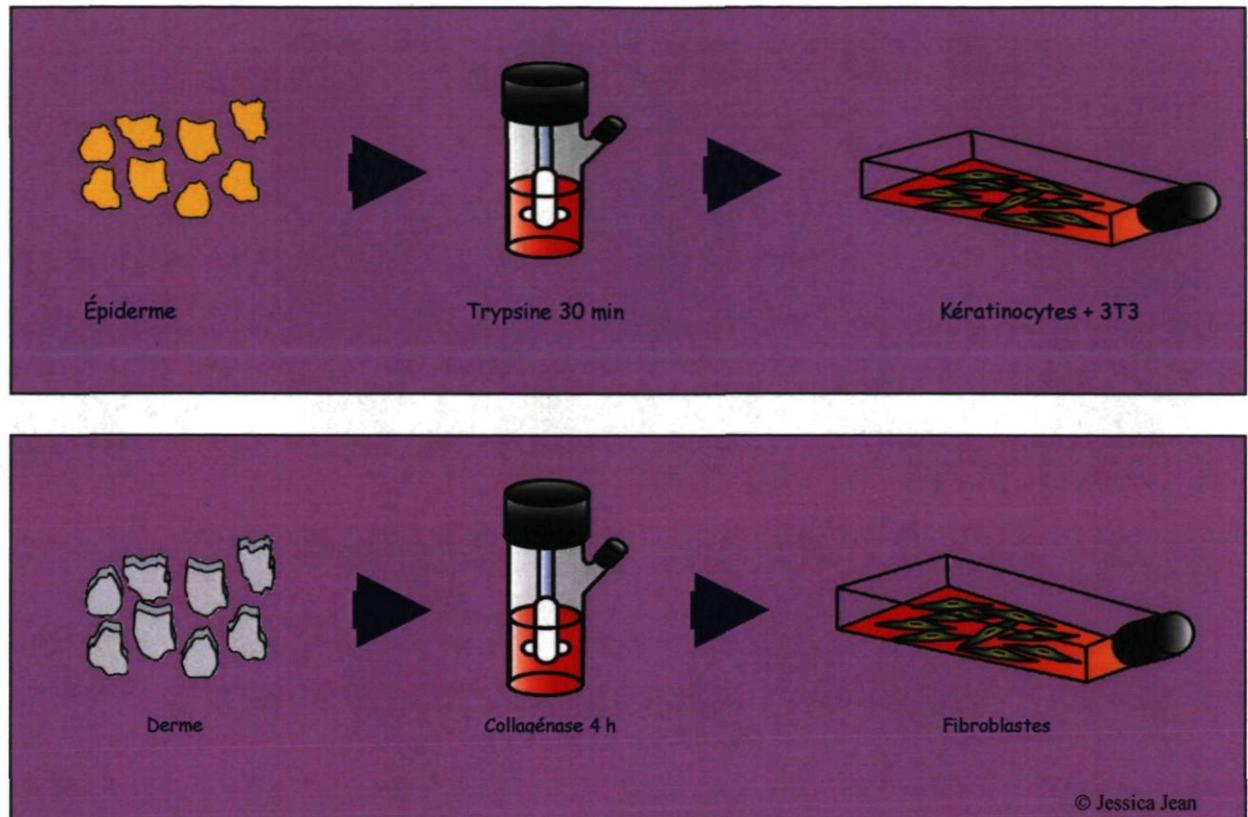


Figure 9: Extraction cellulaire

(Tirée du séminaire de Jessica Jean)

## 2.3 Culture cellulaire et production de substituts cutanés par la méthode d'auto-assemblage

### 2.3.1. Décongélation et ensemencement des fibroblastes

Des fibroblastes dermiques provenant de la banque cellulaire ont été décongelés: deux lignées de cellules provenant de deux patientes atteintes de psoriasis, dont pour chacune d'elles des fibroblastes de zones lésionnelles (FL041005♀46 en P4 et FL310505♀65 en P4). La lignée de cellules d'une patiente saine a également été utilisée afin de réaliser un contrôle (F070203♀21 en P3). La décongélation et l'ensemencement sont effectués selon les protocoles du LOEX.

Les fibroblastes ont été cultivés dans du milieu DME (Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium; Gibco, Burlington, On, Canada) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF; HyClone, Logan, UT, USA), 100 U/ml de pénicilline G (Sigma) et 25 µg/ml de gentamycine (Schering, Pointe-Claire, Qc, Canada). De l'acide ascorbique (50 µg/ml) est ajouté dans les flacons avant d'y ensemer les cellules (volume final de 5 ml pour un flacon de 25 cm<sup>2</sup>). L'acide ascorbique permet aux fibroblastes de sécréter de la matrice extracellulaire. Les flacons sont déposés dans des incubateurs à 37°C et 7-8% CO<sub>2</sub>. Le milieu est changé 3 fois par semaine pendant 28 jours afin de permettre aux fibroblastes de sécréter de la matrice extracellulaire essentielle au bon maintien du feuillet dermique.

### **2.3.2. Décongélation et ensemencement des kératinocytes**

La décongélation des kératinocytes s'effectue au même moment que le montage des feuillets pour pouvoir les ensemer après 7 jours de superposition de ces derniers. Des kératinocytes provenant de la banque cellulaire présentée au tableau 7 ont été décongelés: deux lignées de cellules provenant de deux patientes atteintes de psoriasis, dont pour chacune d'elles des kératinocytes de zones lésionnelles (KL041005♀46 en P1 et KL310505♀65 en P1). La lignée de cellules d'une patiente saine a également été utilisée afin de réaliser un contrôle (K161101♀26 en P1). Ces kératinocytes sont ensemerés à 0,3 million de cellules par flacon de 75 cm<sup>2</sup> afin de les faire proliférer. Ils sont cultivés sur une couche nourricière de fibroblastes de souris 3T3 irradiés dans du milieu DME-HAM (Milieu Eagle's medium (DME) et de Ham's F12 dans une proportion 3:1; Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), supplémenté de 5% de sérum Fetal Clone II (HyClone, Logan, UT), 10 ng/ml d'epidermal growth factor (EGF, Austral biologicals, San Ramon, CA), 5 µg/ml d'insuline (Sigma), 0,4 µg/ml d'hydrocortisone (Calbiochem, La Jolla, CA), 10<sup>-10</sup>M de toxine du choléra (ICN biomedical), 100 IU/ml de pénicilline G (Sigma) et 25 µg/ml de gentamycine (Schering, Pointe-Claire, Québec, Canada). Les changements de milieu sont effectués 3 fois par semaine.

## 2.4 Substituts cutanés

Les substituts cutanés sains et psoriasiques ont été fabriqués selon la méthode d'auto-assemblage développée au LOEX. Elle consiste à utiliser des fibroblastes et des kératinocytes provenant de biopsies de sujets humains. Précisément, des fibroblastes sont ensemencés dans des flacons en présence de 50 µg/ml d'acide ascorbique dans du milieu DME 10% SVF et après 28 jours les cellules forment des feuillets qui recouvrent entièrement le fond des flacons. Les feuillets sont alors détachés des flacons et assemblés deux par deux pour former un substitut dermique. Une semaine plus tard, des kératinocytes sont ensemencés sur ce substitut qui est porté à l'interface air-liquide afin de générer une couche cornée fonctionnelle (Figure 10).

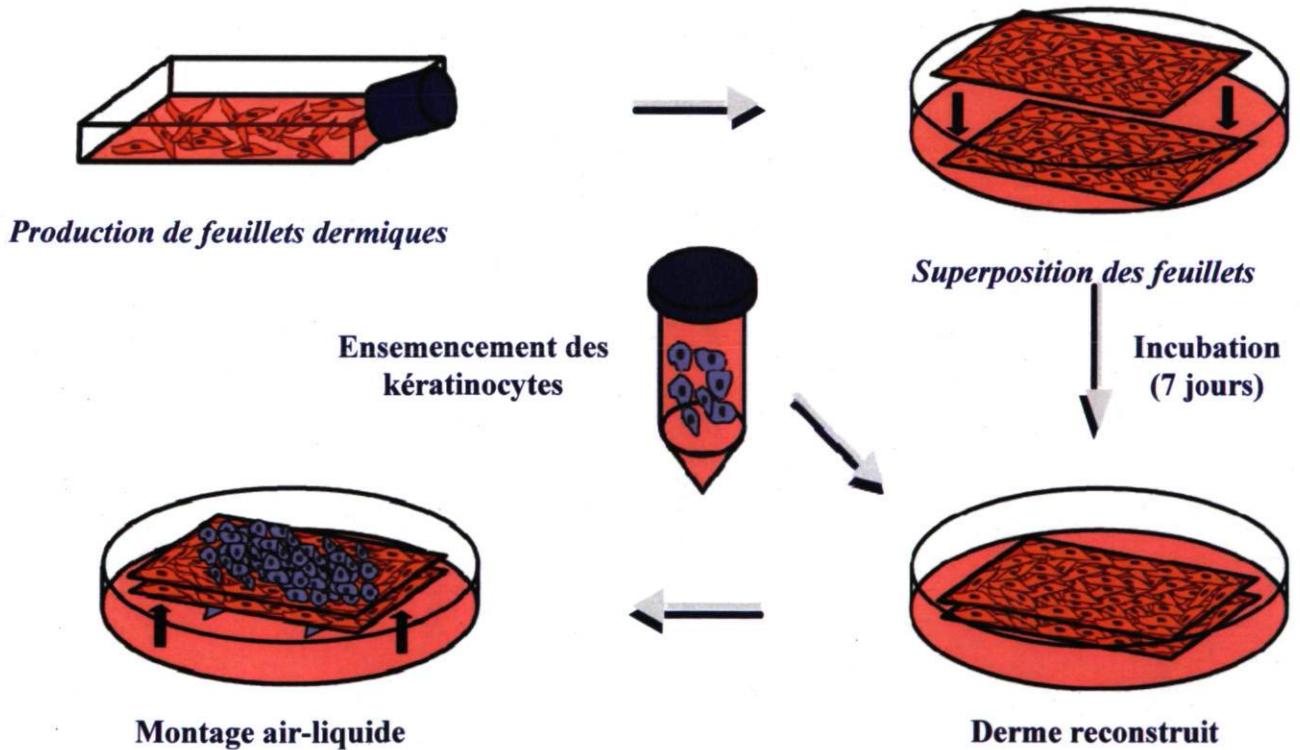


Figure 10: Production de substituts cutanés par la méthode d'auto-assemblage

### *Précisions pour le montage des feuillets de fibroblastes et dépôt des kératinocytes*

Au bout de 28 jours de culture, les feuillets sont prêts. Deux feuillets sont alors superposés de manière stérile pour former un derme équivalent selon le protocole élaboré à notre laboratoire. Les milieux sont changés tous les 3 jours et la superposition s'effectue pendant 7 jours. Les kératinocytes ont été trypsinés toujours selon les protocoles du LOEX puis ensemencés goutte à goutte à raison de 1 million de cellules par équivalent. Trois heures après l'ensemencement, il faut ajouter 25 ml de milieu DME-HAM complet ainsi que de l'acide ascorbique. L'acide ascorbique est par la suite ajouté directement au milieu de culture et les changements de milieux s'effectuent 3 fois par semaine.

### *Précisions pour le montage à l'interface air-liquide*

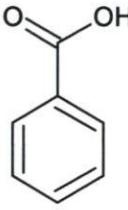
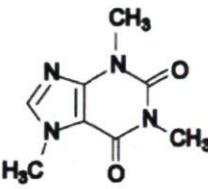
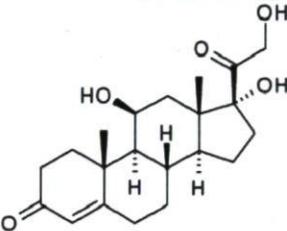
La peau reconstruite est décollée du pétri afin de pouvoir la glisser sur un anneau de papier filtre pour qu'elle s'y adhère. Le cercle de kératinocytes est placé directement en face du trou du papier filtre. Le tout est ensuite déposé sur un support air-liquide; 25 ml de milieu sont ajoutés de façon à ce que le liquide touche au derme mais pas à l'épiderme. Le changement de milieu s'effectue 3 fois par semaine. L'acide ascorbique est ajouté à chaque changement de milieu (Figure 10).

### *Biopsies*

Certains des substituts préparés sont conservés afin de pouvoir effectuer des biopsies après 21 jours de culture à l'interface air-liquide. Ces substituts cutanés sont coupés puis conservés dans l'OCT ou fixés à l'histochoice pour des analyses histologiques.

## 2.5 Molécules

Tableau 11: Molécules radioactives utilisées pour les études d'absorption percutanée.

	<b>ACIDE BENZOÏQUE</b>	<b>CAFÉINE</b>	<b>HYDROCORTISONE</b>
<b>FORMULE MOLECULAIRE</b>	$C_7H_6O_2$	$C_8H_{10}N_4O_2$	$C_{21}H_{30}O_5$
<b>STRUCTURE CHIMIQUE</b>			
<b>POIDS MOLECULAIRE (g/mole)</b>	122,12	194,19	362,46
<b>CARACTÉRISTIQUES</b>	Hydrophile	Amphiphile	Lipophile
<b>SOLUBILITÉ</b>	3,4 g/L à 293 K (25 °C) 68 g/L à 368 K (95 °C) 1 g/2.3 ml EtOH	Légèrement soluble dans l'eau 1 g/46 ml H <sub>2</sub> O 1 g/66 ml EtOH	0,28 mg/ml H <sub>2</sub> O
<b>Log Po/w</b>	1,83 (Référence OECD)	0,01 (Référence OECD)	2,04 (Référence Billich) 1,61 (Sznitowska, 2001)
<b>FOURNISSEUR</b>	MP Biomedicals, Inc.	Perkin Elmer	Perkin Elmer
<b>PRESENTATION</b>	Poudre	Solution éthanolique	Solution éthanolique
<b>CONCENTRATION</b>	0,50 mCi/mg 18,50MBq/mg 1 mg dissoudre dans 500 µl d'éthanol	0,10 mCi/ml 3,70MBq/ml	1,0 mCi/ml 37,0MBq/ml
<b>Quantité utilisée pour chaque échantillon de peau</b>	0,005 mCi	0,0005 mCi	0,0025 mCi

Ces molécules, aux propriétés physico-chimiques différentes (hydrophile, amphiphile et lipophile), permettent de suivre des chemins de pénétration différents faisant en sorte de nous donner de l'information sur la qualité de la barrière cutanée de nos substituts autant en ce qui concerne l'organisation des lipides intercellulaires qu'en ce qui concerne la structure et l'efficacité des enveloppes cornées (joueurs importants de la barrière cutanée) entourant les cellules. Les différents profils de pénétration ainsi obtenus présentent un portrait complet sur les compétences des substituts cutanés reconstruits.

## 2.6 Démarche expérimentale pour l'absorption percutanée

Pour chaque molécule étudiée, deux expériences d'absorption percutanée ont été réalisées utilisant à la fois des substituts sains et des substituts psoriasiques créés par la méthode d'auto-assemblage. À titre de contrôles, les peaux normale humaine saine provenant de réductions mammaires ainsi que de souris ont été utilisées. Chacune des molécules radioactives, aux caractéristiques physico-chimiques différentes, a été analysée sur les différents échantillons de peau afin d'évaluer l'efficacité de leur fonction barrière. Précisément, cette fonction a été évaluée par l'utilisation de cellules à diffusion de type Franz (figure 11) et réalisée selon les protocoles établis au LOEX. Brièvement la méthode va comme suit: la peau normale humaine, la peau de souris et les substituts cutanés sont placés entre les compartiments donneur et receveur sur un anneau en plastique. Les deux compartiments sont maintenus fermement entre eux par une pince. La molécule pour laquelle est évaluée la cinétique de pénétration est placée à la surface de l'échantillon de peau et la quantité diffusée est évaluée par des prélèvements effectués à des intervalles de temps définis. La solution utilisée dans le compartiment récepteur est du milieu DME sans SVF, supplémenté par 100 UI/ml de pénicilline G (Sigma), 25 µg/ml de gentamycine (Schering, Pointe-Claire, Québec, Canada) et 0,5 µg/ml de fungizone. La température est maintenue à 37°C et l'homogénéité du compartiment receveur est assurée par une barre d'agitation. Ainsi, il est possible de suivre de façon *in vitro* le passage d'une molécule à travers un échantillon et d'évaluer la quantité de produit le traversant par unité de temps.

Tableau 12: Démarche expérimentale

	ECHANTILLON	QUANTITÉ
<b>Acide benzoïque</b>	Peau normale humaine	3
	Peau de souris nue	3
	Substitut de peau normale humaine	4
<b>Caféine</b>	Substitut psoriasique ♀ 46 ans	4
	Substitut psoriasique ♀ 65 ans	4
<b>Hydrocortisone</b>	TOTAL	18

Note: Ce protocole a été répété 2 fois afin de valider les résultats

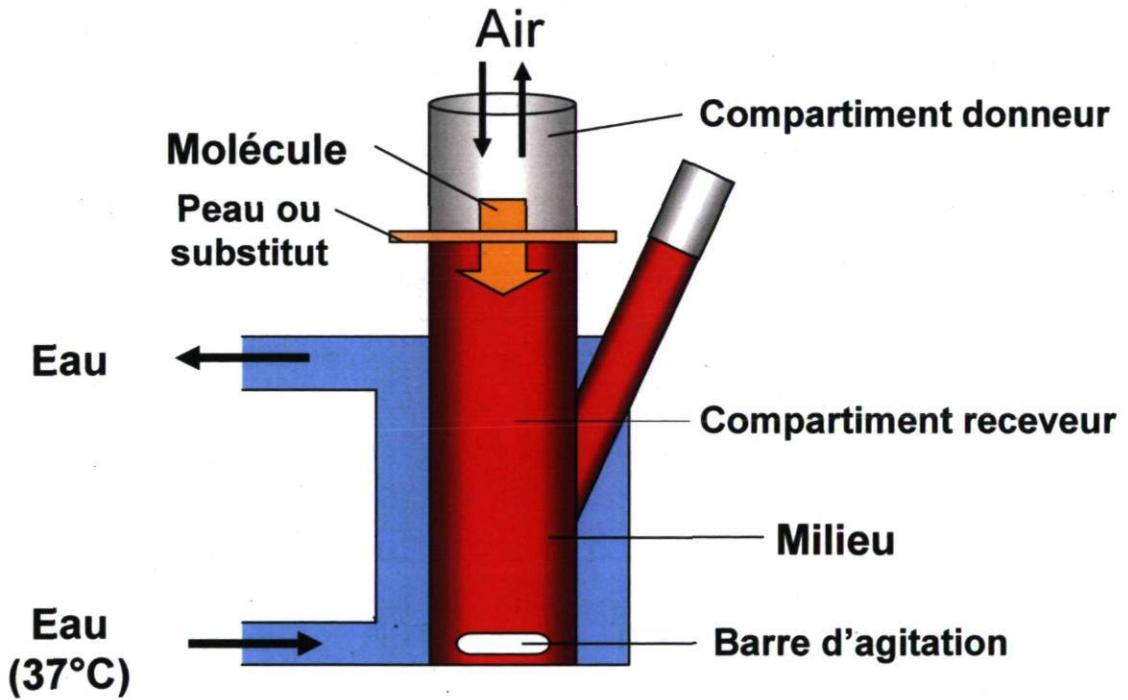


Figure 11: Cellule à diffusion de type Franz

## 2.7 Analyse statistique des données

Les données obtenues ont été traitées à l'aide d'une analyse de variance à mesures répétées pour étudier l'effet du « type de peau » sur l'évolution de la « radioactivité cumulative ». Le facteur répété était les heures. La procédure MIXED du programme SAS (SAS Institute Inc. Version 9.1.3) a été utilisée avec la structure de covariance qui minimise le critère d'Akaike. Les données ont été transformées parce que la normalité des résidus n'était pas respectée et qu'en plus les variances n'étaient pas homogènes. Alors, la transformation logarithmique de la variable dépendante a été employée pour rencontrer les hypothèses de normalité et d'homogénéité de la variance.

Pour les trois molécules (acide benzoïque, caféine et hydrocortisone) l'interaction entre type de peau et temps était fortement significative ( $p < 0.0001$ ) indiquant que l'évolution dans le temps de la « radioactivité cumulée » était différente selon le type de peau. Par conséquent des comparaisons deux à deux ont été faites en utilisant la méthode de Fisher LSD (least significant difference). Les moyennes estimées et leurs erreurs types pour chaque analyse sont présentées dans les graphiques.

## Chapitre 3 Résultats

Le but de notre travail a été d'analyser l'efficacité de la barrière cutanée de substituts psoriasiques et de substituts de peau normale humaine créés par la méthode d'auto-assemblage et de comparer cette dernière à celle de la peau normale humaine et de la peau de souris nue. À cette fin, des molécules présentant des caractéristiques physico-chimiques différentes ont été utilisées.

### 3.1 Caractéristiques de chaque peau

#### 3.1.1 Substitut de peau normale humaine (SPNH)

L'apparence macroscopique du substitut de peau normale humaine créé par la méthode d'auto-assemblage montre sa surface uniforme, lisse et blanchâtre (figure 12A).

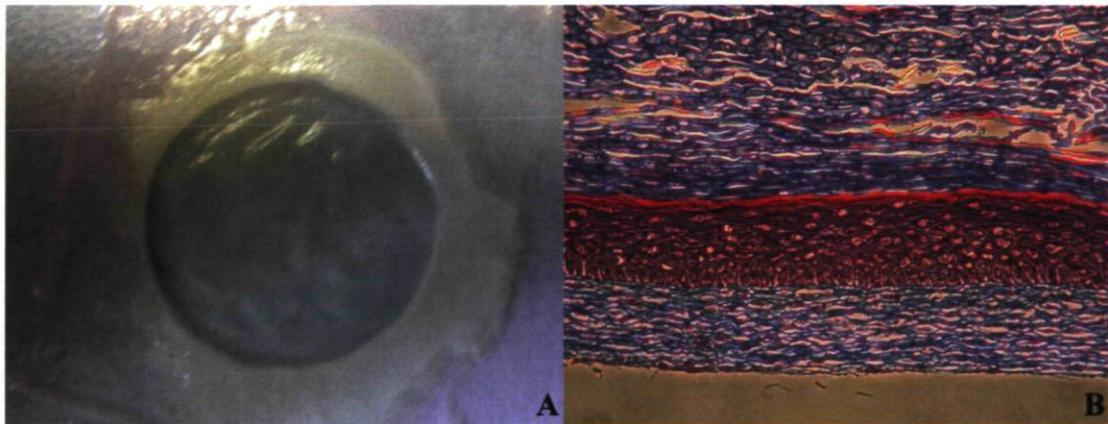


Figure 12: Caractéristiques macroscopiques et histologiques du substitut de peau normale humaine.

La coloration au trichrome de Masson d'une biopsie de 5 $\mu$ m d'épaisseur de substitut cutané humain sain confirme histologiquement les observations macroscopiques (Figure 12B).

### 3.1.2 Substituts psoriasiques (SPS)

Les substituts cutanés psoriasiques, comparativement aux substituts de peau normale humaine présentés à la figure 12A, affichent une surface inégale et plus épaisse par endroit (figure 13 A et B).

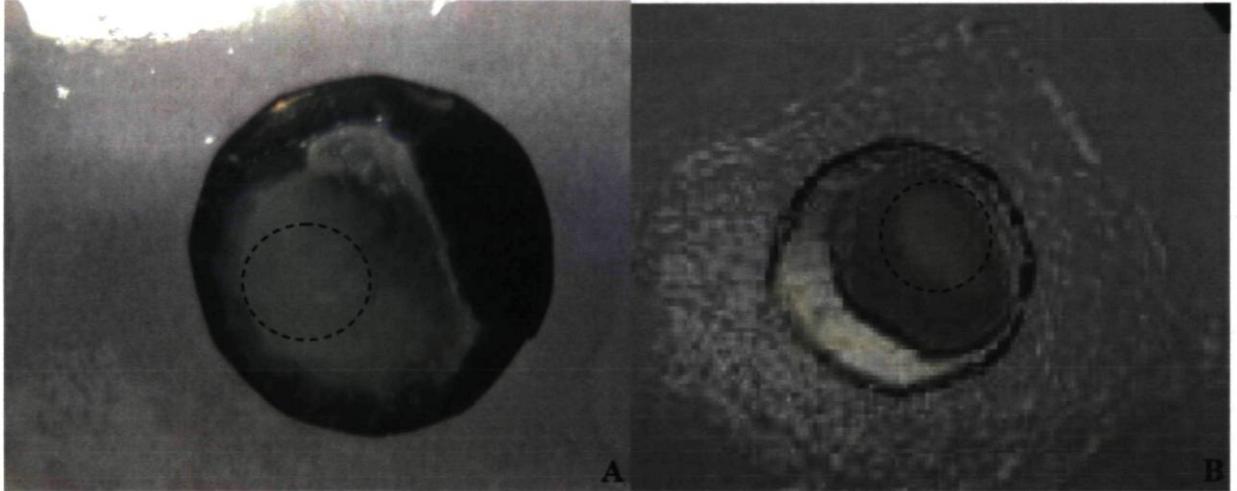


Figure 13: Caractéristiques macroscopiques de substituts cutanés psoriasiques faits à partir des cellules d'une femme de 46 ans (A) et faits à partir des cellules d'une femme de 65 ans (B).

Note 1: La transparence du tissu par endroit peut laisser voir la surface sous le substitut; ici: surface noire du comptoir de laboratoire.

Note 2: Le cercle pointillé représente la surface choisie pour réaliser les études d'absorption percutanée.

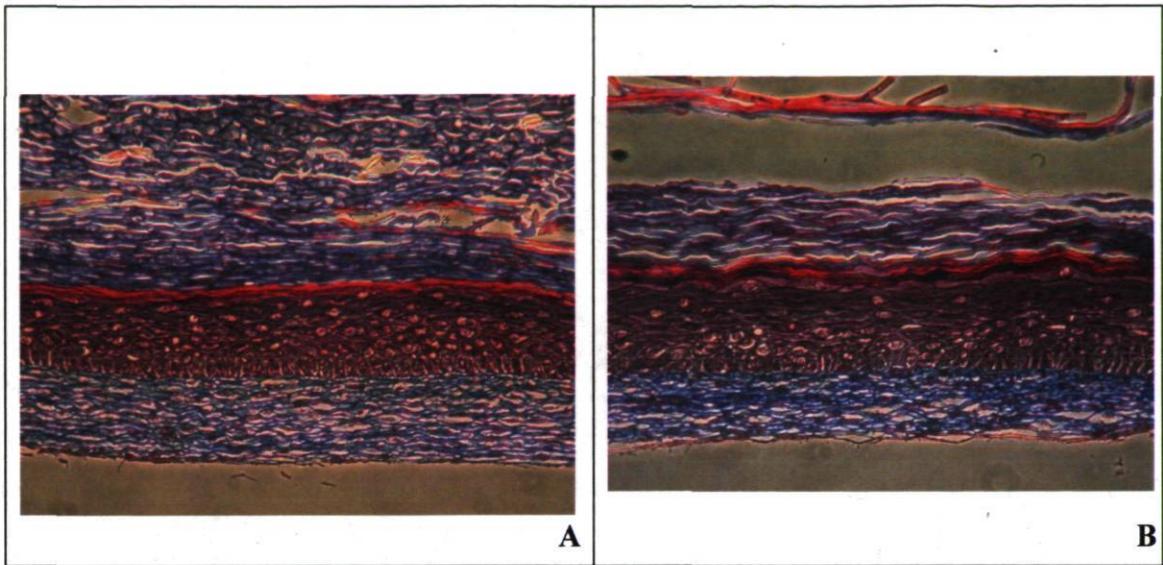


Figure 14: Caractéristiques histologiques d'un substitut de peau normale humaine (A) et d'un substitut psoriasique fait à partir des cellules d'une femme de 46 ans (B).

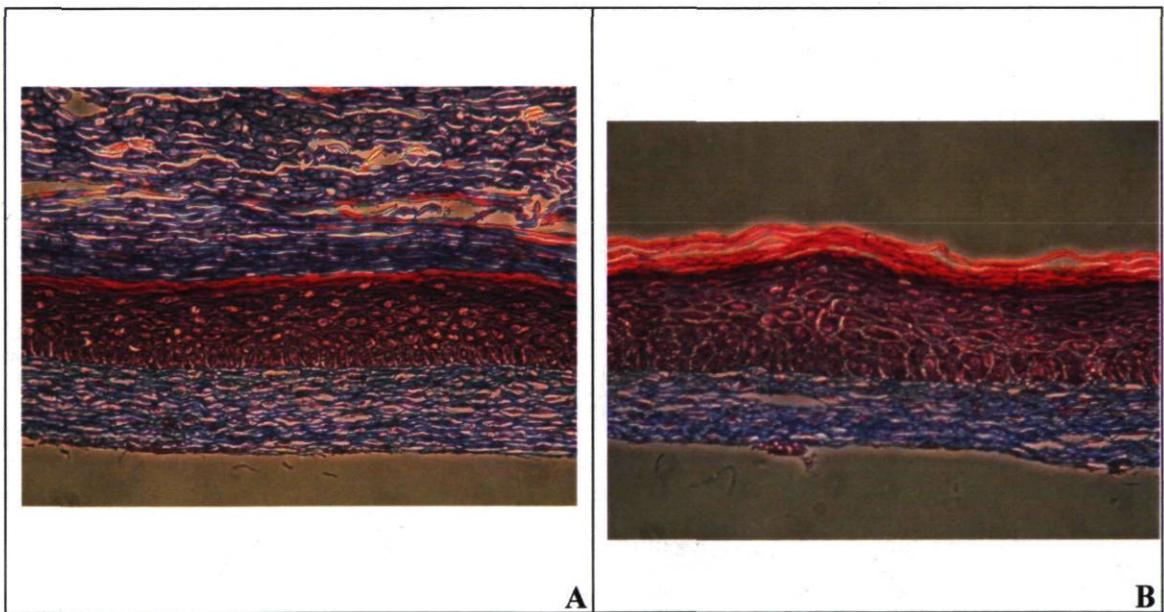


Figure 15: Caractéristiques histologiques d'un substitut de peau normale humaine (A) et d'un substitut psoriasique fait à partir des cellules d'une femme de 65 ans (B).

Les substituts cutanés psoriasiques faits à partir des cellules d'une femme de 46 ans (figure 14) ou de 65 ans (figure 15) présentent des épidermes sensiblement plus épais par endroit que des substituts de peau normale humaine; ceci est caractéristique d'un épiderme

psoriasique *in vivo* (figures 14 et 15). Pour d'autres lignées cellulaires avec lesquelles notre groupe travaille, des différences d'épaisseur d'un facteur 1,5-2,0 ont déjà été observées.

Les épidermes psoriasiques sont moins bien organisés et en général il y a absence complète ou partielle de la couche granulaire, qui demeure intacte dans les substituts faits à partir de cellules saines (Bernard, 2007).

### **3.2 Résultats en pourcentage de la radioactivité cumulée et récupérée pour chacune des molécules étudiées**

La section qui suit présente les résultats obtenus en absorption percutanée. Veuillez noter que les prochaines figures suivront toutes la nomenclature suivante:

<b>COULEUR</b>	<b>ÉCHANTILLON</b>
Bleu	Peau normale humaine (PNH)
Rouge	Substitut de peau normale humaine (SPNH)
Rose	Peau de souris (PS)
Vert	Substitut psoriasique de la femme de 46 ans (SPS46)
Violet	Substitut psoriasique de la femme de 65 ans (SPS65)

### 3.2.1 Acide benzoïque

Tableau 13: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'acide benzoïque

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PNH</b> n=3	0%	0%	0%	0%	0%	2%
<b>SPNH</b> n=4	0%	0%	0%	1%	1%	7%
<b>PS</b> n=3	0%	1%	2%	8%	14%	35%
<b>SPS46</b> n=4	4%	9%	22%	40%	55%	74%
<b>SPS65</b> n=4	9%	24%	53%	75%	87%	98%

Note: Expérience #1

Le tableau 13 collige les résultats obtenus lors du passage transdermique de l'acide benzoïque (expérience #1). En effet, il est possible de constater que les substituts de PNH affichent une valeur de 7% de radioactivité cumulée et récupérée après 24 heures d'expérimentation comparativement aux échantillons contrôles de PS et de PNH qui affichent 35% et 2% respectivement. Ainsi, il va s'en dire que notre substitut de peau normale humaine (SPNH) démontre une fonction barrière allant au-delà de ce qui est obtenu pour une peau de souris, et se rapproche étonnamment de ce qui est trouvé pour une PNH.

Quant aux substituts cutanés préparés à partir de cellules psoriasiques, ces derniers affichent des valeurs, à 24 heures, allant de 74% à 98% pour les lignées ♀46 et ♀65 ans respectivement. Ces valeurs, de pourcentages plus importants, comparées à la fois aux contrôles de PNH et PS, ainsi qu'aux substituts cutanés préparés à partir de cellules saines démontrent de façon convainquante que la fonction barrière n'est pas aussi fonctionnelle lorsque les cellules sont pathologiques; ceci rejoint ce que la littérature rapporte quant aux peaux psoriasiques *in vivo*.

De façon encore plus convainquante, ce sont les valeurs trouvées dès les premières heures de l'expérimentation qui démontrent la plus grande absorption de ces échantillons. En effet,

des valeurs de 4% et de 9% sont déjà notées dès la première heure d'expérimentation pour les SPS46 et SPS65 respectivement.

Afin de bien visualiser les résultats, des profils de pénétration cutanée sont également présentés à la figure 16.

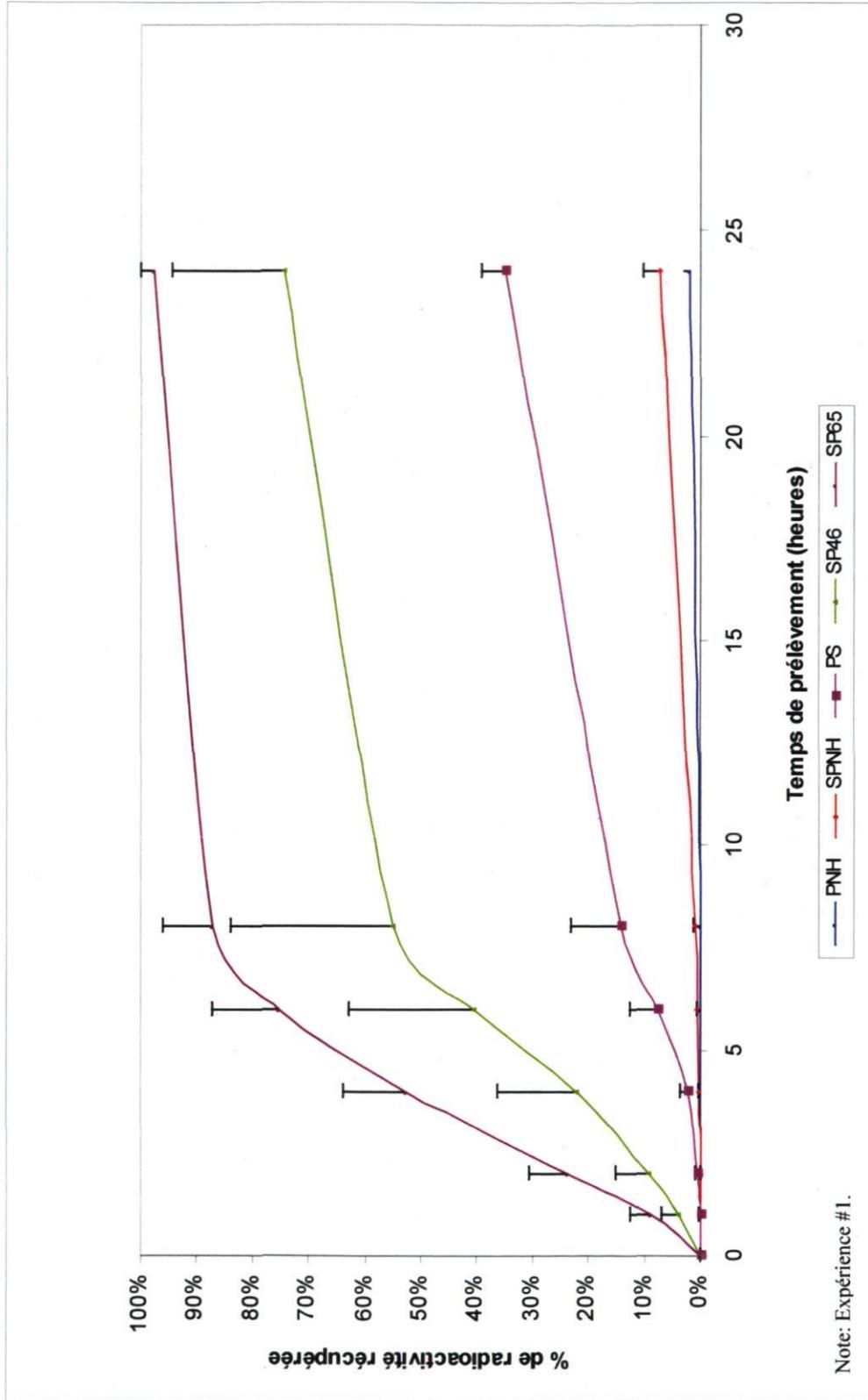


Figure 16: Profils de pénétration cutanée de l'acide benzoïque pour les différents échantillons testés.

Tableau 14: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'acide benzoïque

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PNH</b> n=3	0%	0%	0%	0%	0%	2%
<b>SPNH</b> n=4	0%	0%	0%	1%	1%	8%
<b>PS</b> n=3	0%	1%	3%	8%	17%	55%
<b>SPS46</b> n=4	2%	6%	13%	20%	26%	70%
<b>SPS65</b> n=4	15%	30%	53%	72%	86%	99%

Note: Expérience #2

Le tableau 14 collige les résultats obtenus lors du passage transdermique de l'acide benzoïque (expérience #2). En effet, il est possible de constater que les substituts de PNH affichent une valeur de 8% de radioactivité cumulée et récupérée après 24 heures d'expérimentation comparativement aux échantillons contrôles de PS et de PNH qui affichent 55% et 2% respectivement. Ainsi, notre substitut de peau normale humaine (SPNH) démontre, encore une fois, une fonction barrière allant au-delà de ce qui est obtenu pour une peau de souris, et se rapproche étonnamment de ce qui est trouvé pour une PNH.

Quant aux substituts cutanés préparés à partir de cellules psoriasiques, ces derniers affichent des valeurs, à 24 heures, allant de 70% à 99% pour les lignées ♀46 et ♀65 ans respectivement. Ces valeurs, de pourcentages plus importants, comparées à la fois aux contrôles de PNH et PS, ainsi qu'aux substituts cutanés préparés à partir de cellules saines sont comparables à celles obtenues lors de l'expérience #1 et démontrent une fois de plus que la fonction barrière n'est pas aussi fonctionnelle lorsque les cellules sont pathologiques.

Aussi, des valeurs trouvées dès les premières heures de l'expérimentation démontrent la plus grande absorption de ces échantillons, 2% et 15% pour les SPS46 et SPS65 respectivement.

Afin de bien visualiser les résultats, des profils de pénétration cutanée sont également présentés à la figure 17.

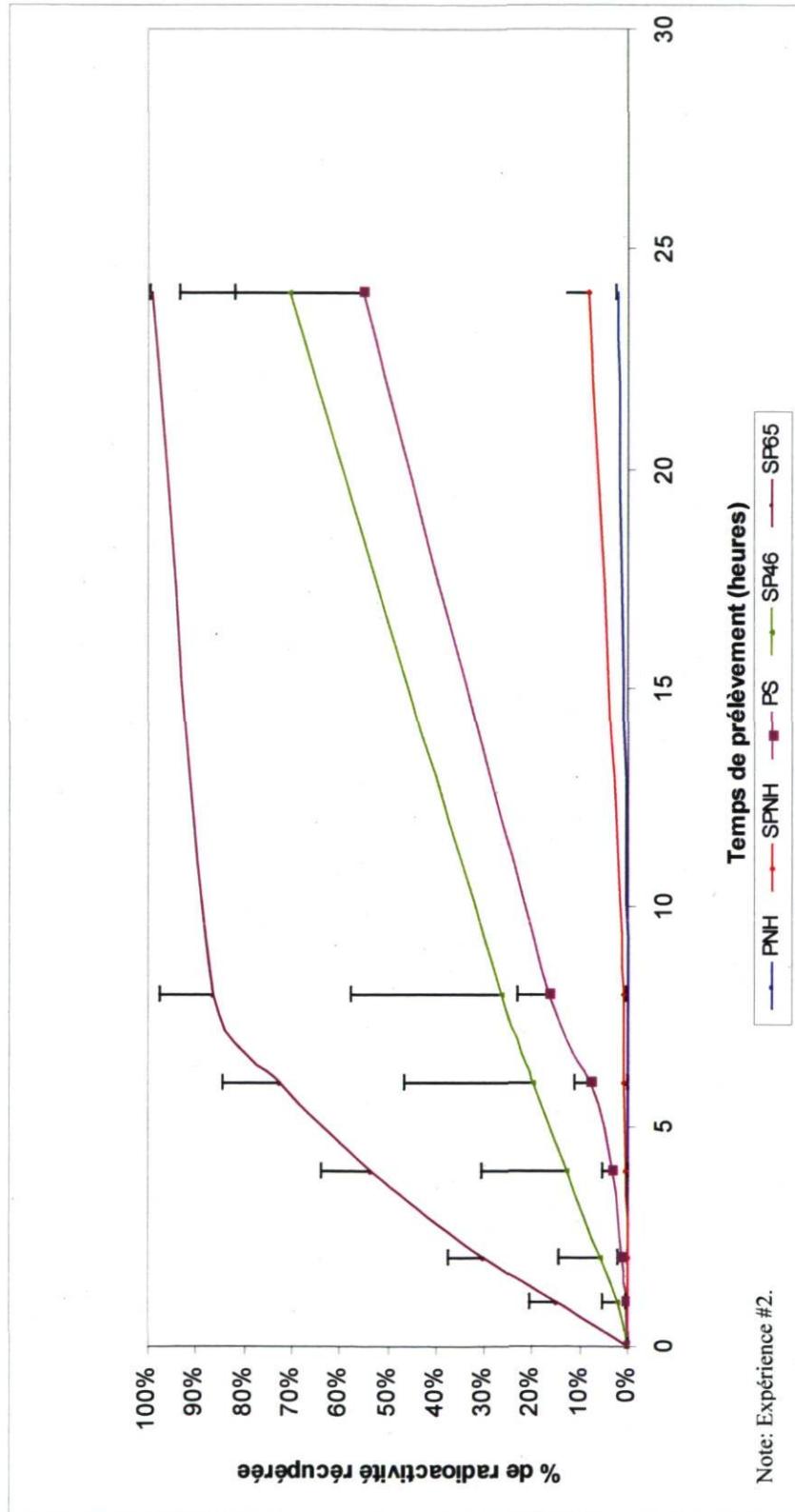


Figure 17: Profils de pénétration cutanée de l'acide benzoïque pour les différents échantillons testés

Les profils de pénétration cutanée obtenus au cours des deux expériences où l'acide benzoïque a été mis à contribution afin de valider les fonctions barrières des substituts cutanés permettent de constater que les deux expériences réalisées ont été très reproductibles.

Il est probablement judicieux, à ce stade du mémoire, de préciser que les résultats en absorption percutanée peuvent présenter des différences assez importantes d'une expérience à l'autre. Notre travail nous a permis de constater que la température ambiante du laboratoire, pouvait, à elle seule, influencer les valeurs obtenues. Nous aborderons de nouveau le sujet au sein de notre discussion mais nous pensions favorable de le mentionner maintenant pour une meilleure appréciation des résultats qui suivront. Afin de pouvoir tirer des conclusions générales et de déterminer les résultats étant les plus significatifs, la démarche statistique a nécessité le mariage des 2 expériences. La section qui suit présente les résultats combinés.

Tableau 15: Résultats combinés des pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'acide benzoïque provenant des expériences 1 et 2

<b>PEAU</b>	<b>1 heure</b>	<b>2 heures</b>	<b>4 heures</b>	<b>6 heures</b>	<b>8 heures</b>	<b>24 heures</b>
<b>PNH</b>	0%	0%	0%	0%	0%	2%
<b>SPNH</b>	0%	0%	0%	0%	0%	8%
<b>PS</b>	0%	0%	3%	8%	15%	45%
<b>SPS46</b>	3%	8%	17%	30%	41%	72%
<b>SPS65</b>	12%	27%	53%	74%	87%	98%

Les résultats combinés des pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'acide benzoïque pour les expériences 1 et 2 mettent en valeur les différences retrouvées pour les SPNH. En effet, ces derniers présentent des valeurs beaucoup plus faibles comparativement à la PS et ce, à partir du temps de prélèvement de 4 heures jusqu'à 24 heures.

La valeur moyenne attribuée aux SPNH est de 8% à 24 heures comparativement à 2% et à 45% pour la peau normale humaine et de souris respectivement, ce qui est significativement différent ( $P < 0,001$ ).

Il est intéressant de faire remarquer que les échantillons de peaux de souris commencent à laisser passer la substance radioactive après seulement 4 heures d'expérimentation alors que les substituts de peau normale humaine (SPNH) ne le font qu'au prélèvement de 24 heures tout comme la PNH. Ce résultat très encourageant, permet d'affirmer que la qualité de la fonction barrière des SPNH rejoint étonnamment celle de la PNH.

Le substitut de peau normale humaine se démarque également clairement des substituts pathologiques que ce soit ceux faits à partir des cellules de la femme de 46 ans ou de celles de la femme de 65 ans. En effet, ces derniers laissent passer l'acide benzoïque dès les premiers prélèvements dans des pourcentages rejoignant ce qui est retrouvé à 24 heures pour les SPNH. Tous les temps de prélèvements ont démontré des résultats significativement différents et ont été appuyés par les analyses statistiques selon une valeur  $P < 0,05$ .

Quant aux différences obtenues entre les lignées psoriasiques, des résultats significativement différents sont obtenus selon les valeurs suivantes:

1 heure (3% comparativement à 12% avec une valeur  $P=0,0012$ ); 2 heures (8% comparativement à 27% avec une valeur  $P=0,0001$ ); 4 heures (17% comparativement à 53% avec une valeur  $P < 0,001$ ); 6 heures (30% comparativement à 74% avec une valeur  $P=0,0003$ ); 8 heures (41% comparativement à 87% avec une valeur  $P=0,001$ ) et 24 heures (72% comparativement à 98% avec une valeur  $P=0,038$ ).

Veuillez noter que la figure 18, associée aux résultats combinés, rapporte les valeurs logarithmiques des pourcentages de radioactivité récupérée afin de permettre une bonne visualisation des résultats qui apparaissaient de façon trop condensée sur une échelle en pourcentage.

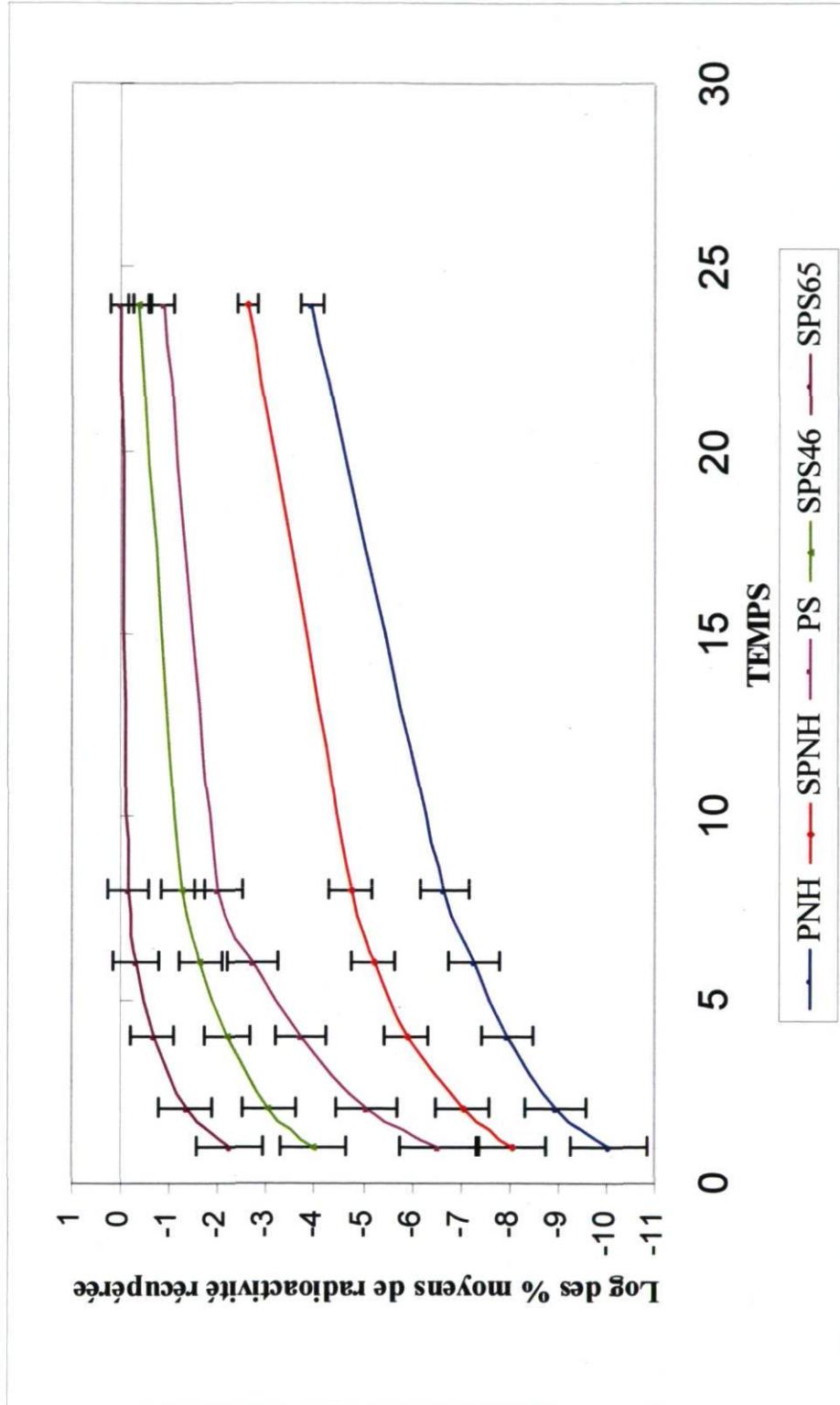


Figure 18: Profils de pénétration cutanée de l'acide benzoïque pour les différents échantillons testés (expériences 1 et 2)

L'acide benzoïque, une molécule hydrophile, nous permet de tirer quelques conclusions sur la qualité des échantillons préparés à notre laboratoire. Les profils de pénétration ne laissent aucune ambiguïté sur la présence d'une fonction barrière efficace pour les SPNH (figure 18). En ce qui concerne les substituts pathologiques, les valeurs plus importantes, démontrent une pénétration accrue de cette molécule au travers les couches cornées de ces échantillons respectant ce qui est présenté dans la littérature pour les peaux psoriasiques *in vivo*.

### 3.2.2 Caféine

Tableau 16: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de la caféine

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PNH</b> n=3	0%	0%	0%	0%	1%	22%
<b>SPNH</b> n=4	0%	0%	2%	4%	6%	49%
<b>PS</b> n=3	1%	2%	5%	15%	36%	89%
<b>SPS46</b> n=4	9%	21%	46%	67%	80%	99%
<b>SPS65</b> n=4	33%	55%	75%	89%	96%	100%

Note: Expérience #1

L'absorption percutanée de la molécule caféine commence dès les premiers temps de prélèvement pour la majorité des échantillons utilisés. Le substitut de peau normale humaine, après 4 heures d'expérimentation aura laissé passer 2% de substance radioactive comparativement à 0% et 5% pour les contrôles de peaux normales humaine et de souris respectivement. C'est toutefois après 6 heures d'expérimentation que le substitut de peau normale humaine se distingue au-delà de 10% du contrôle animal; 15% versus 4% (tableau 16).

Quant aux substituts psoriasiques, que ce soit ceux faits à partir de cellules provenant de la femme de 46 ans ou de celles provenant de la femme de 65 ans, il est possible d'observer des pourcentages de radioactivité récupérée beaucoup plus importants comparativement aux

substituts faits de cellules saines; 21% et 55% respectivement comparativement à 0% pour la PNH après 2 heures d'expérimentation (Tableau 16).

Enfin, les résultats associés aux substituts pathologiques affichent des pourcentages nettement plus élevés que les substituts normaux tout au long de l'expérimentation; 99% et 100% versus 49% respectivement après 24 heures de diffusion.

Quant aux comparaisons pouvant être faites entre les substituts pathologiques, il apparaît qu'au premier temps de prélèvement, soit celui d'une heure, les pourcentages obtenus sont quelque peu différents; 9% (SPS46 ans) comparativement à 33% (SPS65 ans). Cette différence dans la cinétique de pénétration est maintenue jusqu'au temps de prélèvement de 8 heures. Après 24 heures d'expérimentation, la différence entre les lignées cellulaires n'est plus perceptible ayant atteint le maximum de diffusion possible (Tableau 16).

Afin de bien visualiser les résultats, des profils de pénétration cutanée sont également présentés à la figure 19.

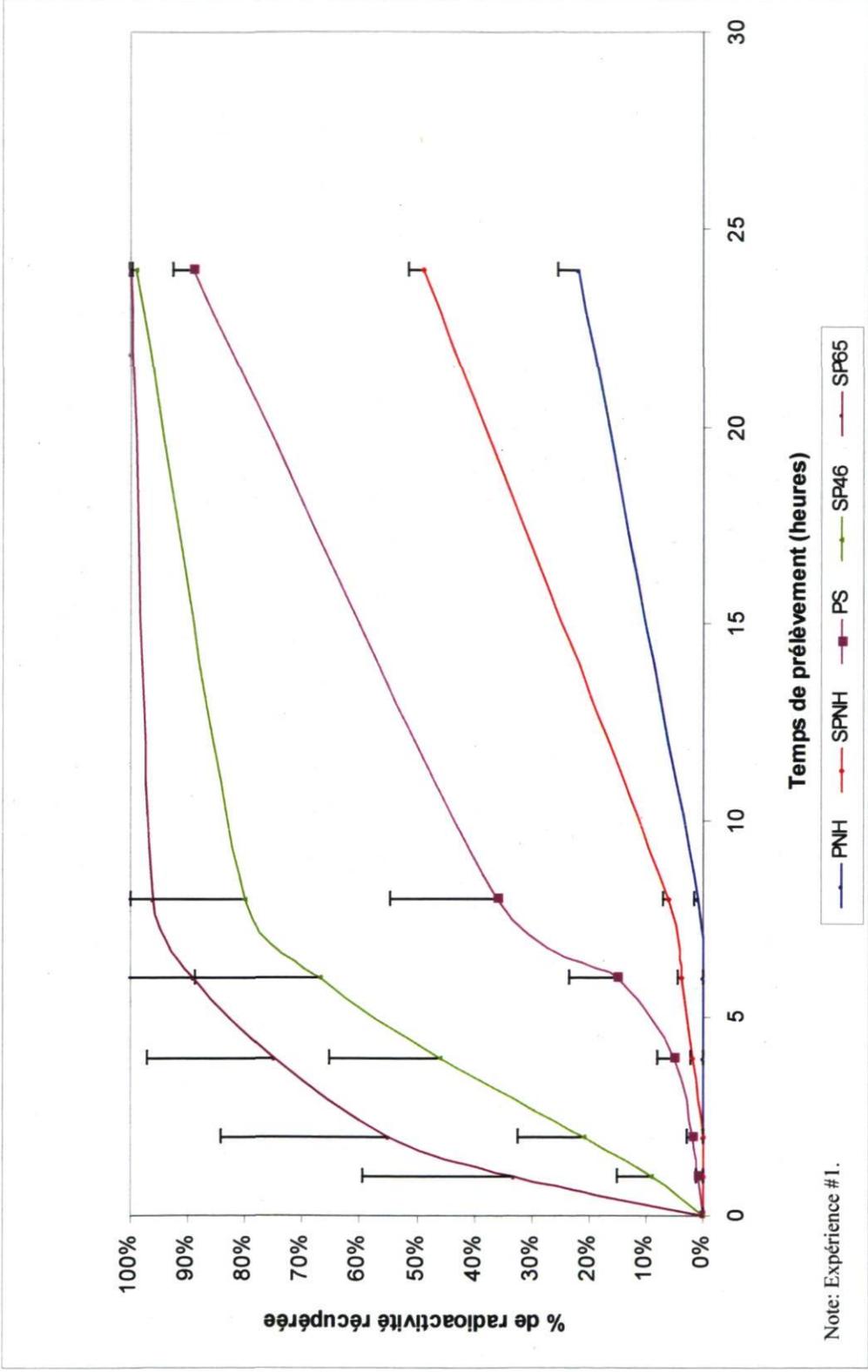


Figure 19: Profils de pénétration cutanée de la caféine pour les différents échantillons testés.

Tableau 17: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de la caféine

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PNH</b> n=3	0%	1%	3%	6%	11%	61%
<b>SPNH</b> n=4	0%	0%	1%	2%	5%	42%
<b>PS</b> n=3	39%	57%	66%	68%	70%	92%
<b>SPS46</b> n=4	28%	49%	72%	84%	93%	100%
<b>SPS65</b> n=4	4%	58%	78%	87%	94%	100%

*Note: Expérience #2*

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PS</b> n=8	2%	4%	11%	27%	58%	87%

*Note: Expérience #3 peau de souris*

Le tableau 17 collige les résultats obtenus lors du passage transdermique de la caféine (expériences #2 et #3). Le substitut de peau normale humaine, après 4 heures d'expérimentation aura laissé passer 1% de substance radioactive comparativement à 3% et 66% pour les contrôles de peaux normales humaine et de souris respectivement. Déjà, à partir d'une heure le substitut de peau normale humaine se distingue de façon significative du contrôle animal (Tableau 17).

Afin de pallier aux différences notables observées pour la PS entre les expériences 1 et 2, nous avons procédé à la reprise d'une nouvelle expérimentation mettant en jeu 8 nouveaux échantillons (Tableau 17, expérience #3, figure 21) et les résultats obtenus à partir de la première heure jusqu'à 24 heures démontrent que le profil de pénétration est maintenu pour les échantillons par rapport à l'expérimentation 1 (figure 21).

Quant aux substituts psoriasiques, que ce soit ceux faits à partir de cellules provenant de la femme de 46 ans ou de celles provenant de la femme de 65 ans, il est possible d'observer des pourcentages de radioactivité récupérée beaucoup plus importants comparativement aux

substituts faits de cellules saines; 49% et 58% comparativement à 0% après 2 heures d'expérimentation respectivement (Tableau 17).

Encore une fois, les résultats associés aux substituts pathologiques affichent des pourcentages nettement plus élevés que les substituts normaux tout au long de l'expérimentation; 100% pour chaque substitut pathologique versus 42% respectivement.

Quant aux comparaisons pouvant être faites entre les substituts pathologiques, il apparaît que, différemment de la première expérience faite avec la caféine, les valeurs trouvées se ressemblent beaucoup dès le temps de prélèvement de 2 heures. Par la suite, aucune différence reliée à la lignée cellulaire n'est remarquée (Tableau 17).

Afin de bien visualiser les résultats, des profils de pénétration cutanée sont également présentés aux figures 20 et 21.

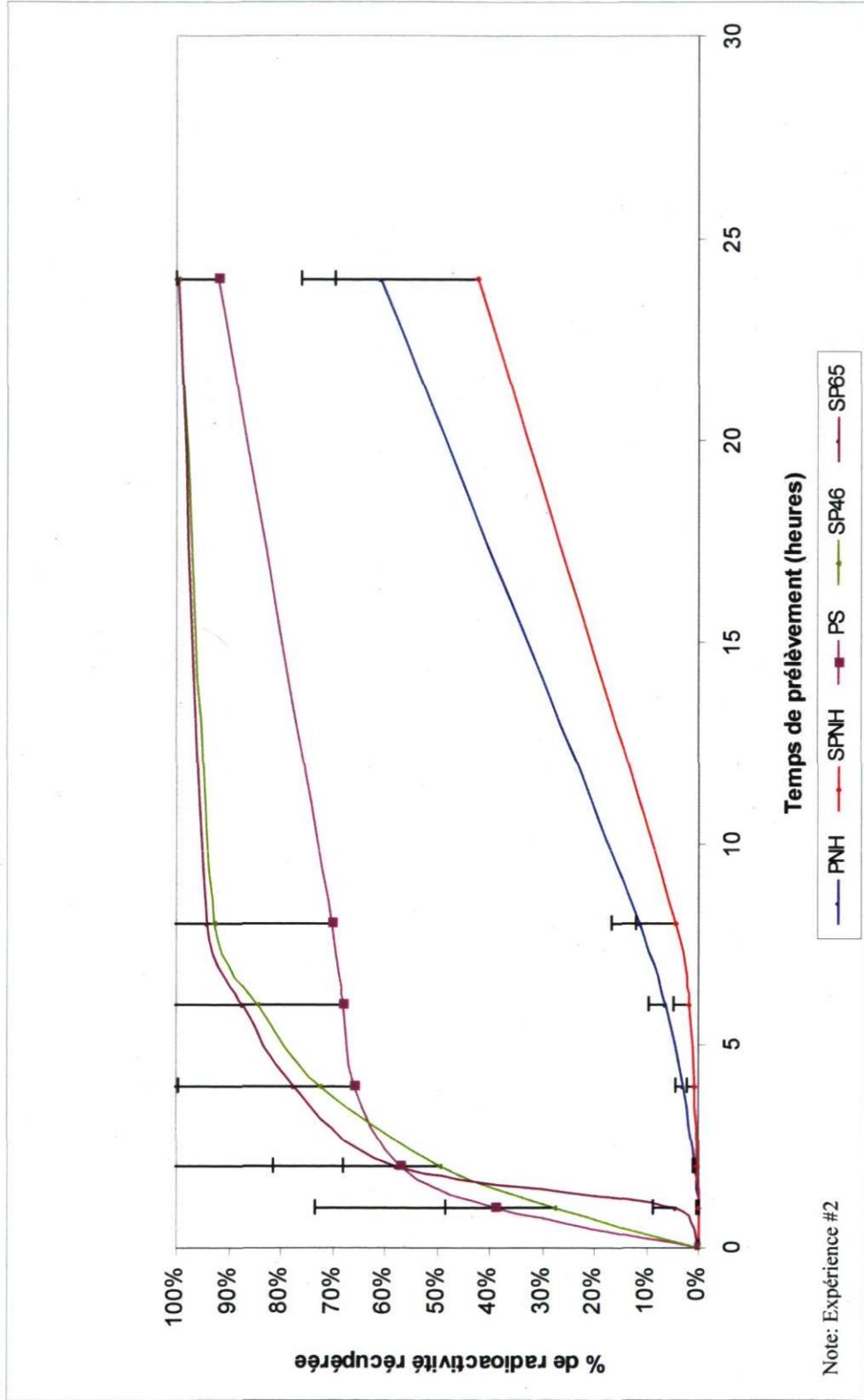


Figure 20: Profils de pénétration cutanée de la caféine pour les différents échantillons testés

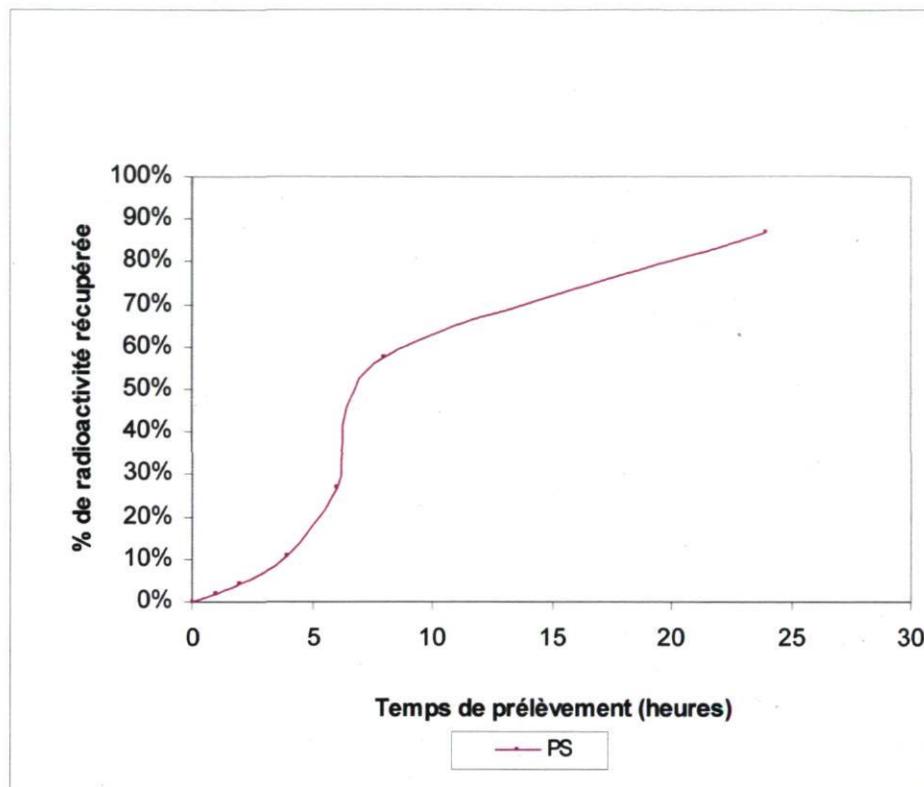


Figure 21: Profil de pénétration cutanée de la caféine utilisant la peau de souris

Il est à noter qu'au cours d'une expérimentation de pénétration cutanée, dépendamment des manipulations subies lors du prélèvement ou lors de la mise en place sur le système de cellules à diffusion, un ou des échantillons puissent être percés. Ainsi, le profil de pénétration cutanée observé pour la caféine passée au travers des échantillons contrôles de peau de souris (expérimentation 2, figure 20) s'est avéré être très différent de ce qui avait été observé lors de l'expérimentation 1, figure 19). L'analyse statistique utilisée aura permis de prendre en considération la reprise expérimentale pour l'obtention des nouveaux résultats du tableau 17, expérience #3 et figure 21. En somme, ces résultats se rapprochent davantage de ceux retrouvés lors de l'expérience 1.

Tableau 18: Résultats combinés des pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de la caféine provenant des expériences 1, 2 et 3

<b>PEAU</b>	<b>1 heure</b>	<b>2 heures</b>	<b>4 heures</b>	<b>6 heures</b>	<b>8 heures</b>	<b>24 heures</b>
<b>PNH</b>	0%	0%	2%	3%	6%	41%
<b>SPNH</b>	0%	0%	1%	3%	5%	45%
<b>PS</b>	1%	3%	9%	24%	52%	87%
<b>SPS46</b>	18%	35%	59%	75%	86%	99%
<b>SPS65</b>	19%	33%	50%	65%	78%	97%

Après 4 heures d'expérimentation, le substitut de peau normale humaine aura laissé passer 1% de substance radioactive comparativement à 2% et 9% pour les contrôles de peaux normales humaine et de souris respectivement. C'est toutefois après 6 heures d'expérimentation que le substitut de peau normale humaine se distingue de façon plus importante du contrôle animal; 3% versus 24% ( $P < 0,001$ ). Par ailleurs, même après 24 heures de diffusion percutanée, le SPNH reste dans les mêmes valeurs que ce qui est retrouvé pour la PNH 45% versus 41% respectivement (Tableau 18).

Quant aux substituts psoriasiques, que ce soit ceux faits à partir de cellules provenant de la femme de 46 ans ou celles provenant de la femme de 65 ans, il est possible d'observer des pourcentages de radioactivité récupérée beaucoup plus importants comparativement à ceux faits de cellules saines; 35% et 33% comparativement à 0% après 2 heures d'expérimentation ( $P < 0,001$ ) et ( $P < 0,001$ ) respectivement (Tableau 18).

Les résultats demeurent tout aussi différents, jusqu'à 24 heures d'expérimentation; 99% et 97% versus 45% selon les valeurs P suivantes: ( $P < 0,001$ ) et ( $P < 0,001$ ) respectivement (Tableau 18).

Quant aux différents substituts psoriasiques, aucune différence significative n'est finalement observée tout au cours de l'expérimentation ( $P > 0,05$ ) (Tableau 18). La figure 22 présente les moyennes logarithmiques des résultats.

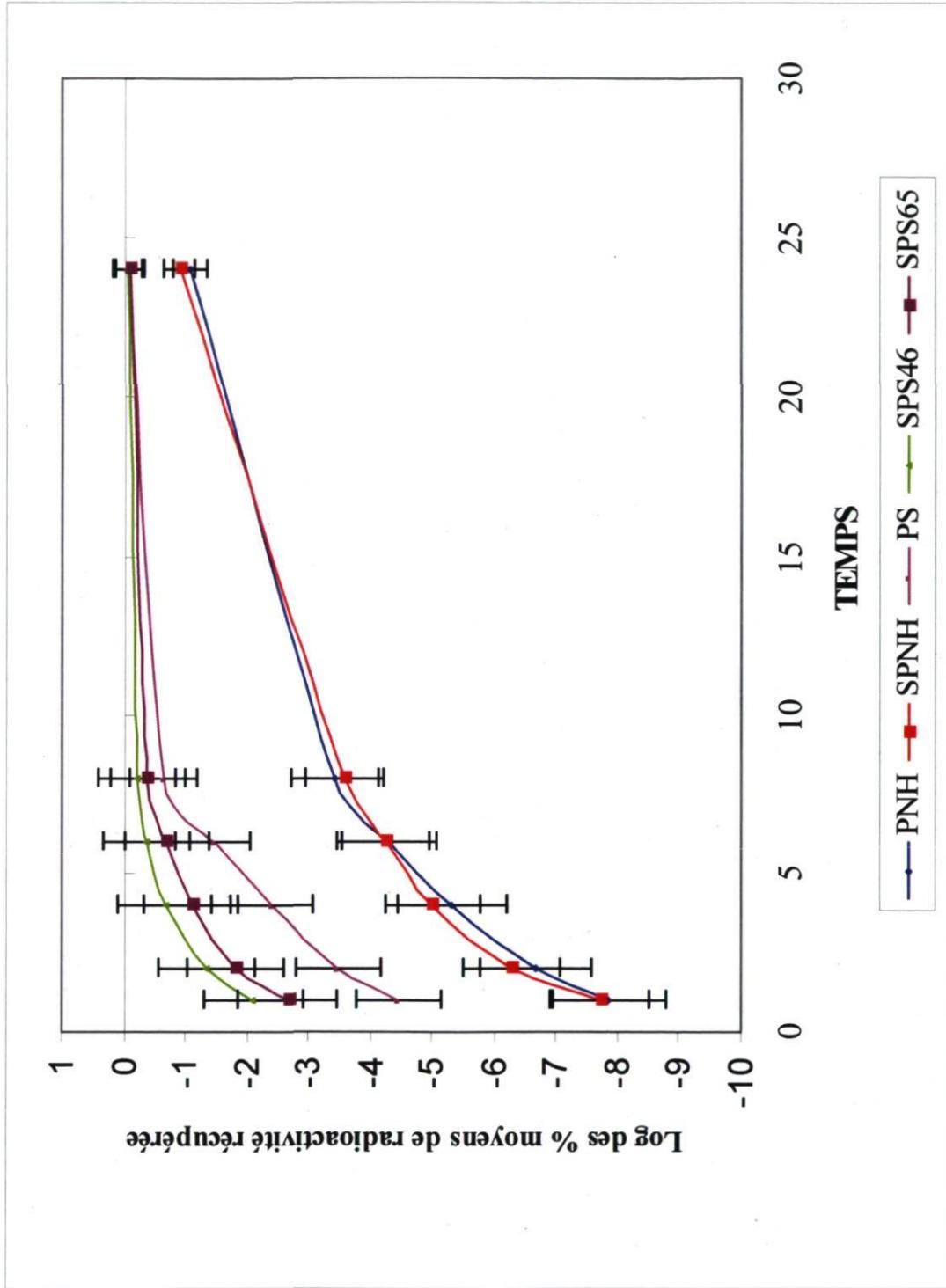


Figure 22: Profils de pénétration cutanée de la caféine pour les différents échantillons testés (expériences 1, 2 et 3)

### 3.2.3 Hydrocortisone

Tableau 19: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'hydrocortisone

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>SPNH</b> n=5	0%	0%	0%	0%	0%	1%
<b>SPS46</b> n=5	3%	8%	19%	31%	43%	62%
<b>SPS65</b> n=5	64%	89%	98%	99%	99%	100%

Note: Expérience #1

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PS</b> n=8	0%	0%	2%	4%	10%	35%

Note: Expérience #2 peau de souris

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PNH</b> n=8	0%	0%	1%	1%	2%	6%

Note: Expérience #3 peau normale humaine

Le tableau 19 présente les résultats obtenus lors du passage transdermique de l'hydrocortisone utilisant dans un premier temps les substituts cutanés (Tableau 19, expérience #1, figure 23). Au moment de procéder à cette expérimentation, les peaux contrôles, autant humaine qu'animale, n'ont pas été disponibles. Ainsi, des expériences ont été replanifiées afin de compléter le tableau 19 avec des valeurs associées aux PS et PNH (expérience #2, figure 24 et expérience #3, figure 25).

Il est possible de constater que les substituts de PNH affichent une valeur de 1% de radioactivité cumulée et récupérée après 24 heures d'expérimentation comparativement aux échantillons contrôles de PS et de PNH qui affichent 35% et 6% respectivement. Ainsi, notre substitut de peau normale humaine (SPNH) démontre une fonction barrière supérieure à ce qui est obtenu pour une peau de souris et de façon surprenante, affiche un meilleur résultat (qui n'est toutefois pas significatif) que ce qui est retrouvé pour la PNH.

Les substituts cutanés psoriasiques affichent des valeurs, à 24 heures, allant de 62% à 100% pour les lignées ♀46 et ♀65 ans respectivement. Encore une fois ces valeurs démontrent, par rapport aux peaux contrôles et à notre substitut de peau normale humaine, que la fonction barrière est moins efficace lorsque les cellules sont pathologiques.

Dès les premières heures d'expérimentation, ces échantillons montrent des valeurs variant entre 3% et 64% pour les SPS46 et SPS65 respectivement, ce qui démontre la plus grande absorption de ces derniers. Les résultats des profils de pénétration cutanée mettant en jeu les substituts sont présentés à la figure 23.

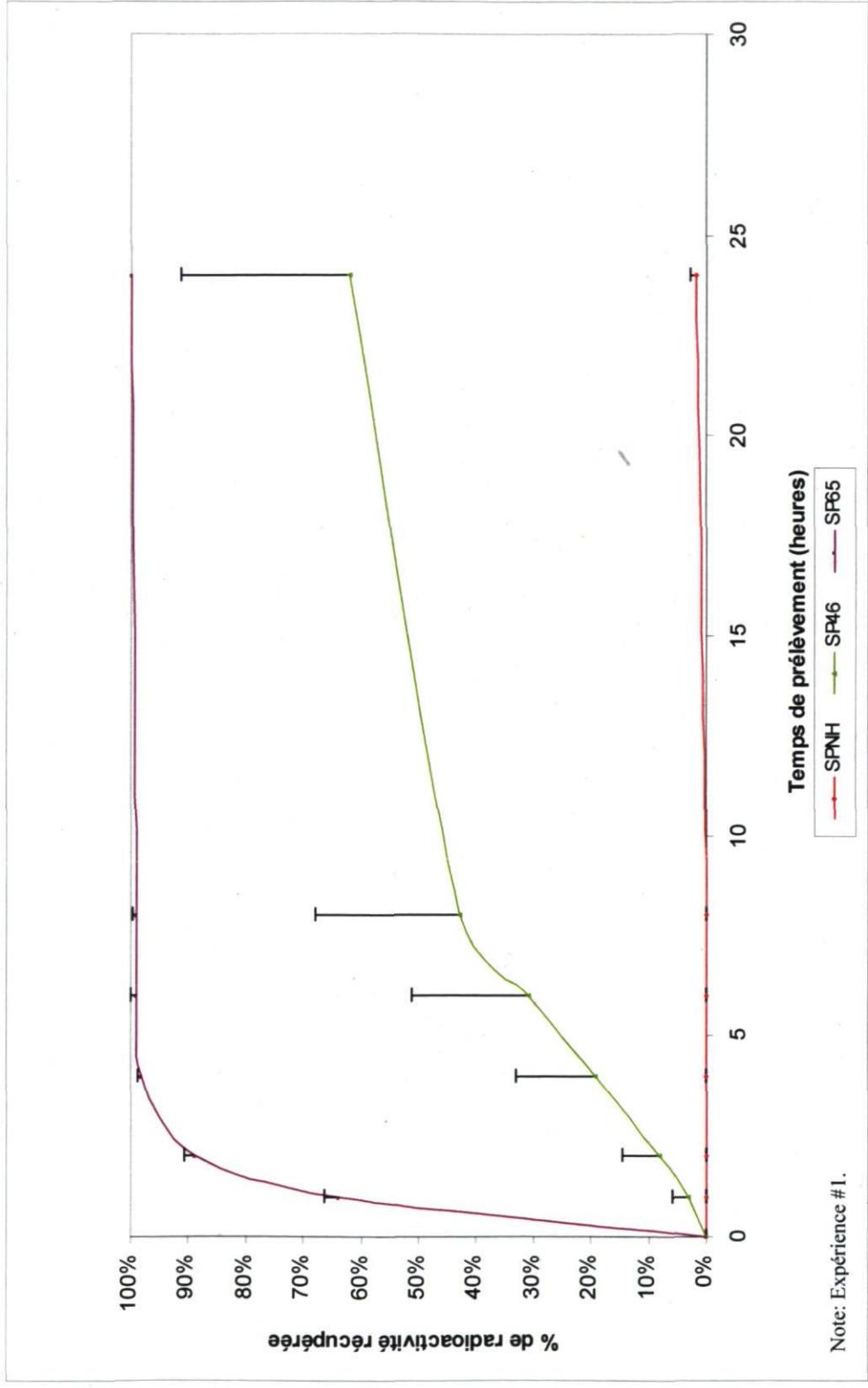


Figure 23: Profils de pénétration cutanée de l'hydrocortisone pour les différents échantillons testés.

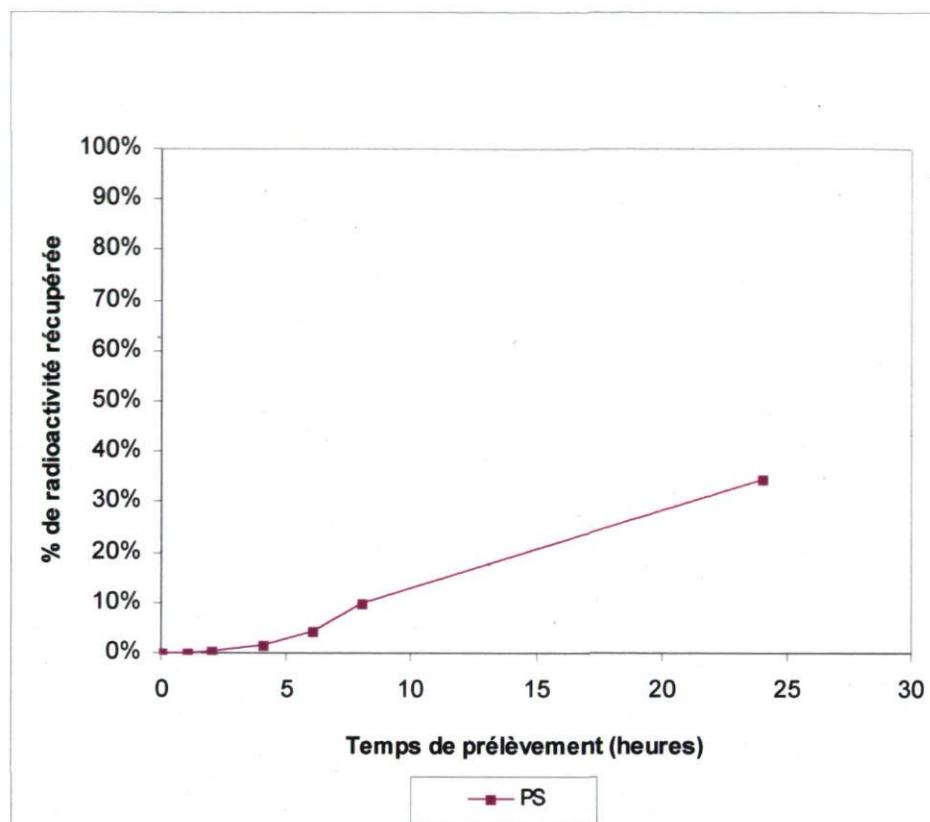


Figure 24: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant la peau de souris.

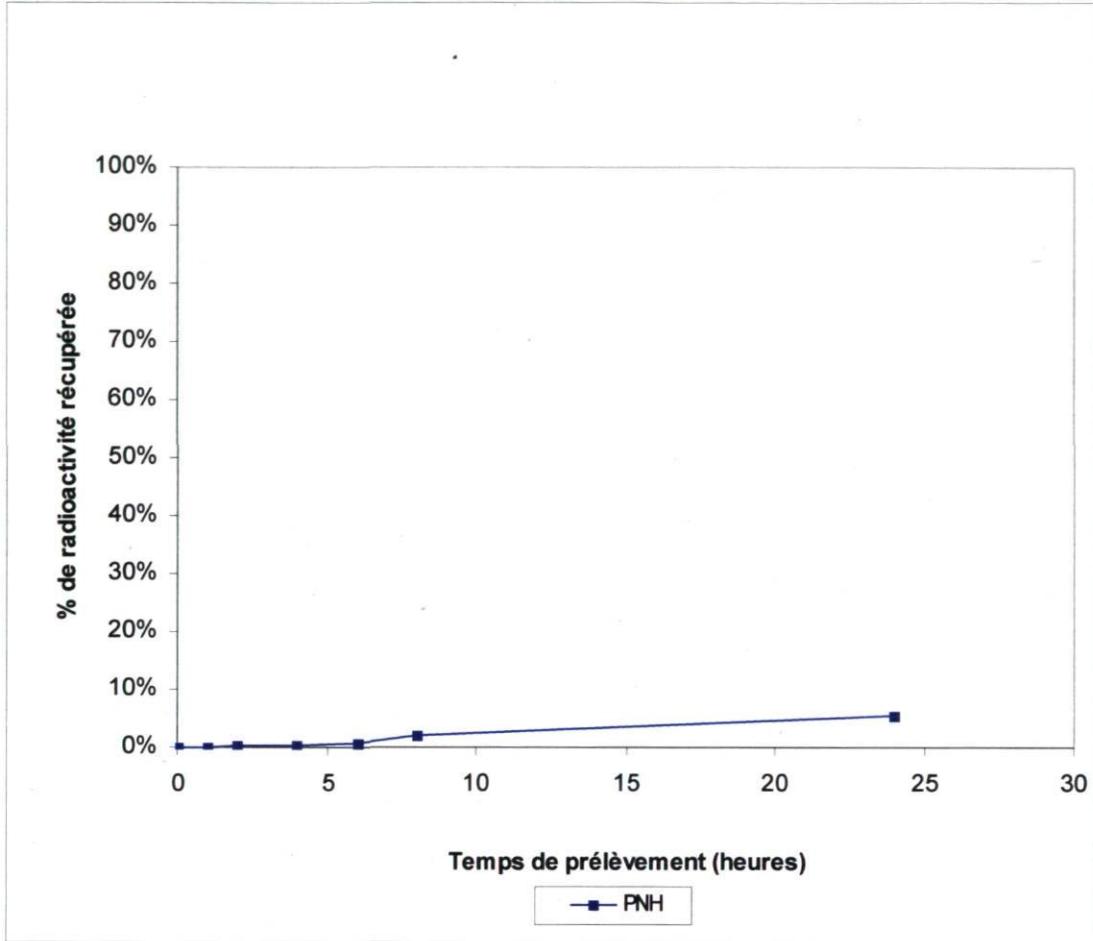


Figure 25: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant la peau normale humaine.

Tableau 20: Pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'hydrocortisone

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>SPNH</b> <b>n=5</b>	5%	7%	10%	15%	20%	93%
<b>PS</b> <b>n=3</b>	0%	0%	1%	2%	5%	26%
<b>SPS46</b> <b>n=5</b>	0%	1%	2%	4%	8%	27%
<b>SPS65</b> <b>n=5</b>	11%	29%	57%	76%	87%	99%

*Note: Expérience #4*

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>SPNH</b> <b>n=17</b>	0%	0%	0%	0%	1%	5%

*Note: Expérience #5 substitut de peau normale humaine*

PEAU	1 heure	2 heures	4 heures	6 heures	8 heures	24 heures
<b>PNH</b> <b>n=5</b>	0%	1%	2%	4%	7%	14%

*Note: Expérience #6 peau normale humaine*

Le tableau 20 présente les résultats obtenus à titre de répétition complète de l'expérimentation précédente permettant d'observer le passage transdermique de l'hydrocortisone. Malheureusement, encore une fois, l'échantillon contrôle de peau humaine n'a pu être obtenu au moment de réaliser l'expérimentation et une expérience isolée a dû être refaite (Tableau 20, expérience #6, figure 28).

Par ailleurs, au moment d'interpréter les résultats, les pourcentages obtenus avec les SPNH ont présenté des valeurs très surprenantes (5%, 7%, 10%, 15%, 20% et 93% pour les temps 1, 2, 4, 6, 8 et 24 heures respectivement) (Tableau 20, expérience #4, figure 26). Jamais les SPNH n'avaient été aussi peu performants. Nous avons donc envisagé de refaire une expérience isolée utilisant des SPNH envers l'hydrocortisone. Il faut préciser, qu'ainsi, l'analyse statistique se complique mais qu'elle prend bel et bien en considération les différentes expériences.

Encore une fois, les valeurs obtenues pour la PNH ont été supérieures à ce qui est trouvé pour nos SPNH mais suivant l'analyse statistique, ces dernières ne sont pas significatives; 14% versus 5% au temps 24 heures pour la PNH et le SPNH respectivement (Tableau 20, expérience 6, figure 28) et (Tableau 20, expérience 5, figure 27). Les résultats sont en accord avec ceux du tableau 19.

Au niveau de nos substituts pathologiques, ils affichent des valeurs, à 24 heures, allant de 27% à 99% pour les lignées ♀46 et ♀65 ans respectivement. Ces valeurs, de pourcentages plus importants, comparées à la fois aux contrôles de PNH (14%) et PS (26%), ainsi qu'aux substituts cutanés préparés à partir de cellules saines (5%) sont comparables à celles obtenues lors de l'expérience précédente et qui apparaissant au tableau 19.

Afin de bien visualiser les résultats, des profils de pénétration cutanée sont présentés aux figures 26, 27 et 28.

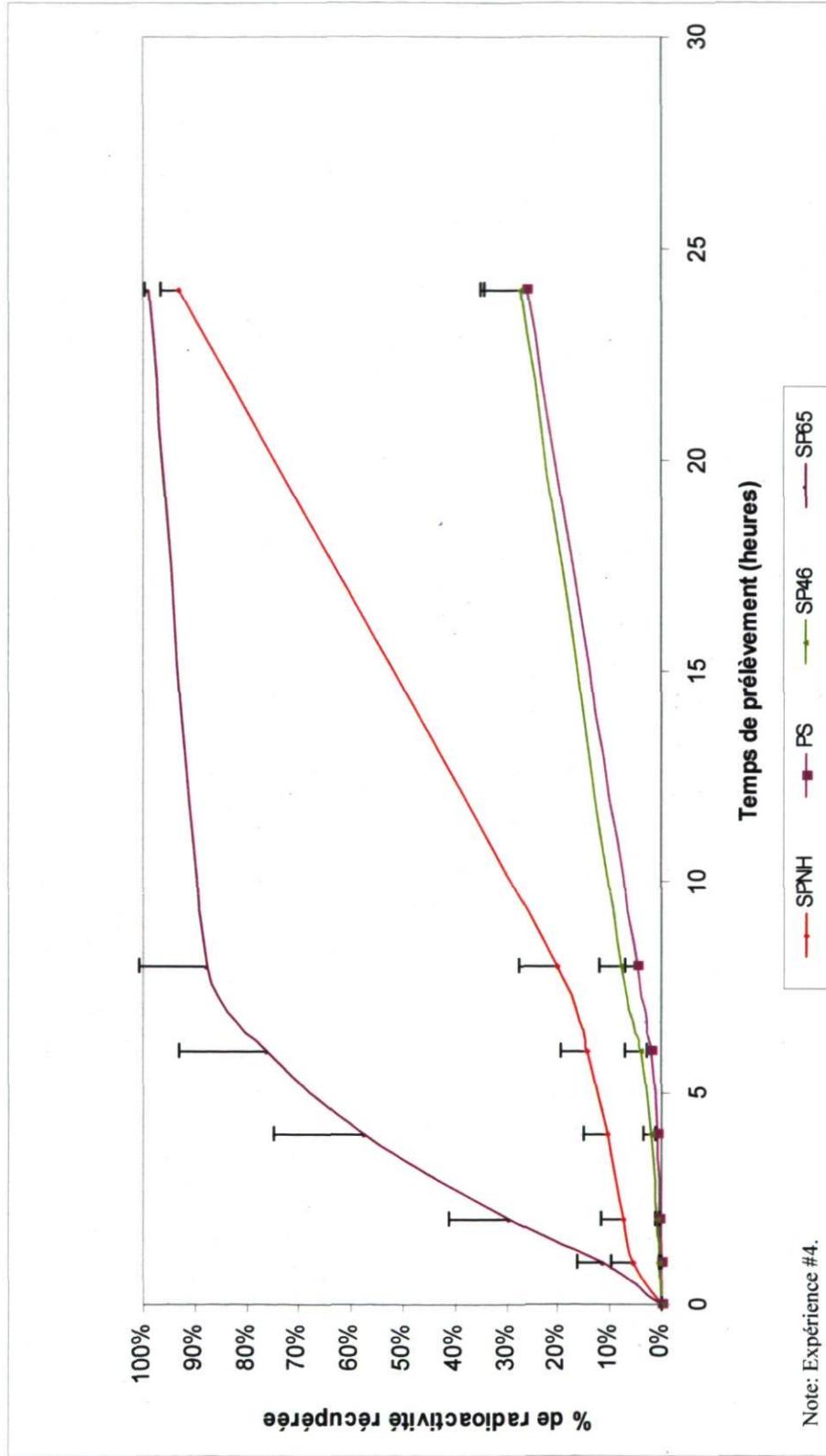


Figure 26: Profils de pénétration cutanée de l'hydrocortisone pour les différents échantillons testés

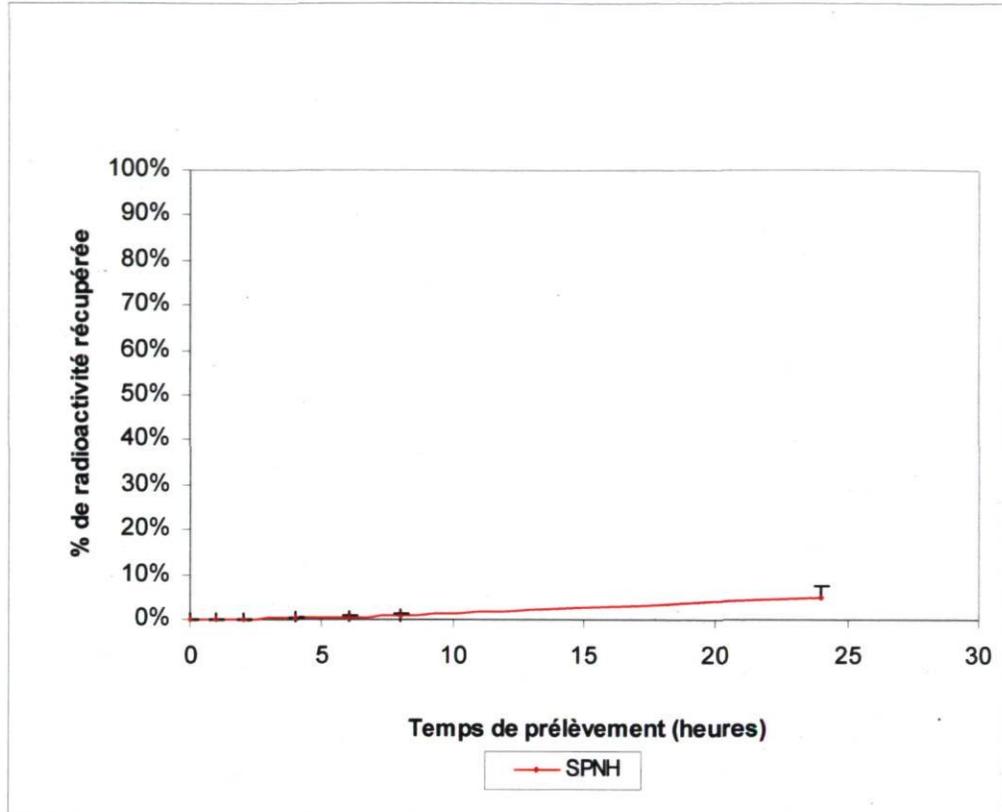


Figure 27: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant nos substituts de peau normale humaine.

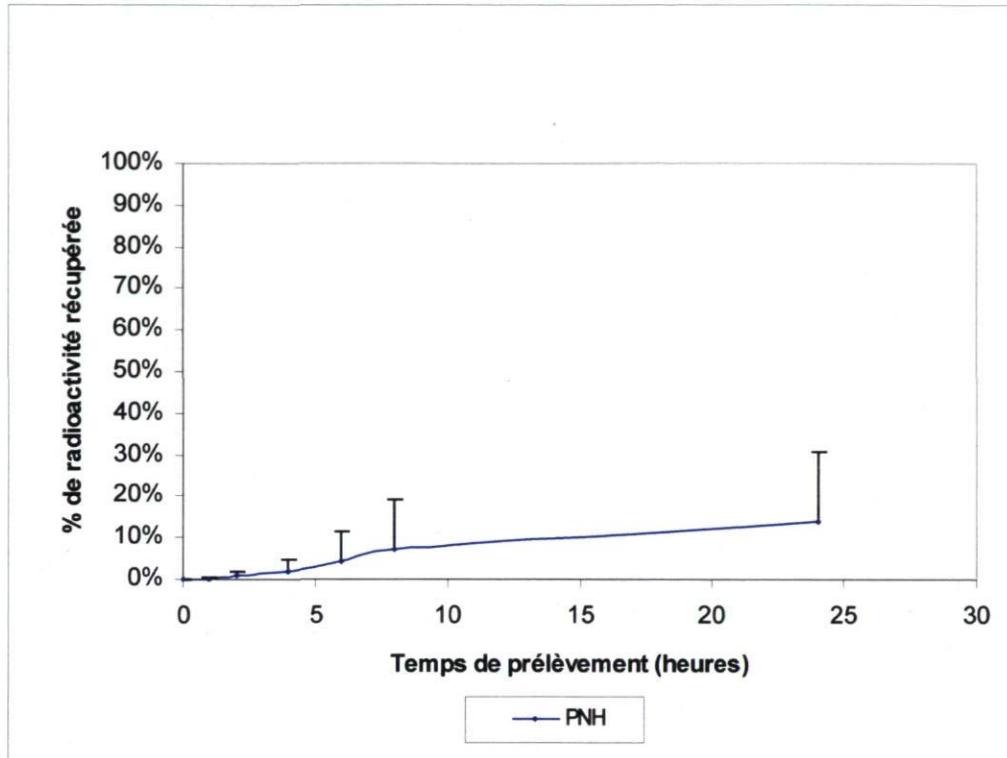


Figure 28: Profil de pénétration cutanée de l'hydrocortisone utilisant la peau normale humaine.

Tableau 21: Résultats combinés des pourcentages de radioactivité récupérée lors du passage transdermique de l'hydrocortisone provenant de toutes les expériences

<b>PEAU</b>	<b>1 heure</b>	<b>2 heures</b>	<b>4 heures</b>	<b>6 heures</b>	<b>8 heures</b>	<b>24 heures</b>
<b>PNH</b>	0%	0%	0%	0%	0%	3%
<b>SPNH</b>	0%	0%	0%	0%	0%	4%
<b>PS</b>	0%	0%	1%	4%	8%	32%
<b>SPS46</b>	2%	4%	11%	18%	25%	44%
<b>SPS65</b>	37%	59%	78%	87%	93%	99%

Après 24 heures d'expérimentation, le substitut de peau normale humaine aura laissé passer 4% de substance radioactive comparativement à 3% et 32% pour les contrôles de peaux normales humaine et de souris respectivement. C'est toutefois après 6 heures d'expérimentation que le substitut de peau normale humaine commence à se distinguer du contrôle animal, en démontrant une différence plus importante à 24 heures, 4% versus 32% ( $P < 0,001$ ). Après 24 heures de diffusion percutanée, le SPNH demeure dans les mêmes valeurs que ce qui est retrouvé pour la PNH sans différence significative ( $P = 0,3417$ ) (Tableau 21).

Quant aux substituts psoriasiques, que ce soit ceux faits à partir de cellules provenant de la femme de 46 ans ou celles provenant de la femme de 65 ans, il est possible d'observer des pourcentages de radioactivité récupérée beaucoup plus importants comparativement à ceux faits de cellules saines; 44% et 99% comparativement à 4% après 24 heures d'expérimentation ( $P < 0,001$ ) et ( $P < 0,001$ ) respectivement (Tableau 21).

En comparant les résultats des substituts psoriasiques entre eux, il est possible de constater qu'à partir de la première heure et ce, jusqu'à 24 heures d'expérimentation, les résultats sont significativement différents ( $P < 0,001$ ) (Tableau 21). La figure 29 présente les moyennes logarithmiques des résultats.

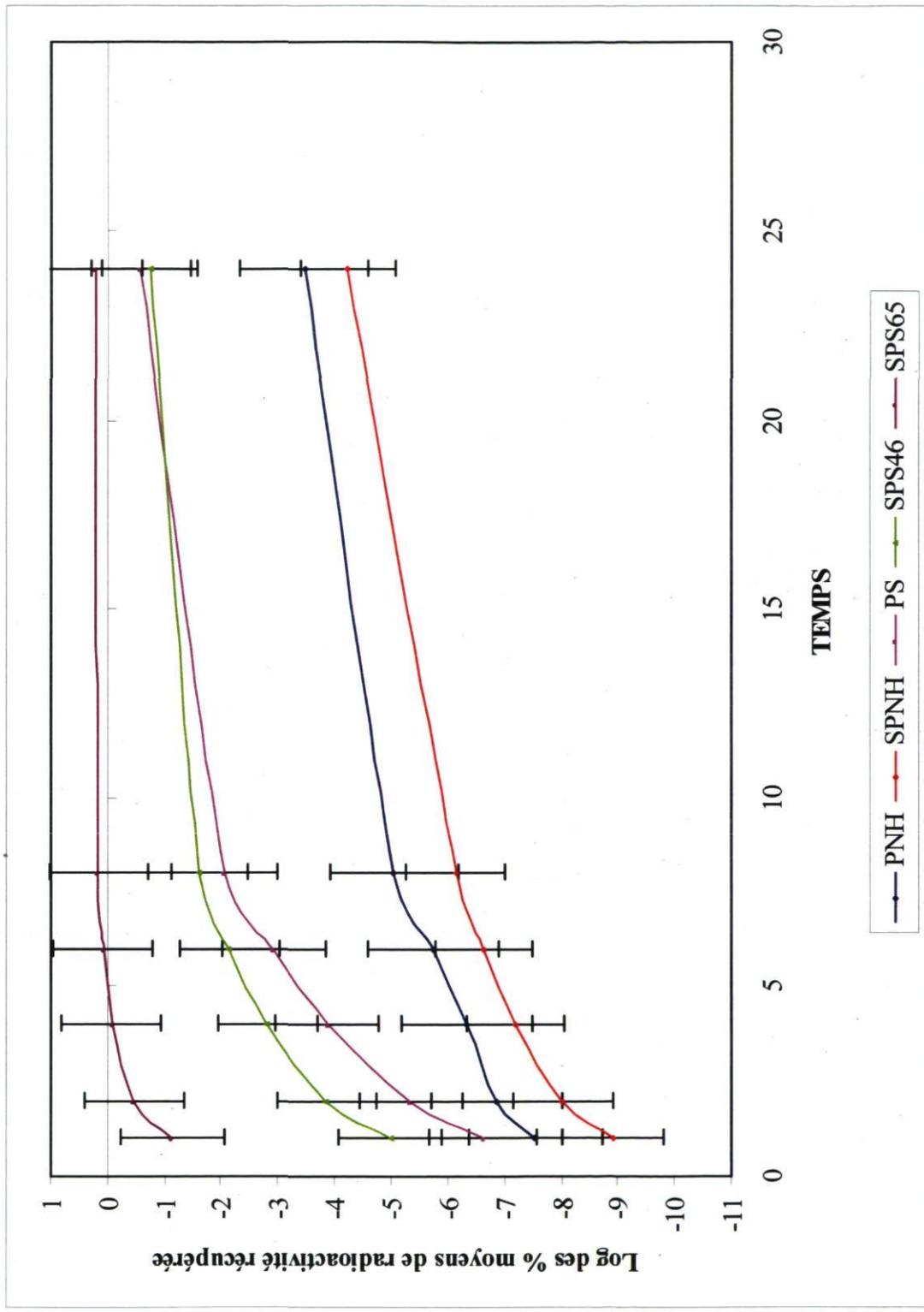


Figure 29: Profils de pénétration cutanée de l'hydrocortisone pour les différents échantillons testés (expériences 1, 2, 3, 4, 5, 6)

## **Chapitre 4 Discussion**

Il est présentement difficile de tester les médicaments anti-psoriasiques sur de nombreux échantillons de peaux pathologiques en raison de problèmes éthiques, de disponibilité et de variations interindividuelles. Ainsi, les formulations de médicaments proposées à la population atteinte de psoriasis ne sont pas bien adaptées à leur situation réelle. Puisque la pénétration cutanée de drogues est une méthode qui offre un grand potentiel et qui plus est particulièrement attrayante comparativement aux méthodes conventionnelles d'injection ou d'administration orale, le développement d'outils permettant l'expérimentation de cette méthode en laboratoire est souhaitable. Ainsi, grâce au génie tissulaire, nous avons développé un nouveau modèle de substituts cutanés pathologiques dans le but éventuel de l'utiliser comme outil dermopharmacologique.

L'obtention des différents profils de pénétration cutanée qui ont été présentés à la section « résultats » de ce mémoire, nous a permis de recueillir des informations nécessaires à la caractérisation de ce modèle. Afin d'analyser l'efficacité de la barrière cutanée des substituts de peaux normales humaine et psoriasique, créés par la méthode d'auto-assemblage, les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'échantillons contrôles de peaux normales humaine et animale (souris nue). Enfin, le texte qui suit discute également de résultats obtenus par d'autres équipes.

### **4.1 Échantillons de peau**

#### **4.1.1 Comparaison entre les substituts de peau normale humaine (SPNH) et la peau normale humaine (PNH)**

L'un des critères les plus importants pour l'évaluation du fonctionnement de n'importe quel système de culture de peau *in vitro* est la formation d'une barrière protectrice compétente à la perméabilité étant donné que les composés appliqués au niveau topique passent premièrement par le SC avant d'agir sur les cellules viables. Précisément, nos résultats démontrent que les substituts de peau normale humaine (SPNH) présentent une fonction

barrière qui se rapproche étonnamment de ce qui est observé pour la peau normale humaine et ce, pour les trois molécules testées. À notre connaissance, il n'y a encore aucun modèle présenté dans la littérature qui ait démontré une résistance à la pénétration aussi efficace.

Or, plusieurs recherches ont été faites en ce qui concerne l'absorption percutanée de différents produits sur peaux reconstruites. Par exemple, dans le travail réalisé par Schmook *et coll.*, les propriétés de pénétration au travers la peau humaine, la peau de cochon et la peau de rat ont été comparées à celles de différents modèles de peau reconstruite, soit le Graftskin® LSE® (équivalent de peau) et le SkinEthic® HRE (épiderme humain reconstruit); en utilisant quatre molécules couramment utilisées pour usage topique en dermatologie (l'acide salicylique, l'hydrocortisone, le clotrimazole et la terbinafine). Ces molécules, aux différentes caractéristiques de polarité, ont mené à la conclusion générale que les modèles de peaux reconstruites actuellement disponibles ne pouvaient permettre des études de pénétration *in vitro* représentatives de la réalité (Schmook, 2001).

Aussi, toujours dans ce même contexte, des recherches ont été faites en comparant d'autres modèles commerciaux de peaux reconstruites soit Testskin® Living Skin Equivalent, Skin Models ZK 1300, EpiDerm®. et ont permis de conclure cette fois, que les modèles de peaux reconstruites étaient prometteurs et adéquats pour étudier l'effet des substances chimiques appliquées topiquement, mais que les propriétés de fonction barrière se devaient d'être améliorées (Ponec, 2002). Des études ont également été réalisées précédemment au sein de notre laboratoire en utilisant des substituts cutanés faits sur gels de collagène et avaient démontré des résultats très prometteurs. Sans être aussi performants que les contrôles de peaux normales humaine et murine, il a été démontré que ces échantillons pouvaient être sélectifs de par leur reconnaissance des différentes propriétés physico-chimiques des molécules étudiées (Michel, 1995).

Au regard de ces précédents articles, nous constatons que nos récents résultats se démarquent de façon significative et affichent des profils de passage transdermique pour les différentes molécules testées qui mettent en valeur une fonction barrière efficace chez les

substituts de peau normale humaine et que ces derniers se rapprochent considérablement de ce qui est retrouvé pour une peau normale humaine provenant de réduction mammaire.

Nos expériences démontrent aussi que les différences de perméabilité dans la peau, soit animale, humaine ou reconstruite dépendent de la nature de la molécule testée, ce qui rejoint les résultats d'études publiés précédemment (Regnier, 1993). Or, il semble que notre modèle de substituts de peau normale humaine soit également capable de faire des distinctions de pénétration entre les molécules ayant des propriétés physico-chimiques différentes. En effet, l'ordre de pénétration des molécules est le même entre les substituts de peau normale humaine et le contrôle humain : caféine > hydrocortisone > acide benzoïque.

#### **4.1.2 Comparaison entre les substituts de peau normale humaine (SPNH) et les substituts de peau psoriasique (SPS)**

Suite à ce travail, il a été trouvé que les substituts de peau psoriasique étaient significativement plus perméables que les contrôles mais également plus perméables que les substituts de peau normale humaine. La littérature est claire quant aux différences retrouvées entre des peaux *in vivo* normale ou psoriasique. Il apparaît que les peaux pathologiques présentent une fonction barrière déficiente et toujours plus perméable que les échantillons de peau normale. Il est possible d'appuyer ces faits par les travaux récemment publiés par notre équipe au niveau de la désorganisation lipidique du *SC* qui confirment, que tout changement dans l'organisation et la composition lipidique de la couche cornée entraîne des changements dans la qualité de la fonction barrière épidermique. Ces résultats, au niveau de la caractérisation physico-chimique du substitut pathologique, ont effectivement montré la présence d'un désordre plus élevé des lipides et un changement de conformation des protéines dans le *SC* des substituts psoriasiques lésionnels comparativement au *SC* de substituts de peaux normales. Notre modèle permet également de corréler l'aspect macroscopique, les observations histologiques, l'organisation lipidique et la structure des protéines des substituts cutanés psoriasiques avec la sévérité du psoriasis chez le patient (Bernard, 2007). Dans cette présente étude, les dames âgées de 46 et 65 ans n'avaient pas le même pourcentage d'atteinte de la pathologie, 15% versus 20%

respectivement. Nous croyons que ce facteur peut expliquer en partie les différences parfois significatives observées entre ces deux lignées, mais aussi l'âge et le temps total depuis lequel ces femmes sont atteintes de psoriasis sont d'autres facteurs qu'il ne faut pas négliger.

Le *SC* n'a pas la même structure et les mêmes pouvoirs de fonction barrière au sein d'une peau saine qu'au sein d'une peau malade. Entre autres, parmi les conditions qui caractérisent le psoriasis, sont observés des niveaux d'eau transépidermique perdue accrus (entre un et vingt fois dépendamment de la sévérité de la lésion psoriasique) (Motta, 1994; Tagami, 1985). Dans la dermatite atopique, le psoriasis est aussi associé à la synthèse perturbée de filagrine qui mène à une capacité réduite de retenir l'eau dans le *SC* (Marstein, 1973). Il est observé aussi des changements dramatiques dans la structure des lipides du *SC* (Fartasch, 1997) telle une perturbation dans la libération des lipides provenant des corps lamellaires pendant la formation du *SC* (Ghadially, 1996) ainsi qu'un changement global dans la composition lipidique (Motta, 1994). Ces changements, dans les niveaux de cholestérol et d'acides gras altérés, contribuent à la cohésion défectueuse et à la desquamation des cornéocytes (Harding, 2004).

La composition des lipides liés de façon covalente est différente dans le *SC* psoriasique comparativement au *SC* sain (Harding, 2004). Des perturbations dans la perméabilité de la barrière épidermique, conséquence de facteurs environnementaux ou d'une erreur innée du métabolisme, peuvent avoir de profonds effets sur la qualité globale de la peau. Alors, une barrière défectueuse n'est pas simplement une conséquence secondaire, mais plutôt, un élément critique menant à l'inflammation dans différents désordres de cornification (Elias, 2001). Il a déjà été répertorié que la sévérité du désordre pouvait être reliée au degré d'anormalité de la barrière (Elias, 2001).

## 4.2 Évaluation de la fonction barrière

### 4.2.1 Acide Benzoïque

À première vue, en ce qui concerne l'acide benzoïque, nous nous attendions à retrouver une cinétique de pénétration plus rapide que pour la caféine et l'hydrocortisone. Dans la littérature, il a été rapporté pour des études *in vivo* réalisées avec des rats nus, que l'acide benzoïque et la caféine étaient rapidement éliminés par excrétion urinaire après l'administration topique. Vingt-quatre heures après, l'urine contenait 81% et 87% des montants totaux de caféine et d'acide benzoïque respectivement (Rougier, 1987).

L'absorption percutanée varie substantiellement selon le type de molécule administrée et peut varier considérablement chez l'humain dépendamment du site anatomique. Par ailleurs, le grade d'absorption d'une molécule est connu pour dépendre des conditions d'application, qui peuvent en partie expliquer les résultats considérablement variables publiés pour un même produit chimique administré aux mêmes espèces. En effet, il y a certains facteurs qui peuvent être contrôlés selon la méthodologie choisie et d'autres facteurs qui dépendent plutôt de l'état fonctionnel de la barrière cutanée et qui ne peuvent pas être contrôlés. Les résultats dus à des changements dans la méthodologie sont relativement faciles à expliquer et à prédire mais les différences entre les résultats sont plus difficiles à expliquer dans l'absorption d'une molécule entre différentes espèces ou entre différentes sites anatomiques (Rougier, 1987).

Lors de la réalisation de nos expériences, en ce qui concerne les facteurs qui peuvent influencer l'absorption percutanée, nous avons contrôlé le site d'application de la molécule, le véhicule d'application de la molécule, la quantité appliquée, le temps de contact avec la peau et la température du système des cellules de Franz. Nos résultats montrent bien que dans la peau normale humaine, la perméabilité varie significativement selon les caractéristiques physico-chimiques de la molécule administrée mais selon une pénétration moins importante toutefois en ce qui concerne l'acide benzoïque.

La plupart des études comparant l'absorption percutanée chez l'homme versus chez les animaux, ont été basées sur des données dans la littérature impliquant des résultats de différentes équipes qui employaient souvent des méthodologies diverses (Rougier, 1987). Suite à toutes ces différences observées dans la littérature, l'Organisation pour la Coopération et le Développement Économiques (directives d'OCDE) a émis des directives et écrit des documents de conseils pour des études d'absorption percutanée. Ces derniers proposent trois composés modèles, soit la caféine, l'acide benzoïque et la testostérone, afin de guider les chercheurs dans la démonstration de la fiabilité de leur laboratoire. Pour notre part, le choix de notre molécule à caractère lipophile s'est tourné vers l'hydrocortisone en raison de ses qualités remarquées dans le traitement du psoriasis.

La stabilité de l'acide benzoïque, qui est utilisé comme modèle par l'OCDE pour des études d'absorption percutané, a été évaluée dans des fluides récepteurs des cellules de diffusion de Franz. Selon les résultats de Bodé *et coll.*, l'addition d'un agent de conservation à la solution réceptrice est recommandée pour des expériences de pénétration percutanée à long terme (24 heures). En effet, tout comme nous, des pourcentages de pénétration plus faibles que ceux attendus avaient été retrouvés.

Fait intéressant à noter en ce qui concerne nos propres expériences, la reproductibilité n'a pas été remise en cause. Ainsi, les différences observées pour les profils de pénétration de l'acide benzoïque, ne peuvent pas s'expliquer seulement par des changements au niveau de la méthodologie ou des techniques utilisées. Le travail réalisé par l'équipe de Bronaugh *et coll.* en 1982 sur l'absorption de différentes molécules à travers la peau d'espèces d'animaux sélectionnées et comparée à la peau normale humaine amène des explications intéressantes (Bronaugh, 1982).

En effet, dans ce travail, une des conclusions est que le modèle animal à choisir pour remplacer la peau normale humaine est dépendant du composé à utiliser. Pour l'acide benzoïque et l'acide acétyle salicylique, les peaux de porc et de rat seraient les modèles à privilégier afin de rejoindre les propriétés d'une peau humaine (Bronaugh, 1982). L'acide

benzoïque présente une perméabilité qui augmente selon l'ordre suivant: porc < rat < humain < souris nue (Bronaugh, 1982).

Quant à nos résultats, ces derniers montrent que pour l'acide benzoïque, la perméabilité augmente selon l'ordre suivant: peau normale humaine < substitut de peau normale humaine < peau de souris nue < substitut de peau psoriasique. Précisément, les pourcentages de radioactivité récupérée pour l'acide benzoïque montrent des différences significatives entre la fonction barrière de la peau normale humaine et celle de nos substituts de peau normale reconstruite (figure 18). Malgré ces différences significatives, les profils de pénétration de notre substitut cutané normal restent très proches du profil de pénétration de la peau normale humaine et demeurent moins perméables que la peau de souris. On note aussi une différence significative de profils de pénétration entre les deux substituts psoriasiques testés. Afin d'apprécier la variabilité retrouvée au sein des différents types d'échantillons, les profils combinés se retrouvent **en annexe**.

#### 4.2.2 Caféine

La caféine est connue comme étant un composé qui pénètre facilement la peau (Potard, 1999). Dans le travail de Potard *et coll.*, il est mentionné que pour la majorité des substances étudiées, c'est dans le SC que les plus grandes quantités sont retrouvées à l'exception de la caféine qui se présente sous une quantité minimale (Potard, 1999). Akomeah *et coll.* ont aussi étudié la pénétration cutanée de la caféine et évalué l'influence de la température. Il va s'en dire qu'une amélioration de l'absorption percutanée est observée proportionnellement à une augmentation de la température. Les auteurs attribuent cette amélioration à l'augmentation de la fluidité des lipides du SC, ce qui provoque également une augmentation des espaces intercellulaires ayant pour conséquence cette augmentation de la perméabilité (Ohara, 1995; Clarys, 1998). Aux températures normales, les lipides sont beaucoup plus rigides, organisés, proches et cela gêne la diffusion des molécules à travers le SC.

Dans l'étude d'Akomeah *et coll.*, les propriétés de pénétration cutanée de la caféine ont été les moins affectées par la gamme de températures utilisées. Un autre paramètre a également

été évalué, soit l'énergie d'activation. Ainsi, des données plus basses ont été enregistrées pour la caféine comparativement aux autres molécules. En général, l'énergie d'activation est une caractéristique importante lors de la diffusion d'une molécule (Blank, 1967). Les molécules non polaires pénétreraient plus facilement par le sentier lipophile en raison de leur plus haut coefficient de partition  $SC / \text{eau}$ . L'énergie d'activation tient donc compte des processus impliqués dans la diffusion d'un pénétrant à travers l'épiderme (incluant la diffusion de pénétrant dans le véhicule, la partition du véhicule dans le  $SC$ , la diffusion dans le  $SC$ , la partition du composé dans le  $SC$  et l'intérieur de la couche épidermique, la diffusion par la couche épidermique et finalement la partition dans la solution du récepteur) (Akomeah, 2004).

Sur cette base, il est surprenant de constater que la caféine affiche l'énergie d'activation la plus petite des trois composés examinés. Ce résultat suggère que la caféine, molécule amphiphile comparativement à nos deux autres composés choisis, pénètre la peau plus aisément que d'autres pénétrants. Il a été mentionné que la caféine, grâce à ses caractéristiques amphiphiles, pouvait traverser la peau par le sentier lipophile (Dias, 1999). Au contraire, Treffel *et coll.*, ont suggéré que l'itinéraire principal de la caféine à travers la peau était la voie transcellulaire de la matrice de kératine, le chemin plutôt hydrophile (Treffel, 1994).

Il est bien connu que la peau a une capacité pour la conservation de médicaments, appelé effet réservoir (Walter, 1988). En ce qui concerne la conservation topique de molécules, on pense généralement qu'à de plus hautes valeurs de  $\log P$  ( $o/w$ ), il y a une plus grande probabilité que la molécule soit conservée dans la peau mais ceci ne semble pas toujours respecté (Hagedorn-Leweke, 1998; Potard, 2000). Étant donné la nature polaire de la caféine, la formation de liaison hydrogène de la molécule avec la kératine dans les kératinocytes ou même aux groupes de céramides dans des lipides intercellulaires est possible. Une telle liaison localisée aux lipides de la peau pourrait mener la caféine à la pénétration et à sa conservation dans le  $SC$ . En regardant l'ensemble des conclusions du travail de Akomeah *et coll.*, et des différents travaux publiés dans la littérature jusqu'à maintenant concernant l'évaluation de la pénétration cutanée, nous comprenons et sommes

en mesure d'apprécier toute la complexité reliée à ce genre d'études où plusieurs paramètres entrent en jeu. Dans le but d'apprécier la variabilité inter-échantillons et inter-expérimentations, les profils de chacun des échantillons sont présentés **en annexe**.

### 4.2.3 Hydrocortisone

Le flux maximum ( $J_{max}$ ) observé pour différents solutés à travers la peau est fonction principalement du poids moléculaire de la molécule et de son point de fusion. La capacité de liaison hydrogène du soluté doit également être prise en considération (Magnusson, 2006). Le flux maximum  $J_{max}$  d'un soluté à travers la peau est également déterminé par sa solubilité ainsi que par sa diffusion dans le SC. La distribution des molécules dans les couches les plus profondes de la peau est déterminée par différents paramètres comme la capacité de la molécule à se lier aux protéines et l'effet « sink » encouru par le flux sanguin (Magnusson, 2006).

Nos résultats obtenus avec la molécule hydrocortisone nous ont permis de constater que la reprise d'expérience n'est pas souhaitable en absorption percutanée. En effet, selon les études de Magnusson *et coll.* le comportement d'un stéroïde est complexe. Du fait, de cette complexité et qu'il faille prendre en considération autant de facteurs lors d'une même manipulation, ne facilite pas l'interprétation des résultats et la tâche de devoir marier les résultats d'expériences différentes. Toutefois, le modèle statistique prend bel et bien en considération ces facteurs mais demande une analyse plus judicieuse des données. Certains facteurs hors de notre contrôle ont fait en sorte que les expériences ont été réalisées à des moments différents (absence de la patiente au moment de la nécessité de disposer d'un échantillon contrôle humain). Pour toutes ces expériences faites où l'hydrocortisone a été utilisée, il est possible de bien visualiser la variabilité retrouvée pour les différents échantillons dans les **annexes**. En regardant plus en détails les résultats, il est possible d'observer deux profils de pénétration associés aux échantillons de peau normale humaine. En effet, trois de ces derniers se sont démarqués de par une plus grande perméabilité; soit les 11 PNH-1, 9 PNH-3 et 11 PNH-4 (voir page 128). Quant aux résultats observés au niveau des substituts de peau normale humaine, deux profils ont également été remarqués mais d'une façon beaucoup plus équilibrée, c'est-à-dire qu'un même nombre de substituts

s'est retrouvé partagé dans chacun de ces profils. Enfin, en ce qui concerne les substituts psoriasiques, beaucoup plus de variabilité reliée aux lignées cellulaires a été notée. Les échantillons conçus avec les cellules de la femme de 46 ans (voir page 131) présentent plus de variabilité que ceux faits à partir des cellules de la femme de 65 ans (voir page 132).

## Chapitre 5 Conclusions et recommandations

Les résultats précédemment obtenus par notre groupe de recherche, où la fabrication de substituts cutanés psoriasiques a été mise au point selon la méthode d'auto-assemblage, ont confirmé certaines caractéristiques du phénotype de la maladie. Entre autres, l'épaississement de l'épiderme et de la couche cornée, la disparition de la couche granuleuse, la désorganisation des cellules de l'épiderme et les problèmes de différenciation (Jean, 2008; Lapointe, 2005), ainsi que la désorganisation lipidique de notre substitut cutané psoriasique en comparaison à la peau normale humaine et aux substituts de peau normale humaine (Bernard, 2007). Toutes ces caractéristiques ont été notre point de départ pour suggérer l'hypothèse spécifique démontrée tout au long de nos expériences, à savoir que les substituts psoriasiques devraient présenter une barrière cutanée plus perméable que les autres types d'échantillons testés. Notre présent travail nous aura permis de prouver que les substituts cutanés sains, préparés selon la méthode d'auto-assemblage, offrent bel et bien une barrière cutanée efficiente, se rapprochant de celle de la peau normale humaine.

La libération de médicaments au niveau topique est une importante façon de traiter les maladies cutanées mais aussi certaines maladies systémiques. Les médicaments appliqués sur la peau ne sont habituellement pas évalués pour connaître leur véritable efficacité, leur site d'action et la quantité de médicament qui peut atteindre le site ciblé. Les études cliniques permettant d'évaluer l'efficacité des médicaments topiques sont coûteuses et très complexes. Par conséquent, des méthodes *in vitro* pouvant évaluer cette efficacité deviennent de bonnes alternatives (Silcox, 1990).

Dans les expériences que nous avons réalisées, nous avons constaté que le comportement de nos substituts cutanés sains par rapport à l'absorption percutanée de molécules aux propriétés physico-chimiques différentes, était très similaire à celui de la peau normale humaine saine, contrairement à ce qu'est trouvé avec les modèles répertoriés présentement dans la littérature. Différentes méthodes et systèmes de culture de peau reconstruite *in vitro* ont été évalués comme modèles de pénétration percutanée, démontrant l'intérêt et la nécessité de trouver des modèles plus semblables à la peau humaine pour des études

d'absorption percutanée. La conclusion générale obtenue de ces études est que les propriétés de barrière de ces modèles sont faibles lorsqu'elles sont comparées à la peau humaine fraîche ou congelée; la qualité de la barrière a été, dans quelques cas, équivalente ou inférieure à celle de la peau de souris, de rat ou de cochon (Schmook, 2001). En les comparant à ces observations, les résultats de notre travail viennent confirmer une fois de plus que la qualité de la barrière de notre substitut de peau normale humaine est toujours moins perméable que la peau de souris et rejoint de façon convaincante la peau normale humaine et ce, pour toutes les molécules étudiées. Nous pouvons donc affirmer que notre substitut cutané possède une fonction barrière sélective comparable à la peau normale humaine.

En se référant aux tableaux présentés en introduction (Tableaux 5 à 9), nous croyons que notre modèle remplit de façon très respectable les exigences physiologiques et anatomiques trouvées pour les modèles *in vivo*, exigences nécessaires afin d'être utilisés en absorption percutanée. Selon le tableau 9, où des valeurs de perméabilité pour la caféine y sont présentées, nous déduisons que le modèle qui se rapproche le plus du nôtre est celui préparé par la compagnie MatTek Corporation (Ashland, MA, USA) et connu sous le nom « EpiDerm<sup>TM</sup> ». En effet, les valeurs obtenues pour cette molécule sont plus élevées d'un facteur 4, par rapport à celles obtenues avec un épiderme de peau normale humaine comparativement au modèle développé par L'Oréal (Paris, France) et connu sous le nom « EpiSkin<sup>®</sup> » ainsi que celui développé par les Laboratoires « SkinEthic » (Nice, France) qui présentent respectivement des valeurs 50 et 70 fois supérieures à ce même contrôle. Quant à notre modèle, aucune différence significative n'a été enregistrée comparativement à la peau normale humaine en ce qui concerne cette même molécule.

Ainsi, nous croyons que notre modèle remplit de façon très respectable les exigences physiologiques et anatomiques trouvées pour les modèles *in vivo*, exigences nécessaires afin d'être utilisés en absorption percutanée. Quant au modèle psoriasique, la plus grande perméabilité retrouvée respecte ce qui est retrouvé dans la littérature pour une peau pathologique *in vivo*.

D'autres recherches seront nécessaires afin de mieux comprendre tous les facteurs impliqués dans l'absorption percutanée de substances appliquées topiquement. Pour ce faire, il serait souhaitable de disposer d'un laboratoire de dermatopharmacologie pour des essais *in vitro* dédiés à une pathologie bien précise. Ainsi, la détermination de la pénétration cutanée de drogues anti-psoriasiques pourrait être faite pour la première fois sur plusieurs échantillons de peaux malades, mettant en évidence la fonction barrière de la peau psoriasique reconstruite par génie tissulaire. Toujours dans ce contexte de laboratoire dermatopharmacologique, des analyses histologiques, immunochimiques et ultrastructurales pourraient être effectuées sur les tissus récoltés après expérience en absorption percutanée. Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer les vitesses d'absorption, les quantités de principe actif et de métabolites ayant diffusé au travers de la peau. Nous souhaitons que ces données puissent éventuellement servir à améliorer les formulations des médicaments actuels et améliorer la compréhension de leurs mécanismes d'action.

## Bibliographie

1. Abernethy, J.L., R.L. Hill, et L.A. Goldsmith, *epsilon-(gamma-Glutamyl)lysine cross-links in human stratum corneum*. J Biol Chem, 1977. 252(6): p. 1837-9.
2. Akomeah, F., et coll., *Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants*. Eur J Pharm Sci, 2004. 21(2-3): p. 337-45.
3. Baker, J.R., et coll., *The binding of topically applied glucocorticoids to rat skin*. Br J Dermatol, 1977. 96(2): p. 171-8.
4. Barker, C.L., et coll., *The development and characterization of an in vitro model of psoriasis*. J Invest Dermatol, 2004. 123(5): p. 892-901.
5. Baron, J.M., et coll., *Expression of multiple cytochrome p450 enzymes and multidrug resistance-associated transport proteins in human skin keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2001. 116(4): p. 541-8.
6. Barry, B.W., *Dermatological Formulations: percutaneous absorption. Drugs and the pharmaceutical sciences*. Drugs and the pharmaceutical sciences. Vol. 18. 1983, New York: M. Dekker.
7. Barry, B.W., *Breaching the skin's barrier to drugs*. Nat Biotechnol, 2004. 22(2): p. 165-7.
8. Beetge, E., et coll., *The influence of the physicochemical characteristics and pharmacokinetic properties of selected NSAID's on their transdermal absorption*. Int J Pharm, 2000. 193(2): p. 261-4.
9. Behl, C.R., et coll., *Permeability of thermally damaged skin: I. Immediate influences of 60 degrees C scalding on hairless mouse skin*. J Invest Dermatol, 1980. 75(4): p. 340-5.
10. Behne, M., et coll., *Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function*. J Invest Dermatol, 2000. 114(1): p. 185-92.
11. Ben-Shabat, S., et coll., *Vitamin D3-based conjugates for topical treatment of psoriasis: synthesis, antiproliferative activity, and cutaneous penetration studies*. Pharm Res, 2005. 22(1): p. 50-7.

12. Berking, C., et coll., *Photocarcinogenesis in human adult skin grafts*. *Carcinogenesis*, 2002. 23(1): p. 181-7.
13. Bernard, G., et coll., *Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro psoriatic skin model by ATR-FTIR and Raman spectroscopies*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1770(9): p. 1317-1323.
14. Blank, I.H., *Factors which influence the water content of the stratum corneum*. *J Invest Dermatol*, 1952. 18(6): p. 433-40.
15. Blank, I.H., *Penetration of Low-Molecular-Weight Alcohols into Skin. I. Effect of Concentration of Alcohol and Type of Vehicle*. *J Invest Dermatol*, 1964. 43: p. 415-20.
16. Blank, I.H., R.J. Scheuplein, et D.J. MacFarlane, *Mechanism of percutaneous absorption. 3. The effect of temperature on the transport of non-electrolytes across the skin*. *J Invest Dermatol*, 1967. 49(6): p. 582-9.
17. Blank, I.H., et coll., *The diffusion of water across the stratum corneum as a function of its water content*. *J Invest Dermatol*, 1984. 82(2): p. 188-94.
18. Bodé, S., *Stability of the OECD model compound benzoic acid in recepteur fluids of Franz diffusion cells*. *Pharmazie*, 2007. 62(6): p. 470-471.
19. Bodin, A., et coll., *Identification and allergenic activity of hydroxyaldehydes - a new type of oxidation product from an ethoxylated non-ionic surfactant*. *Contact Dermatitis*, 2001. 44(4): p. 207-12.
20. Brandrup, F., et coll., *Psoriasis in monozygotic twins: variations in expression in individuals with identical genetic constitution*. *Acta Derm Venereol*, 1982. 62(3): p. 229-36.
21. Braverman, I.M. et A. Keh-Yen, *Ultrastructural abnormalities of the microvasculature and elastic fibers in the skin of juvenile diabetics*. *J Invest Dermatol*, 1984. 82(3): p. 270-4.
22. Briggaman, R.A., *Localization of the defect in skin diseases analyzed in the human skin graft-nude mouse model*. *Curr Probl Dermatol*, 1980. 10: p. 115-26.
23. Bronaugh, R.L., R.F. Stewart, et E.R. Congdon, *Methods for in vitro percutaneous absorption studies. II. Animal models for human skin*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1982. 62(3): p. 481-8.

24. Bronaugh, R.L., et coll., *Methods for in vitro percutaneous absorption studies. I. Comparison with in vivo results*. Toxicol Appl Pharmacol, 1982. 62(3): p. 474-80.
25. Bronaugh, R.L. et T.J. Franz, *Vehicle effects on percutaneous absorption: in vivo and in vitro comparisons with human skin*. Br J Dermatol, 1986. 115(1): p. 1-11.
26. Bronaugh, R.L. et Collier, S.W., *Protocol for In vitro Percutaneous Absorption Studies, in In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications, R L Bronaugh and H I Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton. 1991: p. 237-241.*
27. Bronaugh, R.L., et coll., *Influence of metabolism in skin on dosimetry after topical exposure*. Environ Health Perspect, 1994. 102 Suppl 11: p. 71-4.
28. Chang, S.K. et J.E. Riviere, *Percutaneous absorption of parathion in vitro in porcine skin: effects of dose, temperature, humidity, and perfusate composition on absorptive flux*. Fundam Appl Toxicol, 1991. 17(3): p. 494-504.
29. Chapman, M.L., et coll., *Inhibition of psoriatic cell proliferation in in vitro skin models by amiprilose hydrochloride*. In Vitro Cell Dev Biol, 1990. 26(10): p. 991-6.
30. Clark, C., *How to choose a suitable emollient*. Pharm J, 2004. 273: p. 351-353.
31. Clarys, P., et coll., *In vitro percutaneous penetration through hairless rat skin: influence of temperature, vehicle and penetration enhancers*. Eur J Pharm Biopharm, 1998. 46(3): p. 279-83.
32. Clarys, P., et coll., *There is no influence of a temperature rise on in vivo adsorption of UV filters into the stratum corneum*. J Dermatol Sci, 2001. 27(2): p. 77-81.
33. Cordero, J.A., et coll., *A comparative study of the transdermal penetration of a series of nonsteroidal antiinflammatory drugs*. J Pharm Sci, 1997. 86(4): p. 503-8.
34. Cross, S.E. et M.S. Roberts, *Importance of dermal blood supply and epidermis on the transdermal iontophoretic delivery of monovalent cations*. J Pharm Sci, 1995. 84(5): p. 584-92.
35. Cross, S.E., et coll., *Determination of the effect of lipophilicity on the in vitro permeability and tissue reservoir characteristics of topically applied solutes in human skin layers*. J Invest Dermatol, 2003. 120(5): p. 759-64.
36. Cua, A.B., K.P. Wilhelm, et H.I. Maibach, *Skin surface lipid and skin friction: relation to age, sex and anatomical region*. Skin Pharmacol, 1995. 8(5): p. 246-51.

37. de Jager, M.W., et coll., *Modelling the stratum corneum lipid organisation with synthetic lipid mixtures: the importance of synthetic ceramide composition*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1664(2): p. 132-40.
38. Dias, M., et coll., *Topical delivery of caffeine from some commercial formulations*. *Int J Pharm*, 1999. 182(1): p. 41-7.
39. Diembeck W, B.H., Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W, *Test Guidelines for In Vitro Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients*. *Fd Chem Tox*, 1999. 37: p. 191-205.
40. do Couto, S.G., S. Oliveira Mde, et A. Alonso, *Dynamics of proteins and lipids in the stratum corneum: effects of percutaneous permeation enhancers*. *Biophys Chem*, 2005. 116(1): p. 23-31.
41. Dubertret, L., *Psoriasis*. <[www.therapeutique-dermatologique.org](http://www.therapeutique-dermatologique.org)> 2001. Consulté en janvier 2008.
42. ECETOC, *Monograph N20, Percutaneous Absorption*. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, ECETOC, Brussels, 1993.
43. Elaine, N.M., *Le système tégumentaire*, in *Anatomie et physiologie humaines*, R. pédagogique, 2005: Saint-Laurent, Qc. p. 155-180.
44. Elias, P.M., *Epidermal lipids, membranes, and keratinization*. *Int J Dermatol*, 1981. 20(1): p. 1-19.
45. Elias, P.M., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. *J Invest Dermatol*, 1983. 80 Suppl: p. 44s-49s.
46. Elias, P.M., *Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism*. *J Control Release*, 1991. 15: p. 199-208.
47. Elias, P.M. et H.W., Calhoun CJ, *Permeability barrier homeostasis: the role of lipid processing in dry skin and moisturizers*. In: Loden M, Maibach H, eds. *Dry Skin and Moisturizers: Chemistry and Function*, 2000. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000: 59-70.
48. Elias, P.M. et K.R. Feingold, *Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications*. *Arch Dermatol*, 2001. 137(8): p. 1079-81.

49. Faller, C., et coll., *Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics*. *Toxicol In Vitro*, 2002. 16(5): p. 557-72.
50. Farber, E.M. et M.L. Nall, *The natural history of psoriasis in 5,600 patients*. *Dermatologica*, 1974. 148(1): p. 1-18.
51. Fartasch, M., *Epidermal barrier in disorders of the skin*. *Microsc Res Tech*, 1997. 38(4): p. 361-72.
52. Feingold, K.R., et coll., *Cholesterol synthesis is required for cutaneous barrier function in mice*. *J Clin Invest*, 1990. 86(5): p. 1738-45.
53. Feldmann, R.J. et H.I. Maibach, *Absorption of some organic compounds through the skin in man*. *J Invest Dermatol*, 1970. 54(5): p. 399-404.
54. Flynn, G.L. et S.H. Yalkowsky, *Correlation and prediction of mass transport across membranes. I. Influence of alkyl chain length on flux-determining properties of barrier and diffusant*. *J Pharm Sci*, 1972. 61(6): p. 838-52.
55. Franz, T.J., *Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data*. *J Invest Dermatol*, 1975. 64: p. 190-195.
56. Fulmer, A.W. et G.J. Kramer, *Stratum corneum lipid abnormalities in surfactant-induced dry scaly skin*. *J Invest Dermatol*, 1986. 86(5): p. 598-602.
57. Garg, A., et coll., *Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders*. *Arch Dermatol*, 2001. 137(1): p. 53-9.
58. Ghadially, R., et coll., *The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model*. *J Clin Invest*, 1995. 95(5): p. 2281-90.
59. Ghadially, R., J.T. Reed, et P.M. Elias, *Stratum corneum structure and function correlates with phenotype in psoriasis*. *J Invest Dermatol*, 1996. 107(4): p. 558-64.
60. Godfrey, D.I., et coll., *NKT cells: facts, functions and fallacies*. *Immunol Today*, 2000. 21(11): p. 573-83.
61. Grouthamel, W.G., et coll., *Drug absorption IV. Influence of pH on absorption kinetics of weakly acidic drugs*. *J Pharm Sci*, 1971. 60: p. 1160-1163.
62. Grubauer, G., et coll., *Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier*. *J Lipid Res*, 1989. 30(1): p. 89-96.

63. Gudjonsson, J.E., et coll., *Mouse models of psoriasis*. J Invest Dermatol, 2007. 127(6): p. 1292-308.
64. Gudjonsson, J.E. et J.T. Elder, *Psoriasis: epidemiology*. Clin Dermatol, 2007. 25(6): p. 535-46.
65. Hadgraft, J., *Calculations of drug release rates from controlled release devices. The slab*. Int J Pharm, 1979. 2: p. 177-197.
66. Hadgraft, J., *Modulation of the barrier function of the skin*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2001. 14 Suppl 1: p. 72-81.
67. Hagedorn-Leweke, U. et B.C. Lippold, *Accumulation of sunscreens and other compounds in keratinous substrates*. Eur J Pharm Biopharm, 1998. 46(2): p. 215-21.
68. Harding, C.R., *The stratum corneum: structure and function in health and disease*. Dermatol Ther, 2004. 17 Suppl 1: p. 6-15.
69. Hatziantoniou, S., et coll., *Pharmacological activity of natural lipids on a skin barrier disruption model*. Pharmacol Res, 2000. 42(1): p. 55-9.
70. Horton, R., et coll., *Gene map of the extended human MHC*. Nat Rev Genet, 2004. 5(12): p. 889-99.
71. Hotchkiss, S.A., et coll., *Percutaneous absorption of nicotinic acid, phenol, benzoic acid and triclopyr butoxyethyl ester through rat and human skin in vitro: further validation of an in vitro model by comparison with in vivo data*. Food Chem Toxicol, 1992. 30(10): p. 891-9.
72. Howes D, G.R., Hadgraft J, Heylings JR et coll., *Methods for assessing percutaneous absorption*. ECVAM Workshop Report ATLA, 1996. 24: p. 81-106.
73. Imokawa, G., et coll., *Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?* J Invest Dermatol, 1991. 96(4): p. 523-6.
74. Jean, J., M. Lapointe, J. Soucy, R. Pouliot, *Development of In Vitro Psoriatic Skin Model by Tissue Engineering*. Journal of Dermatological Science, 2008. Sous presse.
75. Johnson, P.C., *The role of tissue engineering*. Adv Skin Wound Care, 2000. 13(2 Suppl): p. 12-4.
76. Kao, J., J. Hall, et G. Helman, *In vitro percutaneous absorption in mouse skin: influence of skin appendages*. Toxicol Appl Pharmacol, 1988. 94(1): p. 93-103.

77. Kemppainen B.W et coll., *Methods for skin absorption*. CRC Press, Boca Raton, 1990.
78. Khavari, P.A., *Modelling cancer in human skin tissue*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(4): p. 270-80.
79. Konstantinova, N.V., et coll., *Interleukin-8 is induced in skin equivalents and is highest in those derived from psoriatic fibroblasts*. J Invest Dermatol, 1996. 107(4): p. 615-21.
80. Krueger, G.G. et C.M. Jorgensen, *Experimental models for psoriasis*. J Invest Dermatol, 1990. 95(5 Suppl): p. 56S-58S.
81. Krueger, G. et Jorgensen CM, *Defined system to assess the in vitro induction of a psoriasis phenotype on normal keratinocytes by fibroblasts from psoriatic subjects*. J Cutaneous Med Surg, 1997(2): p. 20.
82. Krueger, G. et C.N. Ellis, *Psoriasis--recent advances in understanding its pathogenesis and treatment*. J Am Acad Dermatol, 2005. 53(1 Suppl 1): p. S94-100.
83. Langley, R.G., G.G. Krueger, et C.E. Griffiths, *Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life*. Ann Rheum Dis, 2005. 64 Suppl 2: p. ii18-23; discussion ii24-5.
84. Lapointe, M., *Characterization of a novel psoriatic skin model produced with the auto-assembly method*. 2005.
85. Lavrijsen, A.P., et coll., *Barrier function parameters in various keratinization disorders: transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate*. Br J Dermatol, 1993. 129(5): p. 547-53.
86. Lavrijsen, A.P., et coll., *Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization in patients with lamellar ichthyosis*. J Invest Dermatol, 1995. 105(4): p. 619-24.
87. Lebwohl, M., *A clinician's paradigm in the treatment of psoriasis*. J Am Acad Dermatol, 2005. 53(1 Suppl 1): p. S59-69.
88. Lee, K.H., *Tissue-engineered human living skin substitutes: development and clinical application*. Yonsei Med J, 2000. 41(6): p. 774-9.

89. Lin, S.Y., et coll., *Comparisons of different animal skins with human skin in drug percutaneous penetration studies*. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1992. 14(8): p. 645-54.
90. López, A., et coll., *Skin permeation model of phenylalkylcarboxylic homologous acids and their enhancers effect on percutaneous penetration of 5-fluorouracil*. *Int J Pharm*, 1996. 139: p. 205-213.
91. Madison, K.C., et coll., *Presence of intact intercellular lipid lamellae in the upper layers of the stratum corneum*. *J Invest Dermatol*, 1987. 88(6): p. 714-8.
92. Magnusson, B.M., et coll., *Percutaneous absorption of steroids: determination of in vitro permeability and tissue reservoir characteristics in human skin layers*. *Skin Pharmacol Physiol*, 2006. 19(6): p. 336-42.
93. Marks, R. et S. Barton, *The significance of the size and shape of corneocytes*. In: Marks R, Plewig G, eds., 1983: p. 161-170.
94. Marstein, S., E. Jellum, et L. Eldjarn, *The concentration of pyroglutamic acid (2-pyrrolidone-5-carboxylic acid) in normal and psoriatic epidermis, determined on a microgram scale by gas chromatography*. *Clin Chim Acta*, 1973. 49(3): p. 389-95.
95. Mary, S., et coll., *[A new technique for study of cutaneous biology, microdialysis]*. *Ann Dermatol Venereol*, 1999. 126(1): p. 66-70.
96. Marzulli, F.N., J.F. Callahan, et D.W. Brown, *Chemical Structure and Skin Penetrating Capacity of a Short Series of Organic Phosphates and Phosphoric Acid*. *J Invest Dermatol*, 1965. 44: p. 339-44.
97. Mazzetti, M., et coll., *Psoriasis, stress and psychiatry: psychodynamic characteristics of stressors*. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 1994. 186: p. 62-4.
98. Mc Cormick, K. et M. Abdel Rahman, *The role of testosterone in trichloroethylene penetration in vitro*. *Environ. Res*, 1991. 54: p. 82-92.
99. Michel, M., *Caractérisation de différentes populations de kératinocytes et influence de leur phénotype sur l'activité fonctionnelle des équivalents dermo-épidermiques produits IN VITRO*. Thèse, 1995.
100. Mils, V., et coll., *Comparative analysis of normal and psoriatic skin both in vivo and in vitro*. *Differentiation*, 1994. 58(1): p. 77-86.

101. Modamio, P., C.F. Lastra, et E.L. Marino, *A comparative in vitro study of percutaneous penetration of beta-blockers in human skin*. Int J Pharm, 2000. 194(2): p. 249-59.
102. Monteiro-Riviere, N.A., et coll., *Interspecies and interregional analysis of the comparative histologic thickness and laser Doppler blood flow measurements at five cutaneous sites in nine species*. J Invest Dermatol, 1990. 95(5): p. 582-6.
103. Motta, S., et coll., *Abnormality of water barrier function in psoriasis. Role of ceramide fractions*. Arch Dermatol, 1994. 130(4): p. 452-6.
104. Nemes, Z. et P.M. Steinert, *Bricks and mortar of the epidermal barrier*. Exp Mol Med, 1999. 31(1): p. 5-19.
105. Netzlaff, F., et coll., *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(2): p. 167-78.
106. Nguyen, B.C. et I.E. Kochevar, *Influence of hydration on dihydroxyacetone-induced pigmentation of stratum corneum*. J Invest Dermatol, 2003. 120(4): p. 655-61.
107. Nielsen, J.B., *Percutaneous penetration through slightly damaged skin*. Arch Dermatol Res, 2005. 296(12): p. 560-7.
108. OECD, *Guidance document n28 for the conduct of skin absorption studies. Adopted at 35th Joint Meeting, August 2003*. 2003.
109. OECD, *Test guideline 428: Skin absorption: In vitro method. Adopted on 13th April 2004, Paris, France*. 2004.
110. Oestmann, E., et coll., *Skin barrier function in healthy volunteers as assessed by transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate: intra- and inter-individual variability*. Br J Dermatol, 1993. 128(2): p. 130-6.
111. Ohara, N., K. Takayama, et T. Nagai, *Combined effect of d-limonene pretreatment and temperature on the rat skin permeation of lipophilic and hydrophilic drugs*. Biol Pharm Bull, 1995. 18(3): p. 439-42.
112. Pedersen, L.K., et coll., *Augmentation of skin response by exposure to a combination of allergens and irritants - a review*. Contact Dermatitis, 2004. 50(5): p. 265-73.

113. Pinnagoda, J., et coll., *Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis*. Contact Dermatitis, 1990. 22(3): p. 164-78.
114. Ponec, M., et coll., *Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models*. Int J Pharm, 2000. 203(1-2): p. 211-25.
115. Ponec, M., et coll., *Characterization of reconstructed skin models*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2002. 15 Suppl 1: p. 4-17.
116. Potard, G., et coll., *Quantitative HPLC analysis of sunscreens and caffeine during in vitro percutaneous penetration studies*. Int J Pharm, 1999. 189(2): p. 249-60.
117. Potard, G., et coll., *The stripping technique: in vitro absorption and penetration of five UV filters on excised fresh human skin*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2000. 13(6): p. 336-44.
118. Potts, R.O. et M.L. Francoeur, *The influence of stratum corneum morphology on water permeability*. J Invest Dermatol, 1991. 96(4): p. 495-9.
119. Poumay, Y. et A. Coquette, *Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research*. Arch Dermatol Res, 2007. 298(8): p. 361-9.
120. Proksch, E. et J.M. Lachapelle, *The management of dry skin with topical emollients-recent perspectives*. J Dtsch Dermatol Ges, 2005. 3(10): p. 768-74.
121. Proksch, E., R. Folster-Holst, et J.M. Jensen, *Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema*. J Dermatol Sci, 2006. 43(3): p. 159-69.
122. Rawlings, A.V., et coll., *Stratum corneum moisturization at the molecular level*. J Invest Dermatol, 1994. 103(5): p. 731-41.
123. Rawlings, A.V., *Skin waxes. Their composition, properties, structures and biological significance*. In: Hamilton R, Christie W, eds. Waxes. Dundee: The Oily Press., 1995: p. 223-256.
124. Rawlings, A.V. et C.R. Harding, *Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions*. International Journal of Cosmetic Science, 2003. 25(1-2): p. 63-95.
125. Rawlings, A.V. et C.R. Harding, *Moisturization and skin barrier function*. Dermatol Ther, 2004. 17 Suppl 1: p. 43-8.

126. Rawlings, A.V. et P.J. Matts, *Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle*. J Invest Dermatol, 2005. 124(6): p. 1099-110.
127. Raychaudhuri, S.P., et coll., *Severe combined immunodeficiency mouse-human skin chimeras: a unique animal model for the study of psoriasis and cutaneous inflammation*. Br J Dermatol, 2001. 144(5): p. 931-9.
128. Regnier, M., et coll., *Barrier function of human skin and human reconstructed epidermis*. J Pharm Sci, 1993. 82(4): p. 404-7.
129. Riviere, J.E., B. Sage, et P.L. Williams, *Effects of vasoactive drugs on transdermal lidocaine iontophoresis*. J Pharm Sci, 1991. 80(7): p. 615-20.
130. Riviere, J.E. et P.L. Williams, *Pharmacokinetic implications of changing blood flow in skin*. J Pharm Sci, 1992. 81(6): p. 601-2.
131. Roberts, M.S. et K.A. Walters, *Dermal absorption and toxicity assessment. Drugs and the pharmaceutical sciences*. Drugs and the pharmaceutical sciences. Vol. 91. 1998, New York: Marcel Dekker.
132. Rougier, A., C. Lotte, et H.I. Maibach, *In vivo percutaneous penetration of some organic compounds related to anatomic site in humans: predictive assessment by the stripping method*. J Pharm Sci, 1987. 76(6): p. 451-4.
133. Saiag, P., et coll., *Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro*. Science, 1985. 230(4726): p. 669-72.
134. Schaefer, H. et T.E. Redelmeier, *Skin barrier: principles of percutaneous absorption.*, ed. Karger. 1996, New York.
135. Schaefer, H. et T. Redelmeier, *Skin penetration*. 2004. Chapitre 11: p. 174.
136. Schäfer-Korting, M.U.B., Armin Gamer, *Reconstructed Human Epidermis for Skin Absorption Testing: Results of the German Prevalidation Study*. Altern Lab Anim (ATLA), 2006. 34(3): p. 283-294.
137. Scheuplein, R.J., *Mechanism of percutaneous absorption. II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration*. J Invest Dermatol, 1967. 48(1): p. 79-88.
138. Scheuplein, R.J. et I.H. Blank, *Permeability of the skin*. Physiol Rev, 1971. 51(4): p. 702-47.

139. Scheuplein, R.J. et I.H. Blank, *Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids*. J Invest Dermatol, 1973. 60(5): p. 286-96.
140. Schmook, F.P., J.G. Meingassner, et A. Billich, *Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption*. Int J Pharm, 2001. 215(1-2): p. 51-6.
141. Scott, R.C. et J.D. Ramsey, *Comparison of the in vivo and in vitro percutaneous absorption of a lipophilic molecule (cypermethrin, a pyrethroid insecticide)*. J Invest Dermatol, 1987. 89(2): p. 142-6.
142. Scott, R.C., et coll., *The influence of skin structure on permeability: an intersite and interspecies comparison with hydrophilic penetrants*. J Invest Dermatol, 1991. 96(6): p. 921-5.
143. Scott, I.R. et C.R. Harding, *A filaggrin analogue to increase NMF synthesis*. Dermatology, 1993: p. 773.
144. Silcox, G.D., et coll., *Percutaneous absorption of benzoic acid across human skin. II. Prediction of an in vivo, skin-flap system using in vitro parameters*. Pharm Res, 1990. 7(4): p. 352-8.
145. Steinert, P.M. et L.N. Marekov, *Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia*. Mol Biol Cell, 1999. 10(12): p. 4247-61.
146. Sugai, J., et coll., *Interaction of cultured keratinocytes and fibroblasts from human psoriatic and normal skin in immunodeficient mice*. J Dermatol Sci, 1998. 17(3): p. 190-7.
147. Sugibayashi, K., et coll., *Mechanism of skin penetration-enhancing effect by laurocapram*. J Pharm Sci, 1992. 81(1): p. 58-64.
148. Surber, C., *The vehicle: the pharmaceutical carrier of dermatological agents. Dermato-pharmacology of topical preparations: a product-development-oriented approach*. 2000: p. 5-21.
149. Sznitowska, M., S. Janicki, et A. Baczek, *Studies on the effect of pH on the lipoidal route of penetration across stratum corneum*. J Control Release, 2001. 76(3): p. 327-35.
150. Tagami, H. et K. Yoshikuni, *Interrelationship between water-barrier and reservoir functions of pathologic stratum corneum*. Arch Dermatol, 1985. 121(5): p. 642-5.

151. Taylor, L.J., et coll., *Effect of occlusion on the percutaneous penetration of linoleic acid and glycerol*. Int J Pharm, 2002. 249(1-2): p. 157-64.
152. Täuber, U., *Drug metabolism in the skin: advantages and disadvantages*. In: J Hadgraft, RH Guy. *Transdermal drug delivery: developmental issues and research initiatives*. 1989: p. 99-112.
153. Tomfohrde, J., et coll., *Gene for familial psoriasis susceptibility mapped to the distal end of human chromosome 17q*. Science, 1994. 264(5162): p. 1141-5.
154. Treffel, P., et coll., *Hydration, transepidermal water loss, pH and skin surface parameters: correlations and variations between dominant and non-dominant forearms*. Br J Dermatol, 1994. 130(3): p. 325-8.
155. van de Sandt, J.J., et coll., *In vitro predictions of skin absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study*. Regul Toxicol Pharmacol, 2004. 39(3): p. 271-81.
156. Van Ruissen, F., et coll., *Induction of normal and psoriatic phenotypes in submerged keratinocyte cultures*. J Cell Physiol, 1996. 168(2): p. 442-52.
157. van Ruissen, F., et coll., *Cell kinetic characterization of cultured human keratinocytes from normal and psoriatic individuals*. J Cell Physiol, 1996. 168(3): p. 684-94.
158. Walter, K. et H. Kurz, *Binding of drugs to human skin: influencing factors and the role of tissue lipids*. J Pharm Pharmacol, 1988. 40(10): p. 689-93.
159. Weingand, D.A., et coll., *Current concepts in cutaneous toxicity*. Academic press, 1991: p. 221-235.
160. Wepierre, J., *[Impermeability of mouse skin to tritiated perhydro-squalene]*. Ann Pharm Fr, 1967. 25(7): p. 515-21.
161. Werner, Y. et M. Lindberg, *Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis*. Acta Derm Venereol, 1985. 65(2): p. 102-5.
162. Wertz, P.W. et D.T. Downing, *Covalently bound omega-hydroxyacylsphingosine in the stratum corneum*. Biochim Biophys Acta, 1987. 917(1): p. 108-11.
163. White, S.H., D. Mirejovsky, et G.I. King, *Structure of lamellar lipid domains and corneocyte envelopes of murine stratum corneum. An X-ray diffraction study*. Biochemistry, 1988. 27(10): p. 3725-32.

164. White, J.A., et coll., *cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450*. J Biol Chem, 1997. 272(30): p. 18538-41.
165. Williams, M.L. et P.M. Elias, *From basket weave to barrier. Unifying concepts for the pathogenesis of the disorders of cornification*. Arch Dermatol, 1993. 129(5): p. 626-9.
166. Williams, A.C. et B.W. Barry, *Penetration enhancers*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. 56(5): p. 603-18.
167. Zhen, Y., T. Suetake, et H. Tagami, *Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin-relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters*. Arch Dermatol Res, 1991. 291: p. 555-559.

## ANNEXES

## Résultats pour l'acide benzoïque.

Least Squares Means

Effect	TYPE PEAU	TEMPS	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	1	-10.0514	0.4012	31	-25.05	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	2	-8.9481	0.3215	31	-27.83	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	4	-7.9619	0.2663	31	-29.90	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	6	-7.2909	0.2643	31	-27.58	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	8	-6.6655	0.2550	31	-26.14	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	24	-3.9470	0.1295	31	-30.47	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	1	-6.5507	0.4012	31	-16.33	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	2	-5.0968	0.3215	31	-15.85	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	4	-3.7334	0.2663	31	-14.02	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	6	-2.7027	0.2643	31	-10.23	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	8	-2.0092	0.2550	31	-7.88	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	24	-0.8678	0.1295	31	-6.70	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	1	-4.0030	0.3475	31	-11.52	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	2	-3.0582	0.2784	31	-10.98	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	4	-2.1940	0.2306	31	-9.51	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	6	-1.6319	0.2289	31	-7.13	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	8	-1.2768	0.2209	31	-5.78	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	24	-0.3601	0.1122	31	-3.21	0.0031
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	1	-2.2500	0.3475	31	-6.48	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	2	-1.3519	0.2784	31	-4.86	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	4	-0.6536	0.2306	31	-2.83	0.0080
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	6	-0.3131	0.2289	31	-1.37	0.1812
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	8	-0.1475	0.2209	31	-0.67	0.5092
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	24	-0.01618	0.1122	31	-0.14	0.8863
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	1	-8.0505	0.3475	31	-23.17	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	2	-7.0452	0.2784	31	-25.30	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	4	-5.9061	0.2306	31	-25.61	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	6	-5.2117	0.2289	31	-22.77	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	8	-4.7501	0.2209	31	-21.51	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	24	-2.6243	0.1122	31	-23.39	<.0001

## Résultats pour la caféine.

Least Squares Means

Effect	TYPE PEAU	TEMPS	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	1	-7.8644	0.4704	36.5	-16.72	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	2	-6.6832	0.4608	36.6	-14.50	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	4	-5.3122	0.4494	36.6	-11.82	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	6	-4.2726	0.4082	36.5	-10.47	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	8	-3.4249	0.3603	36.1	-9.51	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	24	-1.0821	0.1381	10.6	-7.84	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	1	-4.4573	0.3527	36.1	-12.64	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	2	-3.4783	0.3456	36.1	-10.06	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	4	-2.4084	0.3374	36.1	-7.14	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	6	-1.4483	0.3075	35.3	-4.71	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	8	-0.6492	0.2729	33.7	-2.38	0.0232
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	24	-0.06143	0.1186	5.65	-0.52	0.6242
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	1	-2.1059	0.4093	36.4	-5.15	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	2	-1.3323	0.4010	36.4	-3.32	0.0020
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	4	-0.6740	0.3912	36.5	-1.72	0.0933
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	6	-0.3759	0.3557	36.2	-1.06	0.2976
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	8	-0.2186	0.3145	35.3	-0.70	0.4914

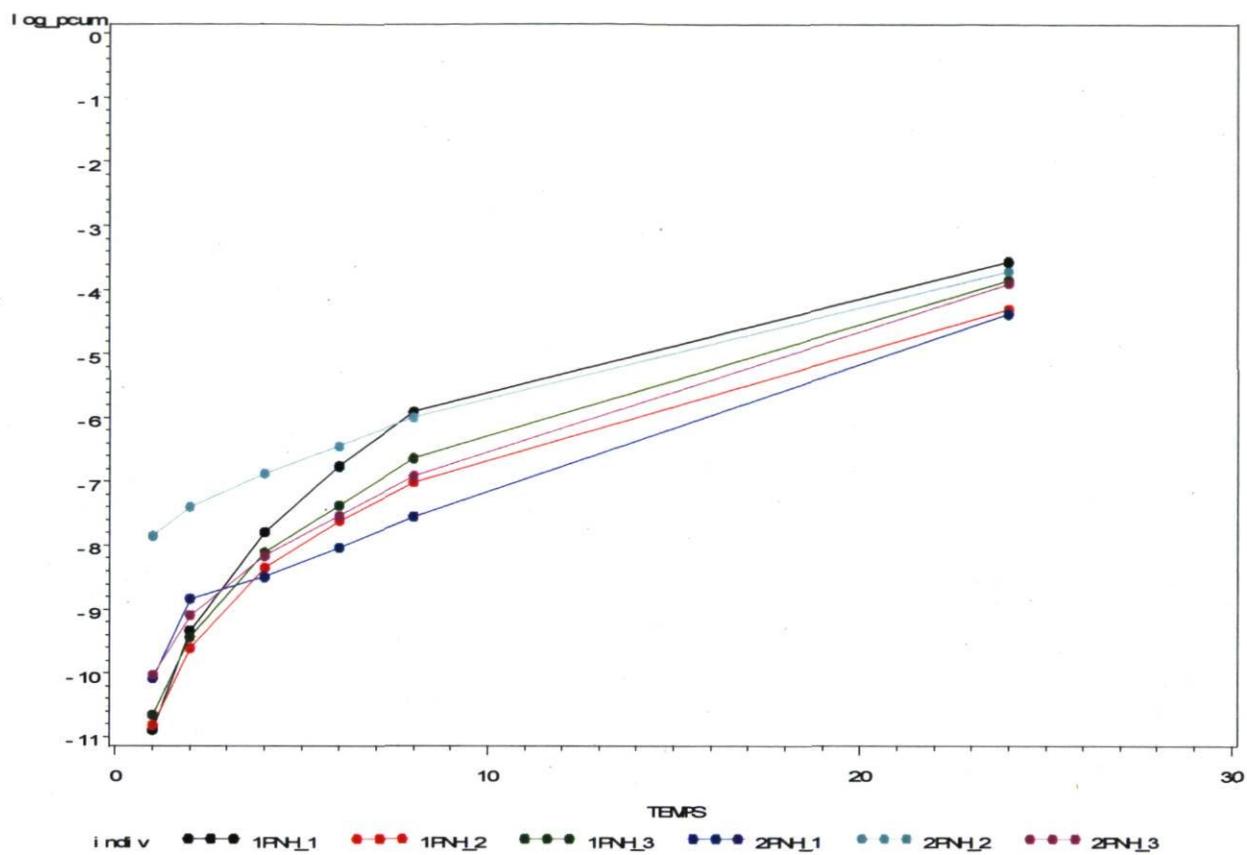
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	24	-0.06054	0.1259	7.74	-0.48	0.6438
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	1	-2.6704	0.4093	36.4	-6.52	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	2	-1.8298	0.4010	36.4	-4.56	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	4	-1.1007	0.3912	36.5	-2.81	0.0078
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	6	-0.6978	0.3557	36.2	-1.96	0.0575
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	8	-0.3827	0.3145	35.3	-1.22	0.2316
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	24	-0.08870	0.1259	7.74	-0.70	0.5016
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	1	-7.7169	0.4093	36.4	-18.85	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	2	-6.2889	0.4010	36.4	-15.68	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	4	-5.0020	0.3912	36.5	-12.79	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	6	-4.2457	0.3557	36.2	-11.94	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	8	-3.5807	0.3145	35.3	-11.39	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	24	-0.9080	0.1259	7.74	-7.21	0.0001

## Résultats pour l'hydrocortisone.

Effect			Least Squares Means				
	TYPE PEAU	TEMPS	Estimate	Standard Error	DF	t Value	Pr >  t
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	1	-7.5364	0.5983	4.34	-12.60	0.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	2	-6.8718	0.5901	4.1	-11.64	0.0003
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	4	-6.3307	0.5867	3.99	-10.79	0.0004
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	6	-5.7421	0.5833	3.89	-9.84	0.0007
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	8	-5.0526	0.5848	3.91	-8.64	0.0011
TYPE_PEAU*TEMPS	PNH	24	-3.4543	0.5709	3.53	-6.05	0.0056
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	1	-6.6339	0.4830	6.62	-13.73	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	2	-5.3535	0.4738	6.1	-11.30	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	4	-3.8729	0.4699	5.84	-8.24	0.0002
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	6	-2.9289	0.4660	5.63	-6.28	0.0010
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	8	-2.0594	0.4678	5.67	-4.40	0.0052
TYPE_PEAU*TEMPS	PS	24	-0.5812	0.4518	4.86	-1.29	0.2562
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	1	-4.9841	0.4620	6.1	-10.79	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	2	-3.8555	0.4513	5.55	-8.54	0.0002
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	4	-2.8107	0.4468	5.27	-6.29	0.0012
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	6	-2.1418	0.4424	5.05	-4.84	0.0046
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	8	-1.6001	0.4444	5.1	-3.60	0.0150
TYPE_PEAU*TEMPS	SP46	24	-0.7355	0.4258	4.24	-1.73	0.1551
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	1	-1.1421	0.4620	6.1	-2.47	0.0476
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	2	-0.4688	0.4513	5.55	-1.04	0.3421
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	4	-0.07203	0.4468	5.27	-0.16	0.8779
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	6	0.08467	0.4424	5.05	0.19	0.8557
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	8	0.1635	0.4444	5.1	0.37	0.7277
TYPE_PEAU*TEMPS	SP65	24	0.2309	0.4258	4.24	0.54	0.6149
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	1	-8.9079	0.4522	5.1	-19.70	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	2	-8.0323	0.4473	4.87	-17.96	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	4	-7.1990	0.4452	4.75	-16.17	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	6	-6.6465	0.4432	4.66	-15.00	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	8	-6.1439	0.4441	4.68	-13.83	<.0001
TYPE_PEAU*TEMPS	SPNH	24	-4.2344	0.4358	4.3	-9.72	0.0004

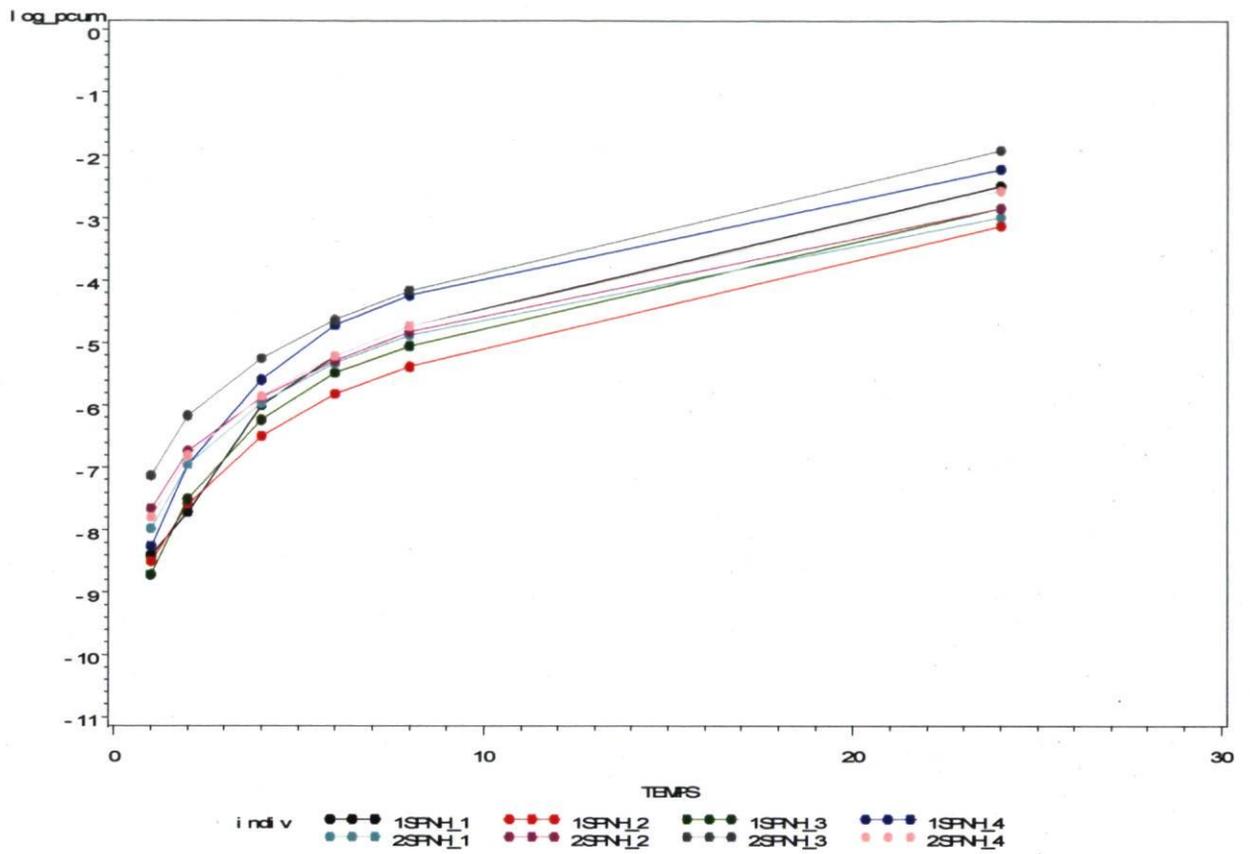
## Graphique données brutes: acide benzoïque

TYPE FEU/FNH



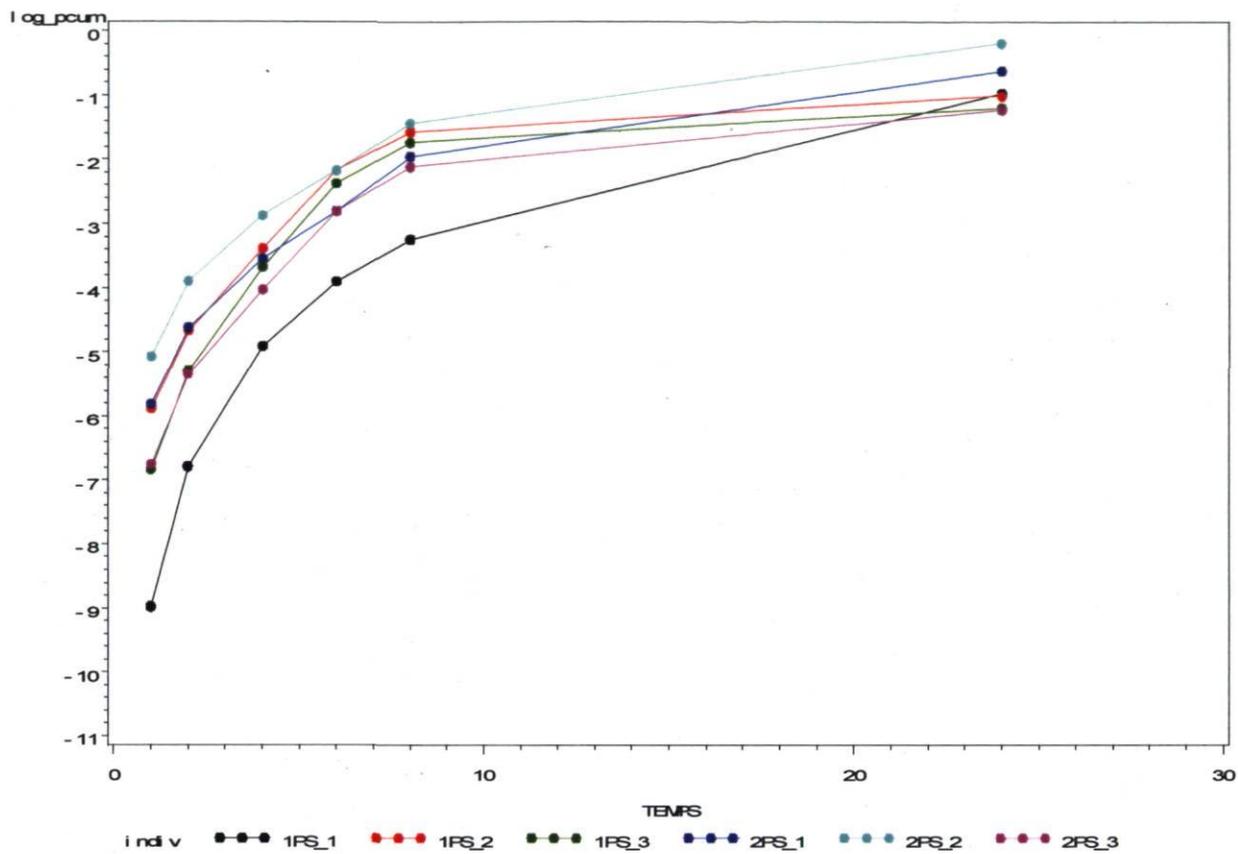
## Graphique donnees brutes: acide benzoique

TYPE REAU-SFH



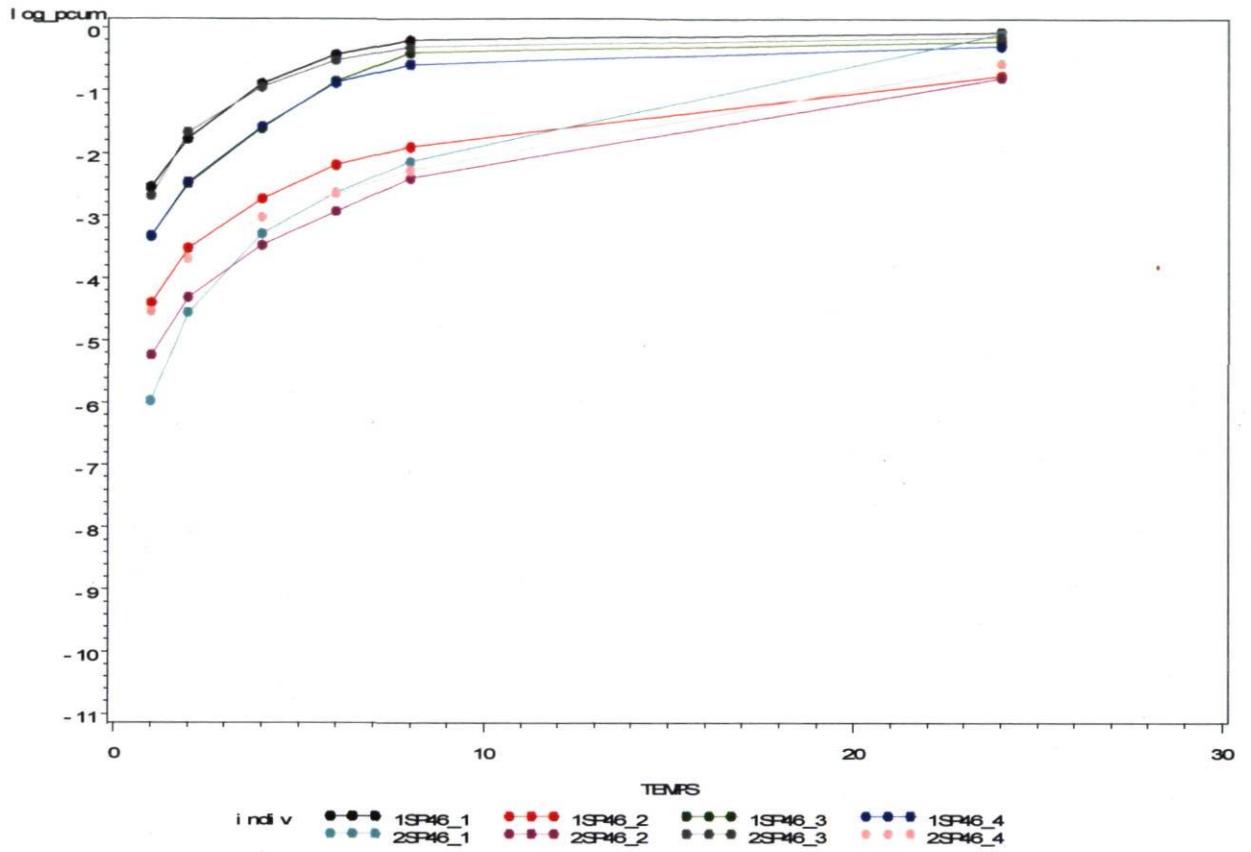
## Graphique donnees brutes: acide benzoique

TYPE REAUS



## Graphique donnees brutes: acide benzoique

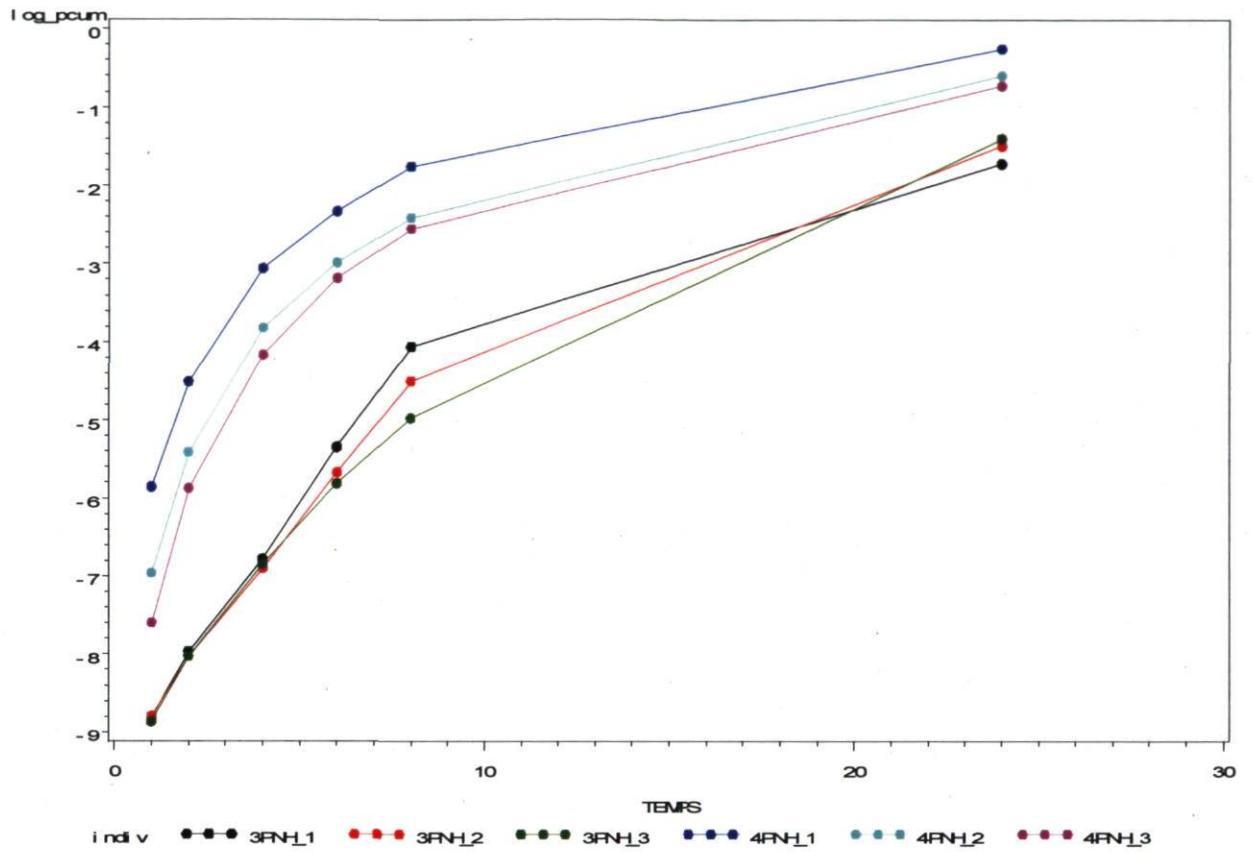
TYPE FEAU-SP46





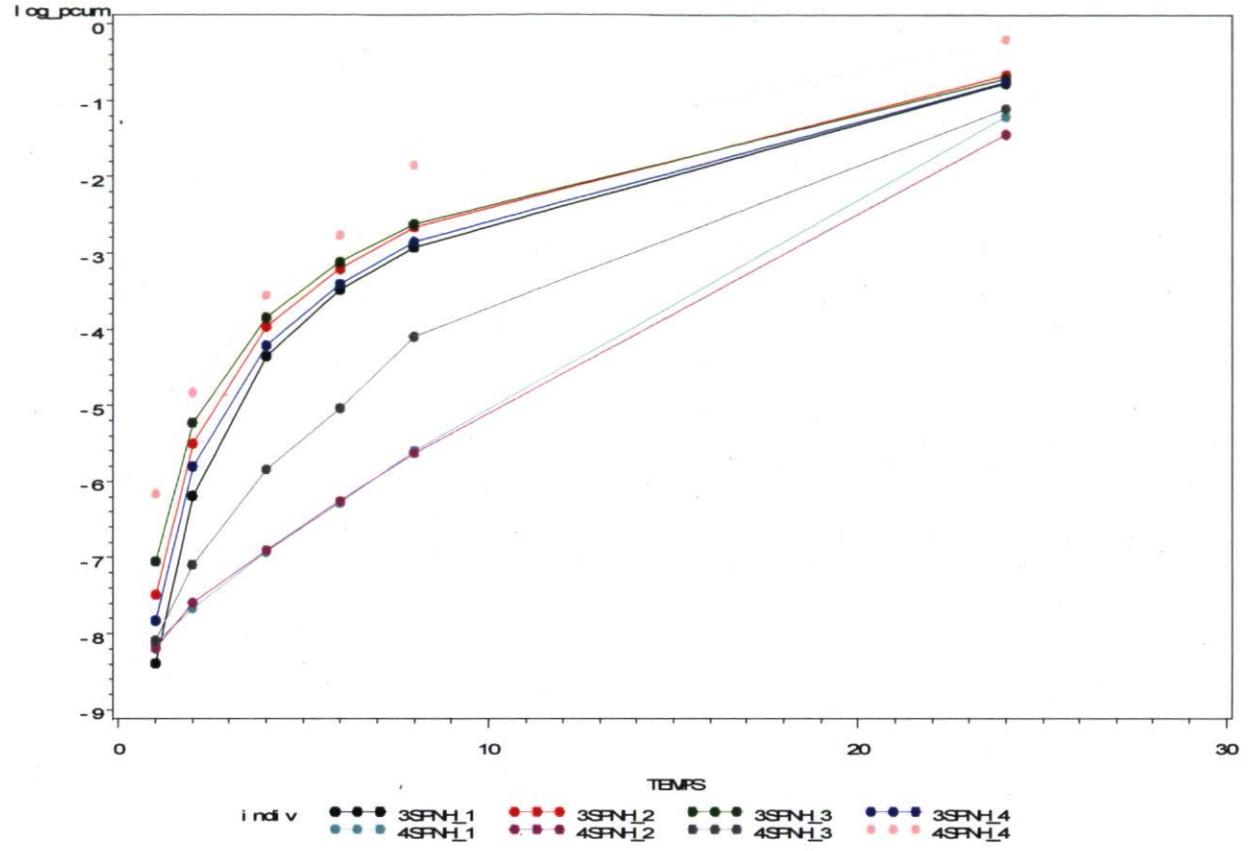
## Graphique donnees brutes: cafeine

TYPE FEALFNH



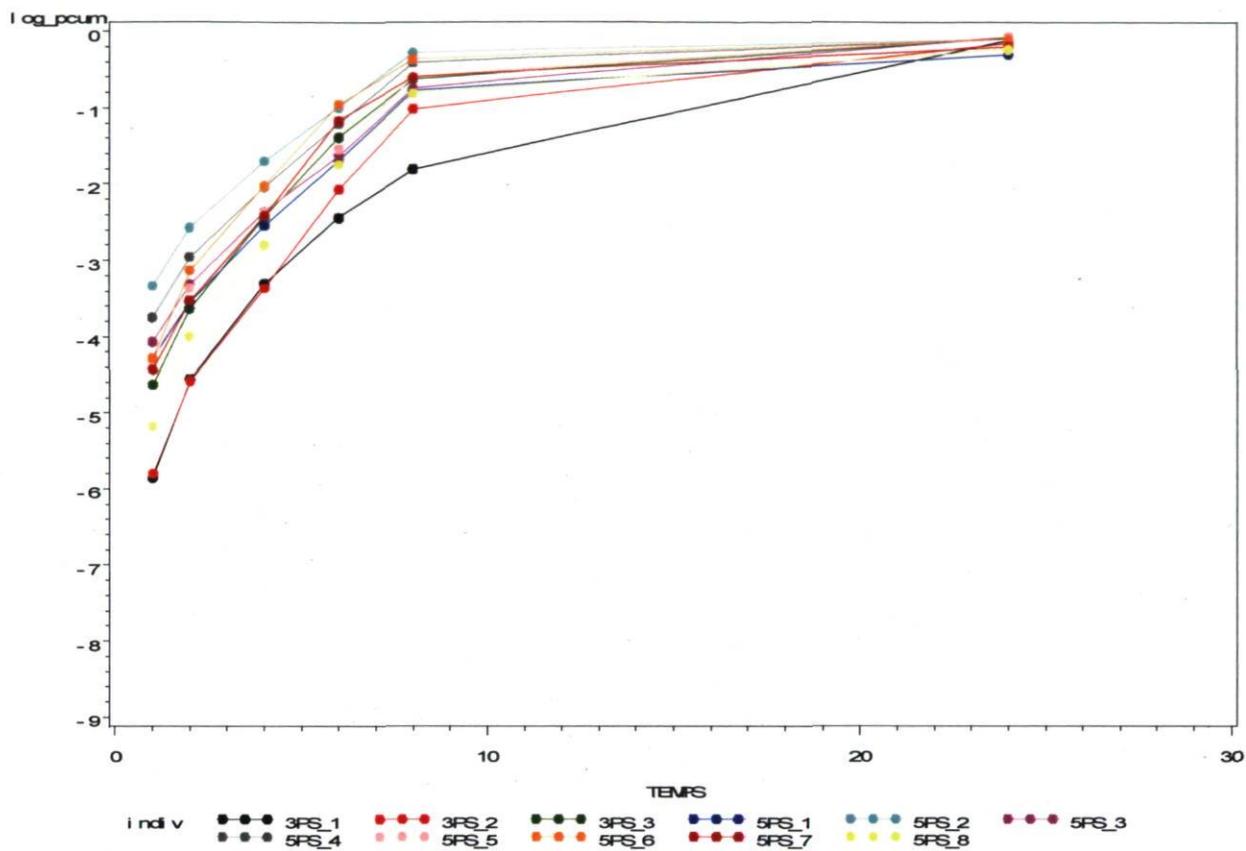
### Graphique donnees brutes: cafeine

TYPE FEAU-SFNH



## Graphique donnees brutes: cafeine

TYPE REAUS



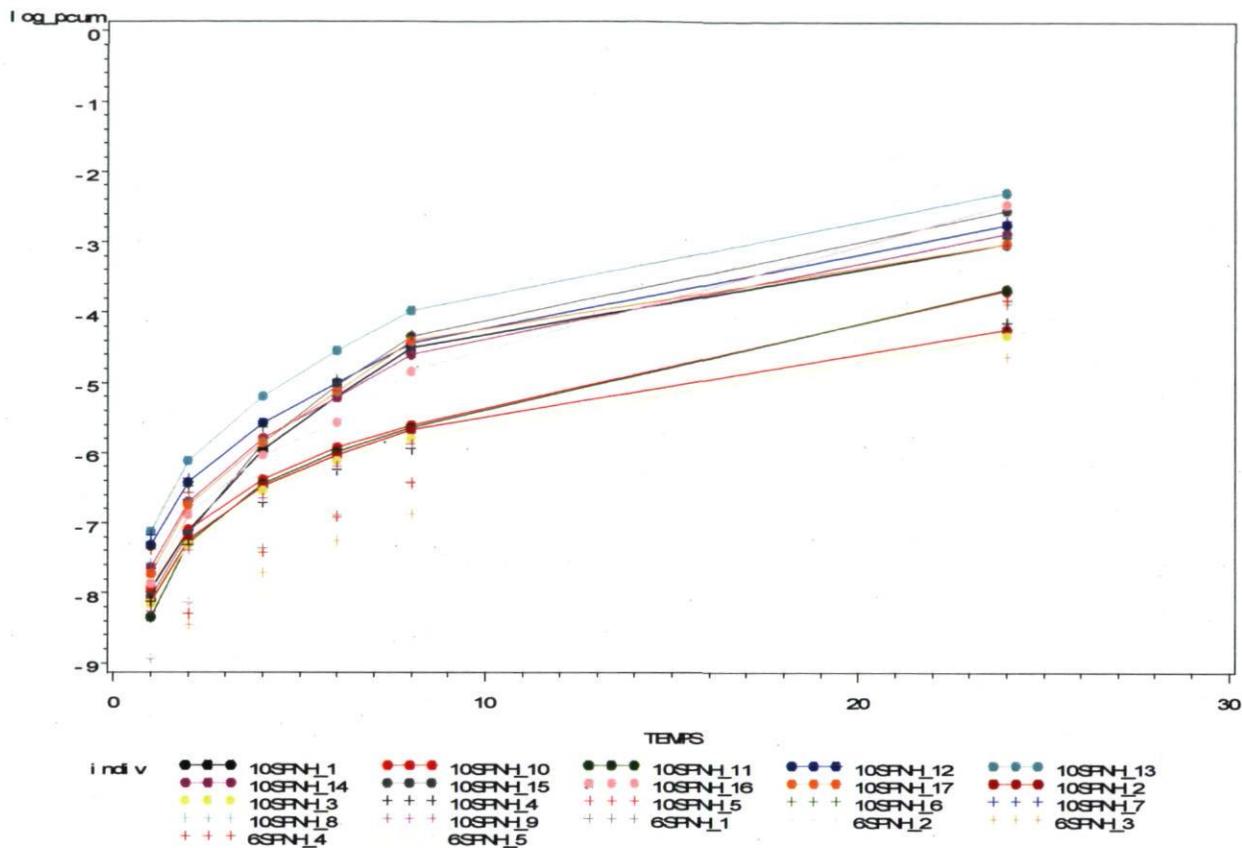






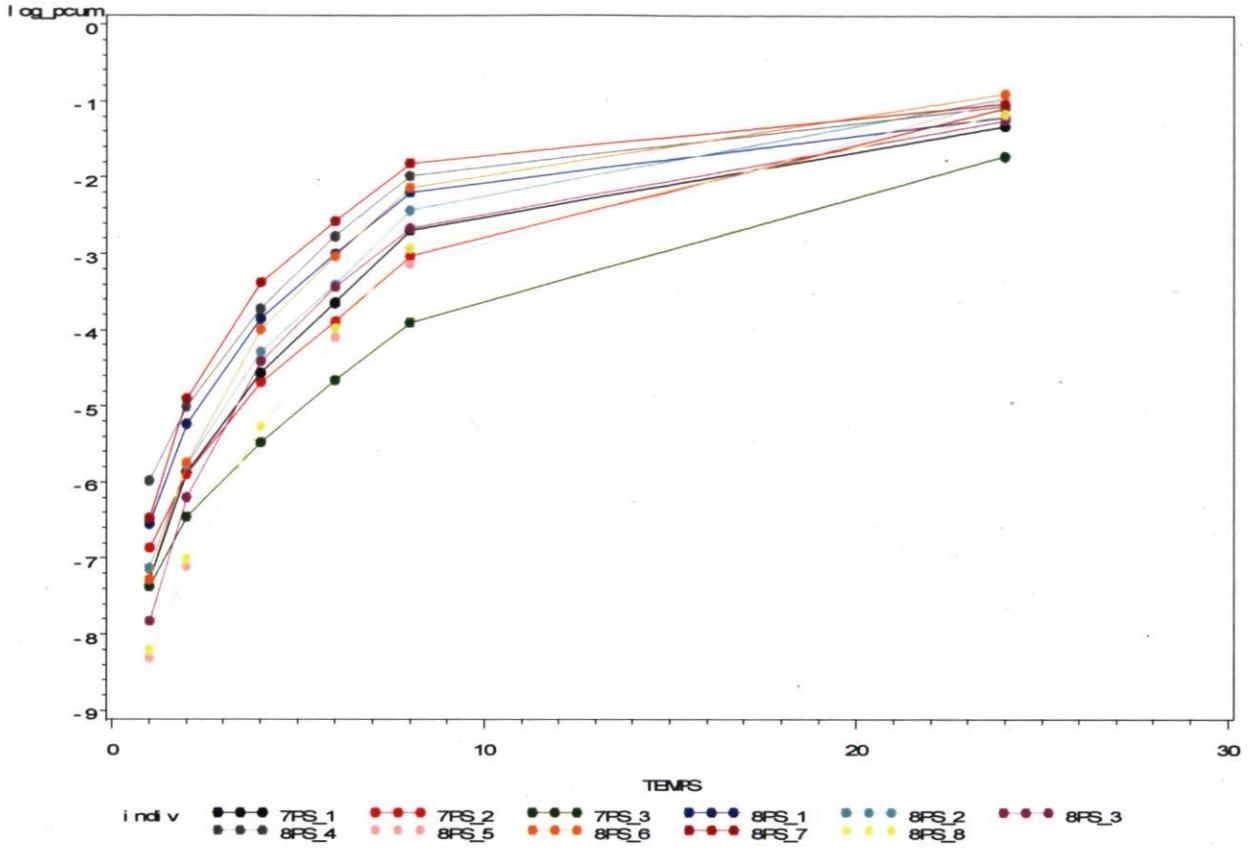
### Graphique donnees brutes: hydrocortisone

TYPE FEAU-SFNH



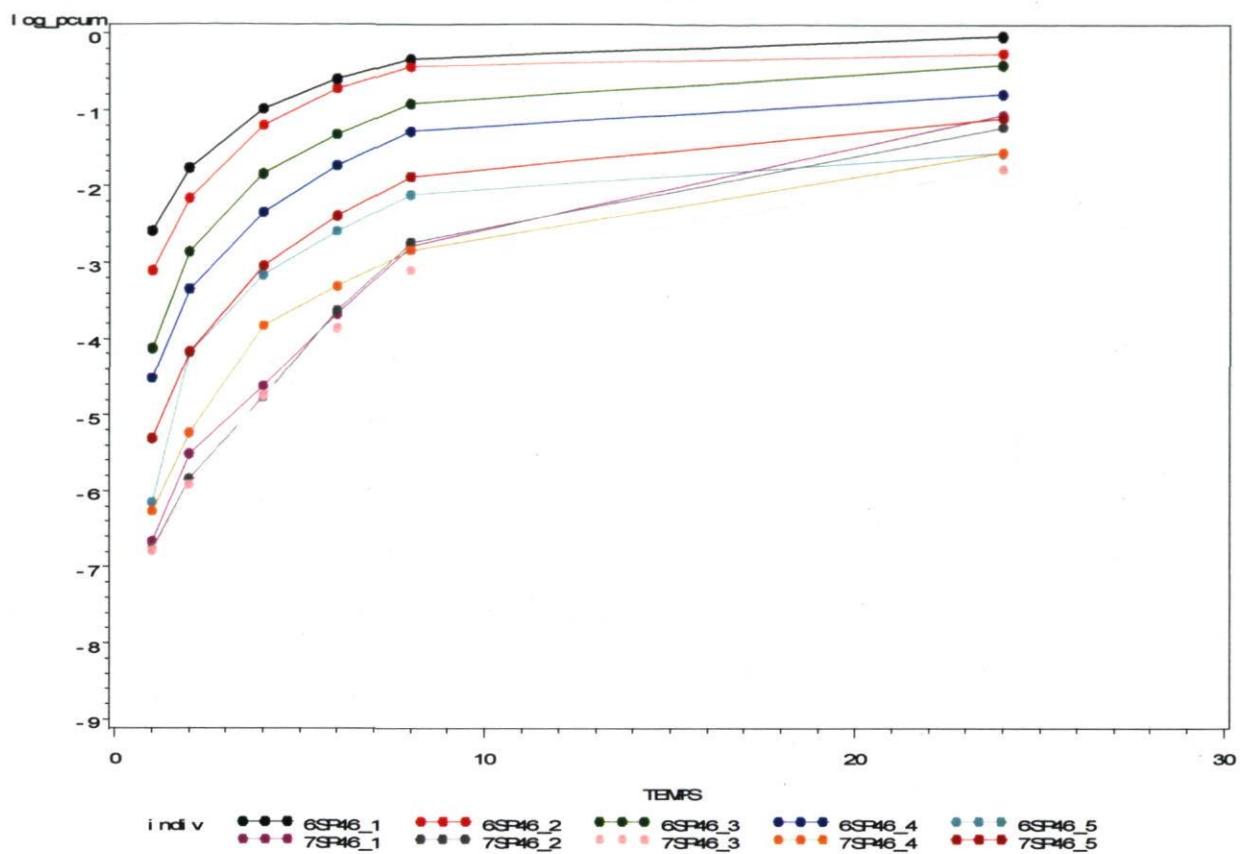
### Graphique donnees brutes: hydrocortisone

TYPE FEAUFS



## Graphique donnees brutes: hydrocortisone

TYPE FEAL-SP46



## Graphique donnees brutes: hydrocortisone

TYPE FEAU-SP65

