UNIVERSITÉ DU HAVRE

Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire (URCOM)

Laboratoires d'Ecotoxicologie – Milieux Aquatiques (LEMA)

Ecole Doctorale Normande de Chimie

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 19 Mai 2014

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU HAVRE

Spécialité : Physico-Chimie des colloïdes

Utilisation des nanoparticules de dioxyde de titane dans les émulsions cosmétiques Impact sur la santé humaine et l'environnement

---

Manon ROSSANO

Sous la direction de Michel GRISEL et Frank Le Foll, professeurs à l'Université du Havre
Encadrée par Céline PICARD et Nicolas HUCHER, maîtres de conférences à l'Université du Havre

MEMBRES DU JURY :

Pr. Perla RELKIN	*Professeur, AgroParisTech*	Rapporteur
Pr. François SICHEL	*Professeur, Université de Caen*	Président et Rapporteur
Dr. Jérôme LABILLE	*Chargé de recherche, CEREGE*	Examinateur
Dr. Céline PICARD	*Maître de conférences, Université du Havre*	Examinateur
Dr. Nicolas HUCHER	*Maître de conférences, Université du Havre*	Examinateur
Pr. Frank LE FOLL	*Professeur, Université du Havre*	Directeur de thèse

Sommaire

TABLE DES FIGURES **7**

TABLE DES TABLEAUX **13**

DENOMINATION DES FORMULATIONS **14**

REMERCIEMENTS **15**

Chapitre 1 Les Emulsions - Généralités **27**

1.1 ELABORATION DES EMULSIONS *27*
1.1.1 Définition 27
1.1.2 Composition des émulsions cosmétiques solaires 28
1.1.3 Mécanismes intervenant au cours de l'émulsification 30
a) Aspects énergétiques mis en jeu *30*
b) Effet des tensioactifs *31*
1.2 EVOLUTION DES EMULSIONS *32*
1.2.1 Les forces dans les milieux dispersés 32
1.2.2 Mécanismes et processus d'évolution au cours du temps 34
a) Migration des gouttelettes : floculation, crémage, sédimentation *34*
b) Variation de taille des gouttelettes *35*
c) Inversion de phase *37*
1.2.3 Stabilité des émulsions 37
a) Définitions *37*
b) Vieillissement accéléré *37*
c) Méthodes de stabilisation des émulsions *38*
1.3 PRINCIPE ET NOTIONS FONDAMENTALES DE LA CARACTERISATION DES EMULSIONS *39*
1.3.1 Distribution de taille des gouttelettes d'une émulsion 39
a) La diffraction laser *40*
b) Microscopie optique *40*
1.3.2 Propriétés rhéologiques 41
a) Définitions de paramètres importants liés à la rhéologie *41*
b) Modes de mesures *42*
c) Profil rhéologique des crèmes cosmétiques *45*
1.3.3 Caractérisation électrostatique 47

Chapitre 2 Les nanoparticules de dioxyde de titane en cosmétique **51**

2.1 DEFINITION D'UN NANOMATERIAU *51*
2.2 REACTIVITE DES NANOPARTICULES *51*
2.3 UTILISATION DES NANOPARTICULES DE TiO_2 EN COSMETIQUE *52*
2.3.1 Le marché cosmétique 52
2.3.2 Réglementation cosmétique des nanoparticules de TiO_2 52
2.3.3 Les propriétés du dioxyde de titane 53
a) Effet de taille nanométrique *54*
b) Importance du traitement de surface *56*
c) Les phénomènes d'agglomération et d'agrégation *61*
2.4 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES DE TiO_2 ..... *64*
2.5 EMULSIONS AVEC NANOPARTICULES *65*
2.5.1 Cas des émulsions de Pickering, stabilisées par particules 65

2.5.2 Emulsions avec tensioactifs et nanoparticules 66
a) Organisation des particules et des tensioactifs vis-à-vis de l'interface 66
b) Impact des particules sur la rhéologie de l'émulsion 67
2.5.3 Emulsions cosmétiques : le cas des écrans solaires 68
a) Caractérisation de crèmes commerciales 68
b) Vieillissement de crèmes commerciales 68
2.6 UNE CARACTERISATION ADEQUATE DES SYSTEMES ETUDIES 69

Chapitre 3 Les problématiques de cytotoxicité des nanoparticules de TiO_2 71

3.1 OBJECTIFS DE LA TOXICOLOGIE 71
3.1.1 Définition 71
3.1.2 Problématiques de toxicité des nanoparticules : un vaste sujet 72
3.2 VOIES D'EXPOSITIONS DES ECRANS SOLAIRES 72
3.2.1 Les expositions indirectes 73
3.2.2 Les expositions directes 73
3.3 CYTOTOXICITE DES NANOPARTICULES DE DIOXYDE DE TITANE 75
3.3.1 Quelques notions simples de biologie cellulaire 75
a) Définition de la cellule et de ses principaux composants 75
b) Le transport membranaire 75
c) Le cycle cellulaire 76
d) La mort cellulaire 76
3.3.2 Les mesures de toxicité cellulaire à court terme in vitro 77
3.3.3 Réponses cellulaires aux nanoparticules de TiO_2 78
a) Etudes de survie/prolifération cellulaire 78
b) Stress oxydant 79
c) Réponse inflammatoire 79
d) Génotoxicité et mutagénicité 79
e) Internalisation cellulaire 80
3.4 NECESSITE DE CORRELATION AVEC PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES 80
3.4.1 Taille 81
3.4.2 Aire et réactivité de surface 81
3.4.3 Structure cristalline 81
3.4.4 Agrégation et/ou agglomération 81
3.4.5 Effet du traitement de surface 82
3.4.6 Vieillissement des nanoparticules 83
3.5 INTERACTIONS AVEC LE MILIEU BIOLOGIQUE 83
3.5.1 Interaction avec le milieu de culture 83
3.5.2 Interférences lors de l'évaluation des effets biologiques 84
3.6 TOXICITE DE FORMULATIONS COSMETIQUES 84
3.6.1 Evaluations de la toxicité et de la sécurité des produits cosmétiques 84
3.6.2 Cytotoxicité de formulations cosmétiques 85
3.6.3 Cytotoxicité de formulation contenant des nanoparticules 86
3.7 OUVERTURE VERS UNE ETUDE D'ECOTOXICITE 86
3.7.1 Définition de l'écotoxicologie 86
3.7.2 La question des concentrations environnementales 87
3.7.3 Bioaccumulation, bioconcentration, bioamplification 87
3.7.4 Toxicité sur les organismes aquatiques 88
a) Toxicité des nanoparticules de dioxyde de titane 88
b) Toxicité du TiO_2 utilisé dans les crèmes cosmétiques 89
c) Importance de la caractérisation physico-chimique 89
3.7.5 Toxicité sur les organismes du sol et dans les plantes 90

Chapitre 4 Les objectifs de la thèse 91

Prévention des risques lors d'une exposition professionnelle aux nanoparticules..... 95

Chapitre 1 Formulation des émulsions cosmétiques..... 97

1.1 CHOIX DES INGREDIENTS UTILISES..... 97
1.1.1 Nanoparticules et traitements de surface : données caractéristiques 97
a) Les nanoparticules avec le coating triethoxycaprylylsilane (NP1)..... 98
b) Les nanoparticules avec le coating isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane (NP2)..... 98
1.1.2 Les ingrédients de l'émulsion..... 100
1.1.3 Rôle de chacun des ingrédients..... 101
a) Les émulsifiants..... 101
b) Les émollients et agents de consistance..... 102
c) Les agents gélifiants..... 103
d) Les conservateurs..... 103
1.2 PROTOCOLE DE PREPARATION DES EMULSIONS..... 104
1.2.1 Protocole pour l'émulsion sans nanoparticules F-0 104
1.2.2 Formulation avec nanoparticules : F-N1 et F-N2..... 104
1.3 EXTRACTION DES NANOPARTICULES DE LA FORMULATION..... 105
1.4 CONDITIONNEMENT ET CONTROLE DE LA STABILITE DES EMULSIONS..... 106

Chapitre 2 Techniques de caractérisation physico-chimique..... 107

2.1 MESURES GRANULOMETRIQUES..... 107
2.1.1 Principe de la mesure..... 107
2.1.2 Protocole opératoire..... 108
2.1.3 Courbe type obtenue 108
2.2 OBSERVATIONS PAR MICROSCOPIE OPTIQUE..... 109
2.3 ANALYSES RHEOLOGIQUES..... 109
2.3.1 Principe de la mesure..... 109
2.3.2 Protocole opératoire..... 110
2.3.3 Courbe type obtenue 110
2.4 MESURES DE POTENTIEL ZETA..... 112
2.4.1 Principe de la mesure..... 112
2.4.2 Protocole opératoire..... 112
2.4.3 Courbe type obtenue 113
2.5 MESURES INFRAROUGE..... 114
2.5.1 Principe de la mesure..... 114
2.5.2 Protocole opératoire..... 114
2.5.3 Courbe type obtenue 114
2.6 SPECTROSCOPIE DE PHOTOELECTRON X (XPS)..... 115
2.6.1 Principe de la mesure..... 115
2.6.2 Protocole opératoire..... 116
2.6.3 Courbe type obtenue 116

Chapitre 3 Les modèles biologiques et tests de toxicité..... 119

3.1 TESTS DE CYTOTOXICITE..... 119
3.1.1 La lignée humaine MCF-7..... 119
3.1.2 Culture des cellules MCF-7..... 120
3.1.3 Test de viabilité/prolifération cellulaire au MTT sur MCF-7..... 120
a) Principe..... 120
b) Protocole..... 121
c) Comptage du nombre de cellules N_0 24h après ensemencement..... 121
d) Préparation des solutions d'exposition..... 121
3.2 TRAITEMENT DES DONNEES..... 122

3.2.1 La lignée de poisson SAF-1 123
3.3 TESTS DE GENOTOXICITE ET MUTAGENICITE 124
3.3.1 Evaluation de la génotoxicité par SOS Chromotest 124
a) Principe 124
b) Protocole opératoire 124
3.3.2 Evaluation de la génotoxicité à l'aide du test "micronoyaux" sur cellules CHO 125
a) Principe 125
b) Culture et traitement des cellules CHO 126
c) Numération des micronoyaux 126
3.3.3 Evaluation de la mutagénicité 127
a) Principe du test d'Ames fluctuation 127
b) Protocole opératoire (Xenometrix) 128
3.4 TEST D'EMBRYOTOXICITE 128
3.4.1 Principe du test de développement larvaire 128
3.4.2 Protocole opératoire 129

Chapitre 1 Caractérisation physico-chimique des formulations et des nanoparticules 133

1.1 PROCEDE DE FORMULATION 133
1.1.1 Exigences de la formulation cosmétique 133
1.1.2 Nanoparticules dans la phase grasse 133
a) Protocole original 133
b) Pâte de nanoparticules 134
1.1.3 Optimisation de différents paramètres 136
a) Formulation sans nanoparticules 136
b) Formulation avec nanoparticules : F-N1 et F-N2 137
c) Formulation avec un pourcentage variable en nanoparticules : F'-N 138
1.1.4 Comparaison avec des crèmes commerciales 138
1.2 MICROSTRUCTURE DES EMULSIONS 139
1.2.1 Emulsions sans nanoparticules 140
a) Granulométrie 140
b) Visco-élasticité 141
c) Potentiel Zêta 143
1.2.2 Emulsions avec nanoparticules 146
a) Emulsions avec les nanoparticules de coating 1 : F-N1 146
b) Emulsion avec les nanoparticules de coating 2 : F-N2 151
c) Impact de l'incorporation des nanoparticules 155
1.2.3 Conclusion 160
1.3 VIEILLISSEMENT DES EMULSIONS 160
1.3.1 Stabilité au cours du temps à température ambiante 161
a) Emulsion sans nanoparticules F-0 161
b) Emulsions avec nanoparticules 166
c) Synthèse 171
1.3.2 Vieillissement accéléré 172
a) Emulsion sans nanoparticules 172
b) Emulsions avec nanoparticules 175
c) Synthèse 181
1.4 EXTRACTION DU MILIEU DE FORMULATION DES NANOPARTICULES 181
1.4.1 Nanoparticules brutes 182
a) Analyses infrarouge 182
b) Potentiel Zêta 183
1.4.2 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules extraites : 1er protocole 184
a) Potentiel Zêta 184
b) Infrarouge 185
1.4.3 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules extraites : 2nd protocole 187

a) Analyses Infrarouge *187*
b) Potentiel Zêta *189*
c) Analyses XPS *190*

Chapitre 2 Evaluation toxique des formulations cosmétiques et des nanoparticules 193

2.1 QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES CREMES COSMETIQUES *193*
2.2 TOXICITE DES FORMULATIONS COSMETIQUES *193*
2.2.1 Formulation sans nanoparticules F-0 193
a) Inhibition de croissance et mortalité cellulaire *193*
b) Génotoxicité *197*
c) Embryotoxicité *198*
2.2.2 Formulations incorporant 5% nanoparticules : F-N1 et F-N2 199
a) Lignées humaines MCF-7 ..... *199*
b) Lignées de poisson SAF-1 ..... *202*
c) Génotoxicité *202*
d) Embryotoxicité *203*
2.2.3 Formulations F' incorporant une proportion variable de nanoparticules 203
2.2.4 Formulations vieillies 207
2.3 TOXICITE DES NANOPARTICULES *211*
2.3.1 Toxicité des nanoparticules brutes 211
a) Inhibition de croissance *212*
b) Génotoxicité *213*
c) Embryotoxicité *214*
2.3.2 Toxicité des nanoparticules extraites 214
a) Premier protocole d'extraction (sans DMSO) *214*
b) Second protocole d'extraction (avec DMSO) *218*
2.4 CONCLUSION *220*

Chapitre 3 Discussion générale 231

3.1 DES CONDITIONS D'EXPERIMENTATION ELOIGNEES DE LA REALITE *231*
3.1.1 Des systèmes étudiés non représentatifs d'une situation d'exposition 231
3.1.2 Difficultés d'évaluation des concentrations d'exposition 232
3.1.3 Inter-comparaison entre les tests de toxicité 233
a) Test LDH *233*
b) Test WST1 ..... *234*
c) Test MTT *235*
3.1.4 Complexité liée à la multitude des caractéristiques physico-chimiques 236
3.2 IMPORTANCE DU TRAITEMENT DE SURFACE *236*
3.2.1 Evolution physico-chimique 236
3.2.2 Impact toxicologique 237

REFERENCES 249

ANNEXES 269

Table des figures

Figure 1 - Représentation schématique des émulsions Huile-dans-Eau et Eau-dans-Huile 27
Figure 2 - Variation du potentiel d'interaction total avec la distance entre particules selon la théorie de DLVO. 33
Figure 3 - Phénomènes d'instabilité des émulsions (Rodriguez Rojas 2007) 34
Figure 4 - Distributions de taille des gouttelettes pour des dispersions de toluène en présence de PVA, avec une comparaison entre valeurs expérimentales et prédites (Bąk & Podgórska 2013) 36
Figure 5 - Classement des techniques de granulométrie en fonction de la taille des particules 40
Figure 6 – Principe du cisaillement d'un fluide entre deux surfaces planes 41
Figure 7 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de G' et G'' en fonction de la déformation 44
Figure 8 - Charges de surface d'une particule 48
Figure 9 - Influence de la taille de particules du TiO_2 sur le spectre d'absorption (Chen, Tooley & Wang 2012). En bleu : 20nm, En vert : 50nm, en rouge : 100 nm 54
Figure 10 - Schéma du mécanisme d'atténuation des UV par des nanoparticules de TiO_2 56
Figure 11 - Exemples des réactions liées aux différentes propriétés de surfaces d'une nanoparticule inorganique (Auffan et al. 2009) 57
Figure 12 - Greffage du triethoxycaprylylsilane sur la surface de dioxyde de titane (Kobo 2012) 59
Figure 13 - Représentation schématique d'une nanoparticule de TiO_2 enrobée de deux couches successives de traitement de surface (Labille et al. 2010) 59
Figure 14 - Formation d'agrégats et agglomérats depuis des nanoparticules de tailles primaires 62
Figure 15 - Les voies d'exposition des substances toxiques et leur distribution dans l'organisme humain (El Yamani & Seret) 73
Figure 16 - Structure chimique du triethoxycaprylylsilane 98
Figure 17 – Structure chimique de l'isopropyl titanium triisostearate (ITT) 98
Figure 18 - Réaction chimique entre l'ITT et la surface du TiO_2 (Kobo) 99
Figure 19 - Représentation de la structure chimique du coating 2, $R=C_8H_{15}$ (Kobo) 99
Figure 20 - Représentation schématique des phénomènes de diffusion de la lumière incidente en fonction de la taille des particules 107
Figure 21 - Courbes type obtenues de distribution de taille de particules colloïdales en pourcentage volumique : courbe granulométrique (en bleu) et courbe cumulative (en rouge) 109
Figure 22 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de G' et G'' en fonction de la déformation 111
Figure 23 - Balayage en déformation : représentation de tan (δ) en fonction de la déformation 111
Figure 24 - Courbe type obtenue de la distribution de potentiel zêta pour trois mesures 113
Figure 25 - Spectre d'absorption de nanoparticules de dioxyde de titane (Baiju et al. 2009) 115
Figure 26 - Principe schématique de la spectroscopie de photoélectrons X (http://www.coretechint.com/technical_info-xps.php) 116
Figure 27 – Spectre obtenue lors d'une mesure XPS dans le cas d'un dépôt ultra mince de TiO_2 sur silicium (http://icb.u-bourgogne.fr/SCAI/Analyses/SIMS/XPS4.html) 117
Figure 28 - Réduction du MTT en formazan 120
Figure 29 - Les deux réactions intracellulaires du CellTracker Vert, CMFDA. 123

Figure 30 - Différentes anomalies du développement embryonnaire de l'huître: larve normale (a), anomalie du manteau (b), anomalie de la charnière (c) et blocage au stade embryonnaire (d). 129
Figure 31 – Les différentes étapes du procédé de formulation pour des émulsions contenant des nanoparticules. 134
Figure 32 - Clichés microscopiques (x200) de la dispersion de nanoparticules dans l'ester cetearylethylhexanoate, avant (a) et après broyage (b) au tricylindre 135
Figure 33 - Distribution de taille en pourcentage volumique des nanoparticules de TiO_2 (coating 1 et 2) dans le DMSO 135
Figure 34 - Courbes cumulatives des nanoparticules de coating 2 dispersées dans le DMSO : non broyées (noir), broyées une fois (rouge) et broyées trois fois (vert) 136
Figure 35 - Images microscopiques des formulations F-0 initiale (a) et optimisée (b) 137
Figure 36 - Images microscopiques de l'émulsion F-N1 finale à 5% en nanoparticules à l'état initial 138
Figure 37 - Images microscopiques de crèmes solaires commerciales contenant du dioxyde de titane 139
Figure 38 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-0 à l'état initial .. 141
Figure 39 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de G' et G'' à l'état initial 142
Figure 40 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de tan(δ) à l'état initial 142
Figure 41 - Evolution du potentiel zêta avec le pH pour l'émulsion F-0 à l'état initial 143
Figure 42 - Evolution du potentiel zêta de la phase grasse dans l'eau à l'état initial 144
Figure 43 - Evolution du potentiel Zêta avec le pH en fonction des ingrédients de la formulation 145
Figure 44 - Distribution de taille des particules colloïdales en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N1 à l'état initial 147
Figure 45 - Balayage en déformation de F-N1 à l'état initial 149
Figure 46 - Evolution du potentiel zêta avec le pH pour l'émulsion F-N1 à l'état initial 150
Figure 47 – Potentiel zêta de l'alumine, du dioxyde de titane et du mélange (50/50) des deux particules dans le DMSO 151
Figure 48 - Distribution de taille des particules colloïdales en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N2 à l'état initial 152
Figure 49 - Balayage en déformation de F-N2 à l'état initial 152
Figure 50 - Images microscopiques des formulations F-N1 (a) et F-N2 (b) à 72h après formulation 154
Figure 51 - Evolution du potentiel zêta avec le pH pour l'émulsion F-N1 et F-N2 à l'état initial 155
Figure 52 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F'-0 à l'état initial . 156
Figure 53 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F'-N aux différents pourcentages de nanoparticules à l'état initial 157
Figure 54 - Images microscopiques de l'émulsion F'-N à différents pourcentages en nanoparticules à l'état initial 159
Figure 55 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-0 après un vieillissement à température ambiante de 72h et de 65 jours 162
Figure 56- Image microscopique de la formulation F-0, 65 jours après un vieillissement à température ambiante 162
Figure 57 - Courbe modélisée du potentiel zêta en fonction du pH pour F-0 vieillie à 72h à température ambiante 164

Figure 58 – Evolution du potentiel zêta de F-0 en fonction du temps lors d'un vieillissement à température ambiante, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5..... 165
Figure 59 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N1 après un vieillissement à température ambiante de 72h et de 65 jours 167
Figure 60 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N2 après un vieillissement à température ambiante de 72h et de 65 jours 167
Figure 61 - Evolution du potentiel zêta de F-N1 et F-N2 en fonction du temps lors d'un vieillissement à température ambiante, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5..... 168
Figure 62 - Images microscopiques de la formulation F-0, (a) 28 jours après un vieillissement à 50°C et (b) 65 jours après un vieillissement à température ambiante..... 173
Figure 63 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-0 après un vieillissement à température ambiante de 65 jours et un vieillissement à 50°C de 72h et 65 jours..... 174
Figure 64 - Evolution du potentiel zêta de F-0 en fonction du temps lors d'un vieillissement à 50°C, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5 174
Figure 65 - Images microscopiques des formulations F-N1 à différents temps de vieillissement. Après 65 jours à température ambiante (a), 72h à 50°C (b) et 21 jours à 50°C (c) 176
Figure 66 - Images microscopiques des formulations F-N2 à différents temps de vieillissement. Après 43 jours à 50°C : on observe l'agrégation des nanoparticules d'un côté (a), et les gouttelettes d'huile de l'autre (b) 177
Figure 67 - Evolution du potentiel zêta de F-N1 et F-N2 en fonction du temps lors d'un vieillissement à 50°C, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5 178
Figure 68 – Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules de coating 1 (en rouge) et 2 (en noir) 183
Figure 69 - Potentiel zêta des nanoparticules de TiO_2 brutes et du TiO_2 non nanométrique et non traité..... 184
Figure 70 - Potentiel zêta des nanoparticules brutes et extraites selon le 1^{er} protocole d'extraction des formulations fraîche et vieillie (40 jours), pour les deux traitements de surface utilisés 185
Figure 71 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations fraîches de coating 1 (noir) et 2 (bleu)..... 186
Figure 72 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations vieillies (40 jours) de coating 1 (bleu) et 2 (rouge) 187
Figure 73 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations F-N2 fraîches selon le premier (noir) et second protocole (bleu)..... 188
Figure 74 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations fraîches (coating 1 en noir, coating 2 en rouge) et vieillies (coating 1 en bleu, coating 2 en vert) selon le second protocole 189
Figure 75 - Potentiel zêta des nanoparticules brutes et extraites selon le $2^{ème}$ protocole d'extraction des formulations fraîche et vieillie (40 jours), pour les deux traitements de surface utilisés..... 190
Figure 76 - Spectre XPS des nanoparticules de coating 1 191
Figure 77 - Spectre XPS des nanoparticules de coating 1 extraites d'une formulation fraîche selon le 2^{nd} protocole 192
Figure 78 - Prolifération des cellules MCF-7 en présence de doxorubicine à différentes concentrations..... 194

Figure 79 - Courbe dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration de formulation fraîche de F-0, n=6 196
Figure 80 - SOS Induction Factors obtenus pour la formulation fraîche F-0 en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3 197
Figure 81 – Pourcentage de viabilité obtenus pour la formulation fraîche F-0 en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3 198
Figure 82 -Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de la formulation F-0 testée. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3 199
Figure 83 - Courbe dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F-0, F-N1, F-N2, n=6 200
Figure 84 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 à 10mg/L, (: différence significative par rapport au contrôle, p<0,1 et ** p<0,01 et *** p<0,001), n=6 ..... 201*
Figure 85 - Valeurs des EC_{50} pour F-0, F-N1 et F-N2 fraîches, (: différence significative par rapport au contrôle, p<0,1), n=6 ..... 202*
Figure 86 – Prolifération cellulaire des formulations fraîches F-0 (blanc) et F-N1 (noir), n=3 202
Figure 87 - Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de la formulation FN1 fraîche testée. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3 203
Figure 88 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F'-0, F'-N (2,5%), F'-N (5%), F'-N (7%), F'-N (10%), n=6 204
Figure 89 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F' fraîches à 10mg/L, (: différence significative par rapport au contrôle p<0,1 et ** p<0,01 et *** p<0,001, # : différence significative par rapport à la formulation F'-0), n=6 ..... 205*
Figure 90 - Valeurs des EC_{50} pour les formulations F' fraîches, (## : différence significative par rapport à F'-0, p<0,01 et ### p<0,001), n=6 206
*Figure 91 - Valeurs des EC_{50} pour des formulations sans nanoparticules (F-0 et F'-0) et des formulations contenant 5% de nanoparticules de coating 2 (F-N2 et F'-N (5%)) fraîches, (*** : différence significative p<0,001) n=6 ..... 207*
Figure 92 - Courbe dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations vieillies pour F-0, F-N1, F-N2, n=6 208
Figure 93 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 vieillies, à une concentration de 10mg/L, (: différence significative par rapport au contrôle p<0,1 et *** p<0,001), n=6 ..... 208*
*Figure 94 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F' vieillies à une concentration de 10mg/L, (** : différence significative par rapport au contrôle p<0,01 et *** p<0,001, ## : différence significative par rapport à la formulation F'-0 p<0,01), n=6 ..... 209*
Figure 95 - Valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 vieillies, (: différence significative par rapport à F-0, p<0,1, *** : p<0,001), n=6 ..... 210*
*Figure 96 – Valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 fraîches et vieillies, (**: différence significative p<0,01), n=6 ..... 210*
Figure 97 - Valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, et F', fraîches et vieillies, n=6 211

Figure 98 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules de coating 1 et de coating 2, n=6 ..... *212*
Figure 99 - Viabilité cellulaire en présence de nanoparticules brutes NP1 et NP2, n=3 ..... *213*
Figure 100 - SOS Induction Factors obtenus pour les nanoparticules de coating 1 (NP1) en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3 ..... *213*
Figure 101 - Pourcentage de viabilité obtenus pour les nanoparticules de coating 1 (NP1) en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3 ..... *214*
*Figure 102 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 fraîches selon le premier protocole d'extraction, (*** : différence significative par rapport au contrôle p<0,001), n=6* *215*
Figure 103 - Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de nanoparticules extraites de F-N1 fraîche testée, selon le premier protocole d'extraction. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3 ..... *216*
Figure 104 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 vieillies selon le premier protocole d'extraction, n=6 ..... *217*
Figure 105 - Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de nanoparticules extraites de formulation F-N1 vieillie testée, selon le premier protocole d'extraction. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3 ..... *218*
Figure 106 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 fraîches, selon le second protocole d'extraction, n=6 ..... *219*
Figure 107 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 vieillies, selon le second protocole d'extraction, n=6 ..... *220*
*Figure 108 - Effet des différents systèmes testés de la formulation F pour une concentration de 10mg/L, (*** : différence significative par rapport au contrôle [calculé sur l'ensemble des tests réalisés] p<0,001), n=6* *225*
*Figure 109 – Valeur des EC_{50} des différents systèmes testés pour la formulation F, (** : différence significative par rapport à la formulation fraîche sans nanoparticules F-0 p<0,01), n=6* *226*
Figure 110 - Valeur des EC_{50} et CMEO en mg/L des différents systèmes testés, toujours avec le coating 1 ..... *227*
*Figure 111 - Effet des différents systèmes testés de la formulation F' pour une concentration de 10mg/L, (*** : différence significative par rapport au Contrôle [calculé sur l'ensemble des tests réalisés] p<0,001)* *228*
*Figure 112 - Valeur des EC_{50} des différents systèmes testés pour la formulation F', (*** : différence significative par rapport à la formulation fraîche sans nanoparticules F'-0 p<0,001)* *229*
Figure 113 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F'-0 par le test WST1, n=6 ..... *234*
Figure 114 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F'-0, F'-N (2,5%), F'-N (5%), F'-N (7%), F'-N (10%) par le test WST1, n=6 ..... *235*

Table des tableaux

Tableau 1 - Composition d'une formulation de produit solaire (http://www.specialchem4cosmetics.com/formulations/guides/recipe.aspx?id=6) *29*

Tableau 2 –Signification de l'évolution au cours du temps des paramètres rhéologiques lors d'un balayage en déformation *47*

Tableau 3 - Composition des nanoparticules de TiO_2 utilisées et proportion de leur traitement de surface (en gras) *100*

Tableau 4 – Appellations des formulations F et F' *100*

Tableau 5 - Ingrédients de la phase A grasse et de la phase B aqueuse, utilisés pour la préparation des émulsions avec (F-N) ou sans nanoparticules (F-0), avec leur proportion, leur fonction et leur fournisseur *101*

Tableau 6 - Concentrations en formulation et en nanoparticules dans le RPMI *122*

Tableau 7 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0 et F-N1 ..... *149*

Tableau 8 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0, F-N1 et F-N2 ..... *153*

Tableau 9 - Pourcentage volumique des particules inférieures à 2,5 µm ou supérieures à 10 µm, ainsi que le diamètre D[3,2] pour les émulsions F' à l'état initial *157*

Tableau 10 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0 et F'-0 ..... *158*

Tableau 11 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F'-N à 2,5 ; 5 ; 7 et 10 % *158*

Tableau 12 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0, pour un vieillissement à température ambiante pour des durées de 1 à 65 jours *161*

Tableau 13 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-N1 et F-N2 pour un vieillissement à température ambiante pour des durées de 1 à 65 jours *166*

Tableau 14 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F' à différents % de nanoparticules, pour un vieillissement à température ambiante et pour des durées de 1 à 65 jours *170*

Tableau 15 – Pourcentage volumique des particules inférieures à 2,5 µm ou supérieures à 10 µm, ainsi que le diamètre D[3,2] pour les émulsions F' pour un vieillissement à 72h et 65 jours à température ambiante *171*

Tableau 16- Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0 pour un vieillissement à température de 50°C pour des durées de 1 à 65 jours *172*

Tableau 17 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-N1 et F-N2 pour un vieillissement à température de 50°C pour des durées de 1 à 65 jours *175*

Tableau 18 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F' à différents % de nanoparticules, pour un vieillissement à 50°C et pour des durées de 1 à 65 jours *180*

Tableau 19 - Pourcentage volumique des particules inférieures à 2,5 µm ou supérieures à 10 µm, ainsi que le diamètre D[3,2] pour les émulsions F' pour un vieillissement à 72h et 65 jours à 50°C *181*

Tableau 20 – Paramètres rhéologiques et Valeurs d'EC_{50} pour F-0, F'-0, F-N2 et F'-N(5%) *207*

Tableau 21 - Taux de croissance à 10mg/L (σ_{10}) et EC_{50} des formulations F-0, F-N1 et F-N2, fraîches et vieillies, pour les différents tests réalisés. Les résultats significativement différents du σ_{10} contrôle ou de l'EC_{50} de F-0 sont dans des cases roses, dans le cas contraire, la case est bleue *223*

Tableau 22 - Taux de croissance correspondant à une concentration de formulation de 10mg/L (σ_{10}) et EC_{50} des nanoparticules brutes et extraites des formulations fraîches et vieillies pour les différents tests réalisés..... 224
Tableau 23 – Taux de croissance à 10mg/L (σ_{10}) et EC_{50} des formulations F' fraîches et vieillies pour les tests MTT 224

Dénomination des formulations

Sigle	Signification
F-0	Formulation F sans nanoparticules
F-N1	Formulation F avec nanoparticules de coating 1
F-N2	Formulation F avec nanoparticules de coating 2
F'-0	Formulation F' sans nanoparticules
F'-N(2,5%)	Formulation F' avec 2,5% de nanoparticules de coating 2
F'-N(5%)	Formulation F' avec 5% de nanoparticules de coating 2
F'-N(7%)	Formulation F' avec 7% de nanoparticules de coating 2
F'-N(10%)	Formulation F' avec 10% de nanoparticules de coating 2

Remerciements

Ce manuscrit marque l'aboutissement de quatre années de travail intense et de rencontres amicales. Cet avant-propos est l'occasion de remercier tous ceux qui m'ont suivie, qui m'ont soutenue, qui m'ont encouragée (ce sera d'ailleurs très probablement la partie la plus lue de tout le manuscrit de thèse…).

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury pour l'attention qu'ils ont prêtée à mon travail ainsi que pour leurs remarques constructives qu'ils ont apportées. Je remercie Madame Perla Relkin et Monsieur François Sichel d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Jérôme Labille qui a également assuré un examen très attentif de mes travaux.

Ce travail a été effectué à l'Université du Havre en co-tutelle aux laboratoires URCOM et UMR-Sebio (ex LEMA). Je tiens à remercier Michel Grisel, directeur de l'URCOM pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et je le remercie également en tant que directeur de thèse, pour m'avoir confié ce travail, guidée tout au long de ces années, et pour avoir contribué à la qualité des raisonnements et interprétations de ce travail. De la même façon, je tiens à adresser chaleureusement à Frank Le Foll, mon deuxième directeur de thèse, mes remerciements pour son aide, ses conseils, ses idées et notamment de m'avoir fait confiance pour la mise en place des tests biologiques que je ne maîtrisais pas du tout avant mon arrivée au laboratoire.

Je souhaiterais aussi remercier vivement mes encadrants Céline Picard et Nicolas Hucher, pour leur disponibilité et pour toutes leurs explications pendant ces quatre années qui ont permis une meilleure compréhension des résultats obtenus, même lorsque parfois leur interprétation était loin d'être évidente.

Mes sincères remerciements vont également à toute l'équipe de l'URCOM qui m'a chaleureusement accueillie dans les laboratoires. Je pense aux permanents avec qui il est toujours agréable de discuter (et de faire des bonnes blagues, n'est-ce pas Sébastien et Fred), à la présence intemporelle d'Odile Petibon et sa disponibilité sans faille, à l'aide technique si précieuse de Vincent Loisel, aux ATER, aux post-docs et aux stagiaires qui évoluent au fil des années. Un grand merci également à l'équipe de TOXEM dirigée par Jérôme Couteau qui m'a permis d'apporter d'importants résultats grâce aux tests de génotoxicité et mutagénicité. Merci aux Géraldine« s » pour leurs conseils au laboratoire tout au long de la thèse ! C'est également grâce aux nombreux conseils de Jennifer Pasquier et Imane Abbas que j'ai pu apprendre les bases de la culture cellulaire : sans vous cela aurait été nettement plus compliqué ! Un très grand merci également à Anne Banville, qui a toujours été disponible pour m'aider dans mes manipulations de granulométrie au LOMC et pour nos grandes discussions métaphysiques devant les machines.

C'est avec beaucoup de nostalgie (et presque plus aucun synonyme du mot « remercier »), que j'en viens à remercier (voilà je vous avais prévenu) tous mes amis doctorants et ex- doctorants. Je pense à la vieille époque avec Mélanie, Aurélie, Liliana, Alice et Bastien qui m'ont permis de m'intégrer facilement à la vie du laboratoire ; à la nouvelle vague avec Catalin, Malina, Ronan, Mathieu, Leïla, Audrey, Igor, Pauline, et en particulier Laura R. à qui je souhaite bon courage dans la suite de ma thèse. Et puis à la période centrale où les collègues sont devenus de vrais amis. Pierre-Yves, merci pour nous avoir fait croire pendant tous ces moments partagés que les discussions de filles t'intéressaient vraiment. Laura, merci pour les nombreux échanges scientifiques et cosmétiques, les formations et congrès qu'on a passés ensemble et puis surtout de m'avoir permis au moins une fois dans ma vie de rencontrer « Dieu », ce qui n'est pas rien. Julie, certes tu n'étais pas doctorante, mais ta place est au-delà de cela, tu le sais bien. J'ai été ravie de pouvoir faire mes premiers pas de course grâce à toi, de pouvoir discuter de tous les sujets sans aucun tabou (non aucune précision ne sera donnée ici) et surtout d'avoir pu t'accompagner dans des étapes si importantes de ta vie. Enfin Adeline, à ce moment précis où j'écris ces mots, il me semble que « tu n'as jamais été aussi proche de la fin » et je sais pertinemment que tu géreras la situation parfaitement. Je pense avoir peu parlé d'autant de choses philosophiques de la vie qu'avec toi (en particulier en blouse blanche, à 20h, et devant la paillasse !). Merci à tous pour toute cette complicité qui m'a permis de vivre ces quatre ans au Havre comme une excellente période de ma vie, quoique j'aie pu dire certaines fois !

Je remercie évidemment tous mes amis hors contexte professionnel, sans qui la vie de thésarde aurait été beaucoup moins drôle. Grâce à toute la bande de Tof, Hélène, Joss, Tutu, Max, Nicole, Paul, Anto, Vianney, Mathieu, Mitch, 2dt, j'ai pu profiter de moments forts en émotion, avec un nombre de soirées à la clé incalculable et aux thématiques fort diverses (baignoire, chochoï, kisscool…). Le BDE, bien qu'aux quatre coins de la France, m'a toujours également soutenue dans les moments les plus difficiles. J'ai notamment pu compter sur la porte de Jonas toujours ouverte, au soutien infaillible de Thomas dans sa reconnaissance de ma thèse exclusive de bibliographie, à l'expression de joie de Luc consistant à renverser toutes sortes de légumineuses chez moi, mais aussi aux véritables soutiens (souvent par échange de mails !) de Grande Manon, Audrey et Dianne, sans oublier Kim, Nadia, Caro, Mathias, Ludo, Fred, Romain et ses lichens (Darnajoux *et al.* 2014). Une pensée particulière pour Philippe (que je cite d'ailleurs alors qu'il ne m'a pas remercié en 2012), expatrié mais toujours présent. Je pense souvent que c'est grâce à l'esthétisme esthétisant de la peinture flamande du XVIII^{ème} siècle que j'ai tenu bon. La Normandie ce fut aussi l'occasion de rencontrer des « nouvelles » amies parisiennes : Clémentine et Hortense dans les labos de la fac du Havre et Emilie à un EVJF à Etretat ! Merci aussi à Caro W. qui depuis de longues années est également présente et sur qui je peux toujours compter.

Evidemment, ces dernières années ont été rythmées par les réunions régulières avec les intemporelles Anaelle et Marie, à qui je dois énormément et qui ont toujours été là. Un vrai trio gagnant !

Mes remerciements ne seraient pas complets sans ceux adressés à ma famille : mes parents, mon frère Antoine, ma sœur Anaïs. Cette période de doctorat est associée à leur « American Dream » vécu à San Francisco, et au-delà des 8964 km de distance, j'ai toujours ressenti un soutien sans faille de leur part et une foi en ma réussite, ce qui m'a toujours permis d'aller de l'avant.

Enfin, je termine ces remerciements pour la personne qui m'a vu évoluer (presque) chaque jour depuis le début de cette thèse, qui a toujours su me soutenir et trouver les mots afin que je persévère jusqu'au bout dans mon travail. Malgré la distance je n'ai pas à un seul instant douté de la force de ton amour. Merci Simon de m'avoir accompagné tout au long de cette étape, le chemin continue et j'ai l'impression qu'il est plutôt beau.

Il ne vous reste à présent plus que 260 pages environ pour vous faire une petite idée du travail accompli en ces quatre ans. Je ne doute pas un seul instant que cela vous passionnera tous !

Introduction générale

Le rayonnement ultraviolet absorbé par le tissu cutané crée des dommages dont les conséquences sont nombreuses, comme l'apparition d'érythèmes solaires, l'accélération du vieillissement de la peau, et l'apparition de cancers cutanés de types carcinomes et mélanomes (Armstrong & Kricker 2001). Au vu de la forte augmentation des cancers de la peau ces dernières années (*La situation du cancer en France en 2012* 2012), il est aujourd'hui nécessaire de modifier les comportements des consommateurs par rapport à l'exposition solaire. Un moyen efficace de protection est l'utilisation d'un produit écran solaire. Celui-ci se doit de répondre aux exigences et qualités spécifiques de photoprotection, d'innocuité, de stabilité, et de résistance à l'eau et à la transpiration. De plus, l'absence de dégradation et de photodégradation chimique du produit doit être assurée.

Afin de répondre au mieux à ces exigences de formulation, l'industrie cosmétique a mis au point différentes stratégies dont certaines innovations récentes sont issues des nanotechnologies. Les nanosciences et nanotechnologies ont connu en effet un essor fulgurant ces dernières décennies au sein de diverses industries. Le terme « nano » fait référence à l'échelle du nanomètre (10^{-9} m) et cette réduction des dimensions à l'échelle nanométrique permet l'émergence de propriétés nouvelles. Parmi les produits cosmétiques et soins personnels qui contiennent des nanomatériaux, on peut citer les déodorants, savons, dentifrices, shampoings, les crèmes de soin et crèmes solaires, les fonds de teint, les rouges à lèvres, et autre produits de maquillage contenant des pigments. Les fullerènes de carbone par exemple sont utilisés comme des actifs antioxydants aux propriétés antiradicalaires (Benn, Westerhoff & Herckes 2011), les nanoparticules d'argent comme des conservateurs (Kokura *et al.* 2010) et les oxydes de métal comme l'oxyde de zinc (ZnO), l'oxyde ferrique (Fe_2O_3) et le dioxyde de titane (TiO_2) généralement en tant que filtres solaires. Le dioxyde de titane est le composé minéral photoprotecteur le plus couramment utilisé.

Cependant l'utilisation de ce nouveau type d'ingrédient soulève des interrogations quant à la santé. Le NIOSH (*The National Institute for Occupational Safety and Health*) a notamment classé le TiO_2 de taille nanométrique comme cancérogène professionnel et a fixé des valeurs limites d'exposition professionnelle par inhalation de 0,3 mg/m^3 pour les particules nanométriques, alors qu'elles sont de 2,4 mg/m^3 pour les particules submicroniques (*Occupational Exposure to Titanium Dioxide* 2011). Ces nanoparticules sont notamment examinées par rapport à deux types de risque : une réactivité cellulaire et tissulaire particulière en rapport avec leur très petite taille, et un risque de passage de barrières physiologiques, comme la peau ou la barrière pulmonaire. Cette toxicité est d'autant plus difficile à évaluer, que les recherches publiées sur le sujet ne précisent pas systématiquement les propriétés exactes des nanomatériaux considérés, en termes de taille, de forme ou de traitement de surface, des caractéristiques physico-chimiques portant irrémédiablement à leurs effets biologiques.

La question du vieillissement de ces matériaux a également été très peu traitée. Ces interrogations se posent également lors de la dissémination de ces particules dans les écosystèmes, puisqu'il est à ce jour encore difficile de contrôler leur cycle de vie. Les crèmes solaires présentent en particulier un fort risque de relargage direct des nanoparticules dans l'environnement aquatique, immédiatement après application sur la peau. Par "relargage" des nanomatériaux, on désigne le phénomène par lequel des nanomatériaux, ou des résidus de dégradation des nanomatériaux, sont émis dans l'environnement. Ce relargage de nanomatériaux peut intervenir lors de l'utilisation directe du produit ou par l'usure, l'abrasion ou la dégradation des produits. C'est le cas de crèmes solaires dans l'air lors de la vaporisation de sprays ou dans l'eau lors de la baignade après application sur la peau du produit. Lors de l'application, l'émulsion « casse » sous l'effet du cisaillement dû au massage sur la peau, libérant ainsi la phase grasse et donc les nanoparticules directement à la surface de la peau. Les nanoparticules sont donc ensuite amenées à rester à la surface de la peau, ou à se répandre dans les eaux de baignade.

Une étude récente a estimé qu'entre 63 et 91% de 300 000 tonnes de nanomatériaux manufacturés produits dans le monde en 2010 ont fini dans des décharges, le reste étant relargué dans les sols (8 à 28%), l'eau (de 0,4 à 7%), ou l'atmosphère (0,1-1,5 %) (Keller *et al.* 2013). Il est très difficile de connaître la part des produits solaires contenant du TiO_2 nanométrique et la teneur moyenne dans ces produits. L'Afsset a donc estimé un majorant pour la quantité de TiO_2 disséminée annuellement en France dans l'environnement : en considérant que toutes les crèmes solaires contiennent 10 % de TiO_2, l'usage des crèmes solaires aboutit à un relargage de TiO_2 nanométrique dans le milieu naturel de 230 tonnes par an (*Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement* 2010). Les conséquences de la pollution des nanoparticules sur l'environnement n'ont pas été suffisamment évaluées (Borm *et al.* 2006). Il a certes été montré que des ingrédients de protection solaire endommageaient la barrière de corail (Danovaro *et al.* 2008) mais très peu d'études se sont à ce jour intéressées au devenir environnemental des nanoparticules issues directement des produits manufacturés (Labille *et al.* 2010; Foltête *et al.* 2011; Fouqueray *et al.* 2012). Il devient donc urgent de procéder à des évaluations environnementales approfondies afin de maîtriser les risques associés à l'utilisation généralisée de ces ingrédients chimiques dans les produits de soins personnels (Tiede *et al.* 2008).

Ce travail propose une caractérisation de formulations cosmétiques contenant des nanoparticules de dioxyde de titane, par différentes techniques d'analyse afin de comprendre les mécanismes de vieillissement et d'évolution des nanoparticules au sein des émulsions. Nous expliquerons ici dans quel cadre et en quoi nos résultats apportent des éléments

nouveaux par rapport au contexte actuel de l'étude des nanoparticules de TiO_2 utilisées dans les produits cosmétiques solaire, tout en prenant en compte le cycle de vie du produit manufacturé. Les formulations ont été volontairement réalisées en laboratoire, afin de pouvoir maîtriser chacun des ingrédients incorporés. L'éventuelle toxicité cellulaire de ces formulations modèles a ensuite été recherchée par des tests de survie/prolifération *in vitro* sur des cellules en culture, une approche complétée par des tests d'embryotoxicité et de génotoxicité. De plus, comme il est probable que les nanoparticules subissent des modifications au cours de leur incorporation dans la formulation et pendant le vieillissement du produit, nous avons procédé à leur extraction après vieillissement afin de caractériser des évolutions physico-chimiques potentielles.

Le présent document est constitué de trois parties. Dans une première partie, est présenté un état actuel de la littérature définissant la composition et les propriétés des émulsions cosmétiques solaires contenant des nanoparticules de dioxyde de titane. Un certain nombre de données disponibles décrivant les propriétés toxiques, cytotoxiques et écotoxiques de ces nanoparticules sont également détaillées. Dans une deuxième partie Matériels et Méthodes, nous définissons la stratégie de choix des matières premières sélectionnées, les protocoles de formulation que nous avons mis en œuvre, les techniques d'analyse utilisées et les modèles cellulaires et tests de toxicité choisis. Enfin, dans une dernière partie nous présenterons les résultats obtenus. Nous avons élaboré des formulations cosmétiques type crèmes solaires, contenant deux types de nanoparticules de TiO_2, différant par leur traitement de surface. Le rôle des nanoparticules et, plus spécifiquement, l'impact des différents traitements de surface utilisés, sur la microstructure et la stabilité des formulations ont été évalués à l'aide des techniques d'analyses variées telles que la rhéologie, la microscopie, la granulométrie et les mesures de potentiel zêta. L'évolution de la stabilité de l'émulsion et l'état d'agrégation des nanoparticules seront ainsi suivis dans le temps et les phénomènes de déstabilisation seront identifiés. Nous donnons ensuite les procédés d'extraction des nanoparticules de la formulation, permettant ainsi de décrire les modifications subies au cours du vieillissement de ces nanoparticules, à l'aide de diverses analyses de surface. Dans une problématique d'évaluation des risques pour la santé et l'environnement, nous avons procédé à l'analyse cytotoxique des différents systèmes caractérisés précédemment. Nous avons recherché tout d'abord un éventuel effet cytotoxique des formulations elles-mêmes, fraîches et vieillies, sans puis avec nanoparticules, afin de pouvoir distinguer les effets de viabilité et mortalité cellulaire liés à la formulation seule et ceux liés aux nanoparticules. Les nanoparticules brutes, extraites de formulations fraîches ou vieillies ont également été soumises aux mêmes tests cytotoxiques que les formulations.

Ces travaux de thèse ont été réalisés en co-tutelle sous la direction du Pr Michel Grisel, dans l'équipe 2ISP de l'URCOM (*Unité de Recherche de Chimie Organique et Macromoléculaire*) et du Pr Frank Le Foll au sein du LEMA (*Laboratoire Ecotoxicité – Milieux Aquatiques*), à l'Université du Havre. Cette thèse a bénéficié d'une allocation de recherche du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, via l'Ecole Doctorale Normande de Chimie.

Partie 1 : Etude Bibliographique

Dans cette première partie, nous présenterons l'état des connaissances actuelles relatives aux émulsions cosmétiques solaires contenant des nanoparticules d'oxyde métallique et à leur étude cytotoxique. Dans un premier temps, nous rappelons quelques concepts généraux sur les émulsions ; les aspects liés à leur formulation, à leur évolution, et à leur caractérisation seront détaillés. Le chapitre 2 s'intéressera à l'utilisation et au rôle des nanoparticules de dioxyde de titane dans le secteur cosmétique. Enfin les problématiques de toxicité et d'écotoxicité de ces systèmes seront abordées dans le dernier chapitre.

Chapitre 1 *Les Emulsions - Généralités*

1.1 Elaboration des émulsions

1.1.1 Définition

Une émulsion est une dispersion d'un liquide en fines gouttelettes dans un autre liquide, les deux liquides étant non miscibles. La phase huileuse (ou phase grasse) contient les ingrédients type huiles, cires, graisses ainsi que des actifs liposolubles ; la phase aqueuse est quant à elle constituée d'eau et des composants hydrosolubles. Le liquide sous forme de gouttelettes est qualifié de phase dispersée (ou phase discontinue), tandis que l'autre liquide est appelé phase dispersante (ou phase continue). On peut alors obtenir des émulsions huile-dans-eau (H/E) ou eau-dans-huile (E/H), comme l'indique la Figure 1.

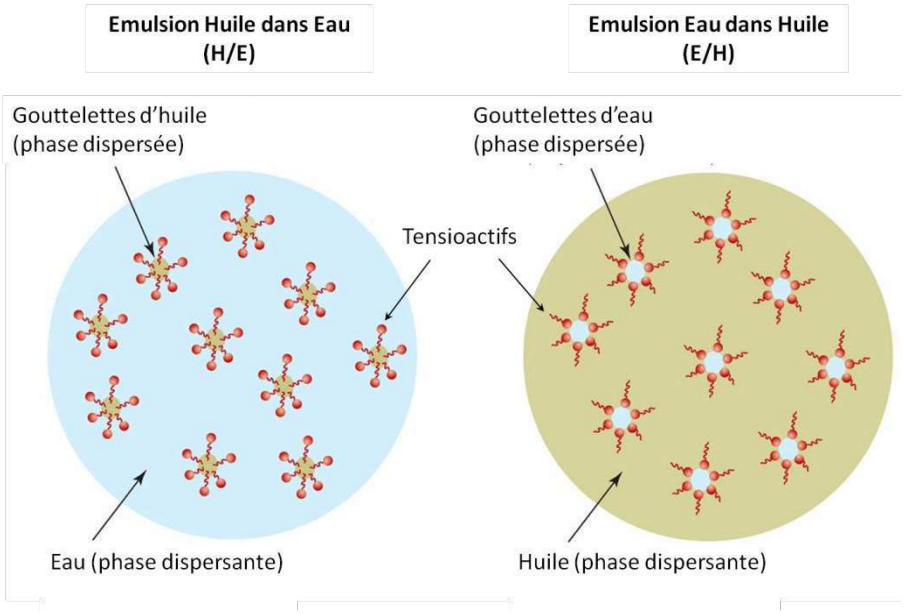


Figure 1 - Représentation schématique des émulsions Huile-dans-Eau et Eau-dans-Huile

En général, la fraction volumique de la phase continue est plus importante, mais lorsque celle-ci est inférieure à 30%, on parle d'émulsions concentrées (Solans, Esquena & Azemar 2003).
Il existe différents types d'émulsions.

- Les émulsions simples parmi lesquelles on distingue les macro-émulsions et les nano-émulsions, différant par la taille des gouttelettes (respectivement supérieures et inférieures au micromètre) ;
- Les émulsions multiples, qui consistent en une émulsion simple dispersée à son tour dans une phase continue externe ;
- Les microémulsions, qui sont des systèmes monophasiques particuliers et dont la taille des gouttelettes varie entre 10 et 100 nm (Doumeix 2011).

Les émulsions, excepté dans le cas des microémulsions, sont des systèmes thermodynamiquement métastables qui tendent vers la séparation des deux phases : ce sont des systèmes hors équilibre.

1.1.2 Composition des émulsions cosmétiques solaires

Dans ce travail nous avons étudié des émulsions simples cosmétiques huile-dans-eau (macro-émulsion non concentrée), ayant pour but de protéger la peau des rayonnements ultraviolets du soleil.

La formule de base des émulsions cosmétiques solaires est complexe et constituée de nombreux ingrédients. On distingue les excipients, adjuvants et additifs, et les principes actifs.

- *Les excipients* concernent la phase aqueuse, la phase grasse et les tensioactifs.
    - La phase aqueuse est constituée d'ingrédients hydrophiles comme les épaississants ou gélifiants, les sels ou les actifs hydrosolubles ou encore les conservateurs;
    - La phase grasse contient des ingrédients lipophiles comme les acides gras, la paraffine, les alcools gras, les huiles silicones, les cires ainsi que des composants et actifs liposolubles;
    - Les tensioactifs dans le cas des émulsions huile dans eau sont généralement des dérivés d'acide stéarique (CH_3-$[CH_2]_{16}$-COOH) ou des composés ethoxylés de type R-$[O$-$C_2H_4]_n$-OH.

  Dans le cas d'un produit de soin solaire, l'excipient varie selon la texture désirée. Un produit de texture crème ou lait par exemple sera obtenu à base d'une émulsion huile dans eau.
- *Les adjuvants* regroupent les agents de texture tels que les épaississants, les humectants, les conservateurs, et les antioxydants.
- *Les additifs* comme les parfums et colorants ne sont pas toujours indispensables dans la formulation de produits solaires.
- *Le principe actif* est la substance concentrée qui détermine la nature du produit cosmétique. Dans le cadre des produits solaires, les principaux principes actifs sont les filtres UV qui peuvent être chimiques ou minéraux. Les filtres chimiques sont des composés organiques solubles qui absorbent le rayonnement UV alors que les filtres physiques ou minéraux sont des matériaux opaques inorganiques, insolubles, qui reflètent la lumière comme par exemple le talc, l'oxyde de zinc, le dioxyde de titane, ou encore le kaolin. Il est courant d'utiliser une combinaison de filtres chimiques et/ou minéraux, afin de couvrir une plus large gamme d'absorption des UV et de diminuer également la quantité de chacun des filtres dans la formulation, permettant ainsi de respecter la réglementation (Nearn, Redshaw & Burgess 1996).

Une formulation solaire classique est composée des ingrédients cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 - Composition d'une formulation de produit solaire (http://www.specialchem4cosmetics.com/formulations/guides/recipe.aspx?id=6)

Ingrédients	Pourcentage massique
Eau distillée	Q.S. (50-80%)
Solvants	5-10%
Tensioactifs	3-10%
Filtres UV organiques	1-10%
Filtres UV inorganiques (TiO_2, ZnO)	1-5%
Humectants	1-5 %
Agents de textures	1-3%
Epaississants	0,5-2%
Conservateurs	0,1-1 %
Parfum	0,1-1 %
Principes actifs (hydratation, anti-âge)	0,1-1%
Antioxydants	0,1-0,5%
Agents chélatants	0-0,02 %
Colorants	Q.S.

De nombreuses qualités sont requises pour une crème solaire:

- Garantir une protection efficace contre les effets immédiats à la suite de l'exposition solaire dus aux rayonnements UVB (les coups de soleil), ainsi qu'une protection contre le vieillissement cellulaire relatif aux rayonnements UVA ;
- La crème doit généralement être résistante à l'eau ;
- Elle doit offrir un toucher sensoriel agréable ;
- Elle doit être facile à appliquer ;
- Elle doit être stable ;
- Elle doit être non irritante et non allergisante.

Entre une demande de Facteurs de Protection Solaire (FPS ou SPF) élevés, la nécessaire photostabilité des produits, la recherche de résultats sensoriels agréables et une réglementation exigeante, la formulation de produits de protection solaire s'avère donc très complexe (Caswell 2001). La plupart des formulations commerciales associent les filtres chimiques et les filtres minéraux afin d'obtenir de hauts FPS tout en respectant le ratio UVA/UVB de 1/3 demandé par la réglementation européenne (El-Boury *et al.* 2007; Couteau *et al.* 2008).

Le marché des produits de protection solaire est en croissance constante, cela depuis de nombreuses années. Les fournisseurs d'ingrédients développent de nouveaux filtres pour répondre aux besoins et aux exigences de plus en plus fortes des formulateurs comme de la réglementation en vigueur. De plus, depuis plusieurs années, certaines substances, dont les filtres entrant dans la composition des produits solaires, font l'objet de sévères critiques. Il a

ainsi été montré que les filtres chimiques ont des effets néfastes sur l'environnement : parmi les exemples récents, la présence d'écran solaire dans l'eau menace les récifs coralliens (Danovaro *et al.* 2008). De plus, leur utilisation a causé certains cas de dermatite de contact allergique, notamment pour la benzophenone-4 et l'octocrylène par exemple (Hughes & Stone 2007; Avenel-Audran *et al.* 2010). Leur utilisation est donc de plus en plus limitée lors de la formulation de produits destinés aux enfants et les filtres minéraux sont donc considérés comme des principes actifs inertes, stables et non-irritants (More 2007). Ces types de produits sont le plus souvent destinés à la labellisation biologique.

Cependant, il existe très peu de formulations décrites dans les brevets industriels pour des produits solaires contenant exclusivement des filtres minéraux (Andre & Brotzman; Latva-Nirva *et al.* 2009). Les filtres physiques, en particulier le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc, sont alors incorporés à la formulation sous forme de dispersion aqueuse ou lipophile, ou bien directement sous forme de poudre.

Une bonne compréhension de la microstructure de ces systèmes est donc essentielle afin d'optimiser la formulation et la fabrication de ces types de produits.

1.1.3 Mécanismes intervenant au cours de l'émulsification

a) Aspects énergétiques mis en jeu

Dans une émulsion, la non miscibilité de la phase non polaire grasse et de la phase polaire aqueuse est liée à l'absence d'interactions acide-base à l'interface entre les deux liquides (Van Oss 1993). En effet, la phase aqueuse ne peut pas établir de liaisons hydrogène avec la phase huile, alors que les interactions de Van der Waals sont quasi satisfaites. L'état initial présente une interface plane entre les deux liquides, l'obtention d'une émulsion nécessite un apport extérieur d'énergie afin d'étendre cette interface huile-eau. De plus, pour le liquide dispersé sous forme de gouttelettes, il existe une surpression Δp à l'intérieur des gouttelettes, décrite par la loi de Laplace :

$$\Delta p = \frac{2\gamma}{R}$$

Où

Δp est la surpression de Laplace (Pa)

γ l'énergie interfaciale (mJ/m²)

R le rayon des gouttelettes (m)

Les petites gouttelettes sont moins déformables que les grosses, et donc plus difficiles à fragmenter pour obtenir de plus petites tailles.

b) Effet des tensioactifs

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles, qui présentent deux parties de polarité différente, l'une lipophile qui possède une forte affinité avec les matières grasses, l'autre hydrophile qui possède une forte affinité avec l'eau. En cosmétique, un tensioactif peut avoir plusieurs fonctions :

- *Agent nettoyant* : nécessaire afin d'enlever des impuretés ou salissures
- *Agent moussant* : agissant sur l'interface eau-air, ce type d'agent permet la dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide et donc la formation de mousse
- *Agent mouillant* : il permet un plus grand étalement d'un liquide sur un solide
- *Emulsifiant* : un émulsifiant permet de mélanger deux liquides non miscibles et de former ainsi une émulsion.
- *Agent conditionnant* : permettant de démêler le cheveu et limiter les effets statiques par exemple

Dans le cas d'une émulsion solaire, les tensioactifs utilisés sont des émulsifiants. Ils peuvent être cationiques, anioniques, amphotères ou non ioniques. Les non ioniques sont les mieux tolérés par l'épiderme (Fruijtier-Pölloth 2005).

L'adsorption de tensioactifs aux interfaces

Les tensioactifs modifient considérablement les propriétés de l'interface et ont des conséquences majeures sur la stabilité des films (Al-Bawab & Friberg 2006). Ce sont des composés qui modifient la tension superficielle entre deux surfaces. La tension superficielle est l'énergie de surface qui existe au niveau de toute interface entre deux milieux différents et correspond à la force qu'il faut appliquer à un liquide pour provoquer l'extension de sa surface.

Les tensioactifs efficaces abaissent la tension interfaciale $\gamma_{eau/huile}$ de 30-50 mN/m à quelques mN/m. Cela a pour effet de diminuer l'énergie nécessaire pour accroître l'aire interfaciale et donc faciliter la formation de gouttelettes, et de réduire la pression de Laplace et ainsi de stabiliser les gouttes formées. Lorsque les émulsifiants réduisent la tension interfaciale, cela facilite la réduction de taille des gouttelettes pendant le processus d'émulsification, et le film viscoélastique ainsi formé réduit la tendance des gouttelettes créées à se recombiner.

De plus, du fait de leur structure amphiphile, les tensioactifs ont tendance à s'adsorber aux interfaces eau/huile pour former des monocouches. Par des répulsions électrostatiques ou stériques entre les gouttelettes, les tensioactifs stabilisent les gouttelettes et ralentissent la coalescence. En effet, dans les émulsions aqueuses classiques, l'effet stabilisant de l'émulsifiant mixte est attribué à son aptitude à former un film monomoléculaire complexe à l'interface des gouttelettes d'huile dans l'eau. Lorsque le tensioactif est ionique, le film présente des forces de répulsion électrostatiques pour empêcher le rapprochement des gouttelettes et ainsi être une barrière mécanique à la coalescence. Il est admis que dans des émulsions simples, des multicouches de cristaux liquides se concentrent à l'interface des gouttelettes H/E.

Ces multicouches stabilisent l'émulsion par leur capacité à provoquer une réduction des forces d'attraction, ce qui, combiné avec la forte viscosité des couches de cristaux liquides, retarde considérablement les processus de coalescence (Eccleston 1997).
Les phases cristallines liquides lamellaires gonflées qui se forment à des températures élevées lors de la formulation des crèmes forment des multicouches qui stabilisent davantage les gouttelettes nouvellement formées.

Critères de choix des tensioactifs
Pour stabiliser une émulsion, le tensioactif doit présenter une bonne affinité pour la phase continue. C'est la règle de Bancroft : l'obtention d'une émulsion huile-dans-eau nécessite un tensioactif à caractère hydrophile prépondérant, et inversement une émulsion eau-dans-huile fera appel à un tensioactif à caractère lipophile (Bancroft 1913). On peut également les sélectionner en fonction de leur HLB. Cette notion sera détaillée plus précisément dans la partie Matériels et Méthodes.

Les théories fondées sur des émulsions modèles simples sont irréelles dans le sens que les émulsions cosmétiques contiennent toujours des excès d'émulsifiants comparé à la quantité requise pour former le film interfacial. Le surplus de tensioactifs interagit avec d'autres composants de l'émulsion, aussi bien au niveau des interfaces de gouttelettes que dans l'émulsion, pour donner des formulations polyphasiques complexes. Les mélanges qui sont capables de former des phases lamellaires semblent avoir la capacité de former des films fortement viscoélastiques à l'interface huile-eau. Il a été montré que les systèmes ternaires, formés en mélangeant des tensioactifs et des composés amphiphiles gras ont des structures et des propriétés rhéologiques similaires aux crèmes cosmétiques correspondantes. Ces systèmes ternaires sont couramment étudiés comme modèles structurels pour les phases continues de lotions et crèmes cosmétiques (Eccleston 1990).

1.2 Evolution des émulsions

Au cours du temps, une émulsion, n'est pas à l'équilibre thermodynamique, et évolue inexorablement vers la séparation des phases en présence afin de minimiser leur surface de contact. Les gouttes formées subissent différents processus qui tendent à ramener le système vers son état de plus basse énergie : deux phases séparées, avec une surface de contact minimale entre les deux.

1.2.1 Les forces dans les milieux dispersés

La théorie DLVO a été développée par Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek en 1940 et suggère que la stabilité des particules en suspension dépend d'un potentiel d'interaction total : $V_T = V_A + V_R + V_S$

Où

V_S est l'énergie liée au solvant et est souvent négligeable

V_A la force attractive de Van der Waals

V_R les forces répulsives

Elle permet d'expliquer pour les colloïdes les phénomènes de floculation et de coagulation, et peut être appliquée pour les interactions entre les gouttelettes d'une émulsion. Elle suppose que les gouttelettes dispersées sont soumises à deux types de forces : les forces attractives (négatives) de Van der Waals, et des forces répulsives (positives) de nature électrique. Lorsque deux gouttes chargées se rapprochent en raison du mouvement brownien, un potentiel de répulsion électrique apparaît, dû à l'interpénétration des doubles couches électriques. L'énergie globale d'interaction entre les deux gouttes provient de la somme de l'énergie d'attraction et de l'énergie de répulsion, comme l'indique la Figure 2 (Thomas, Judd & Fawcett 1999).

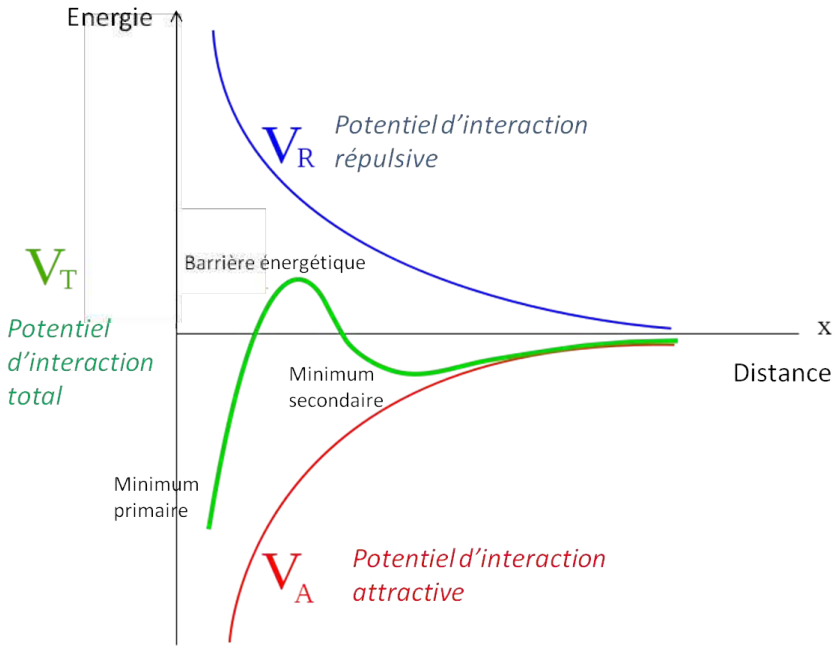


Figure 2 - Variation du potentiel d'interaction total avec la distance entre particules selon la théorie de DLVO.

Cette théorie énonce qu'une barrière énergétique résultant des forces répulsives empêche deux particules de s'approcher l'une de l'autre et d'adhérer l'une à l'autre. Mais si les particules entrent en collision avec une énergie suffisante pour passer la barrière énergétique, la force d'attraction les tirera jusqu'à les mettre en contact et les coller très fortement l'une à l'autre de manière irréversible. Le premier minimum de la courbe, à courte distance, correspond à une très forte agrégation des particules, appelée coagulation et est irréversible. Le deuxième minimum, correspond au processus de floculation, ce minimum étant relativement faible (il est de l'ordre de k_BT), il est possible de séparer les flocs par cisaillement : la floculation est

réversible. Pour une distance intermédiaire, le potentiel positif, est donc une barrière contre la coagulation, s'il est suffisamment élevé (Briant 1989).

1.2.2 Mécanismes et processus d'évolution au cours du temps

Les mécanismes de déstabilisation d'une émulsion peuvent être répartis en deux catégories, et sont schématisés sur la Figure 3:

- La première regroupe les phénomènes de migration de particules et met en jeu des phénomènes potentiellement réversibles
- La seconde concerne la variation de taille des particules, consistant en des processus irréversibles

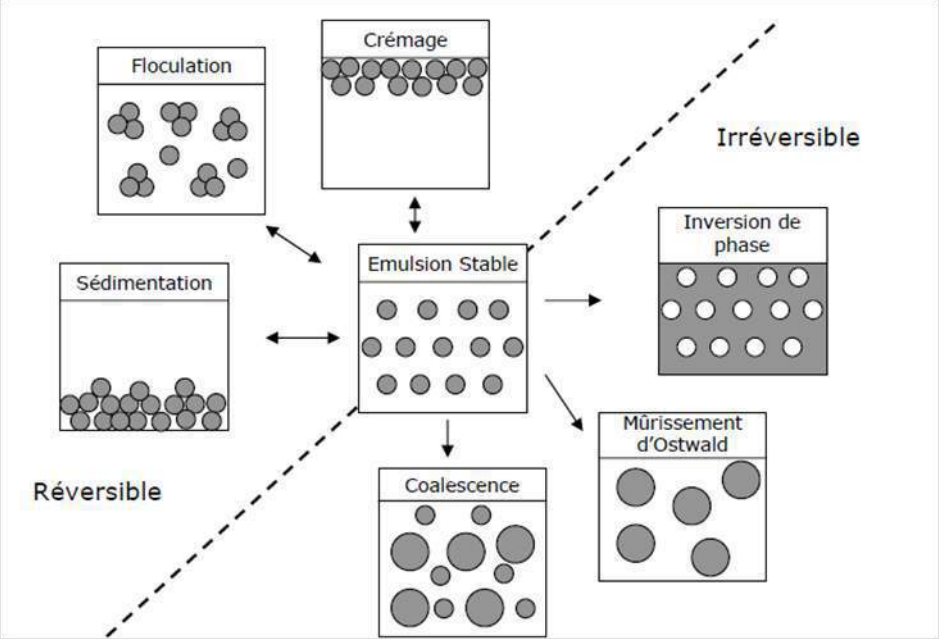


Figure 3 - Phénomènes d'instabilité des émulsions (Rodriguez Rojas 2007)

a) Migration des gouttelettes : floculation, crémage, sédimentation

Les gouttelettes d'une émulsion sont animées d'un mouvement brownien, qui induit des chocs entre gouttelettes. Si l'interaction attractive de Van der Waals entre les gouttes mises en contact est suffisante alors elles restent associées: c'est le mécanisme de floculation. Comme les forces de Van der Waals sont inversement proportionnelles à la distance de séparation entre gouttelettes, une façon de contrer la floculation consiste à utiliser des agents tensioactifs ioniques, ce qui conduit à la formation de couches diélectriques autour des gouttelettes et, ainsi, introduit une énergie répulsive qui surmonte l'énergie attractive. Une deuxième méthode efficace pour limiter la floculation est la stabilisation stérique qui nécessite d'apporter des tensioactifs non ioniques ou des polymères autour des gouttelettes.

Selon les masses volumiques relatives des phases, la déstabilisation des émulsions peut conduire à un crémage (ascension de la phase dispersée) ou à une sédimentation (chute de la

phase dispersée). La vitesse de migration des gouttelettes est régie par la loi de Stokes pour les dispersions diluées (Tadros 2004):

$$V = \frac{2}{9}\frac{\Delta\rho g r^2}{\eta_c}$$

Avec

V : vitesse de migration de la goutte ($m \cdot s^{-1}$),

g : accélération due à la pesanteur ($m \cdot s^{-2}$),

$\Delta\rho$: différence entre les masses volumiques des phases ($kg \cdot m^{-3}$),

r : rayon de la goutte (m),

η_c viscosité dynamique de la phase continue ($Pa \cdot s$).

Pour une fraction volumique donnée, les techniques de prévention de la migration des particules qui peuvent être envisagées sont :

- le rapprochement des masses volumiques des deux phases : $\Delta\rho \approx 0$
- l'augmentation de la viscosité de la phase continue par l'ajout d'épaississants (η_c croît, donc V décroît)

On peut aussi jouer sur le diamètre des gouttes sachant que les petites migrent moins vite que les grosses (Canselier & Poux 2004).

Tous ces phénomènes (floculation, sédimentation, crémage) sont des phénomènes le plus souvent réversibles.

b) Variation de taille des gouttelettes

Mûrissement d'Ostwald

Dans chaque classe de taille des gouttelettes existe la surpression de Laplace qui est plus grande pour les faibles tailles (cf 1.1.3a) p.30). L'existence de cette surpression implique que le potentiel chimique dans les petites gouttes est plus élevé que dans les grosses gouttes. Cette différence de pression de Laplace qui existe entre des gouttelettes de diamètres différents va provoquer une migration des molécules constituant la goutte de plus petite taille, à travers la phase continue et jusqu'à la goutte de plus grande taille. Ce phénomène entraîne une augmentation de la taille moyenne des gouttelettes de phase dispersée, et un resserrement de la répartition granulométrique de l'émulsion (Kabalnov & Shchukin 1992). Ce phénomène peut être limité : il est alors nécessaire de minimiser la solubilité dans la phase continue des molécules qui constituent la phase dispersée (inhibition du transport de matière) ou de diminuer l'énergie interfaciale (diminution de la surpression de Laplace) (Taylor 1998).

Coalescence

Que les gouttelettes se soient rapprochées jusqu'à être en contact par crémage ou par floculation, une étape reste encore à franchir avant la démixtion de l'émulsion : la coalescence. C'est le phénomène de dégradation ultime des émulsions. Elle consiste en la formation de

grosses gouttes par rapprochement et fusion de gouttelettes, due à l'instabilité de l'interface. Le mécanisme du phénomène de coalescence au sein d'une émulsion est l'amincissement et la rupture du film liquide entre les gouttelettes (Tadros 1994). La probabilité de rupture augmente avec le diamètre du film et diminue avec la tension interfaciale et la force de répulsion inter gouttelettes (Dickinson 1992).

La notion de pression de disjonction a été introduite pour mieux comprendre ce phénomène. C'est la force par unité de surface agissant perpendiculairement aux deux films interfaciaux qui dépend des forces d'interaction entre gouttelettes (Briant 1989). Quand les gouttelettes se trouvent dans le minimum principal ou secondaire (Figure 2 p.33), la pression de disjonction est nulle, les gouttelettes sont en équilibre mécanique, mais pas thermodynamique. Pour qu'il y ait rupture du film liquide et fusion des gouttelettes, il faut que des fluctuations mécaniques et thermiques entraînent une diminution locale de la distance entre les gouttelettes jusqu'à leur contact. La coalescence est donc un processus hors équilibre. Pour un film interfacial occupé par des molécules de tensioactifs, au cours de fluctuations d'origine thermique, la surface augmente localement, et donc la concentration des tensioactifs diminue. On observe donc une augmentation de la tension interfaciale, qui conduit à une élévation de l'énergie de surface, déstabilisant ainsi le film interfacial : c'est l'effet Marangoni.

La coalescence des émulsions est caractérisée par une croissance temporelle divergente du diamètre moyen et par des distributions de tailles s'élargissant, comme l'illustre la Figure 4 par exemple pour une dispersion de gouttelettes de toluène en présence de polyvinyl alcohol (PVA).

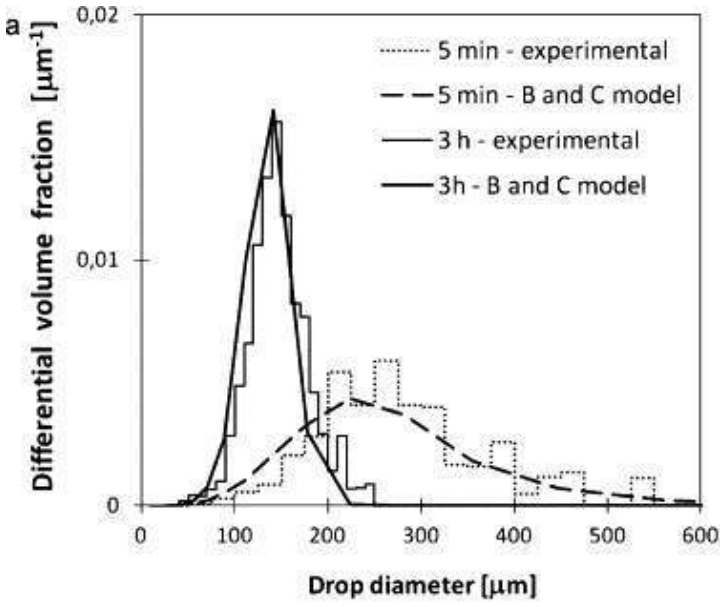


Figure 4 - Distributions de taille des gouttelettes pour des dispersions de toluène en présence de PVA, avec une comparaison entre valeurs expérimentales et prédites (Bąk & Podgórska 2013)

c) Inversion de phase

L'inversion de phase est un phénomène de déstabilisation où la phase dispersante devient la phase dispersée, et inversement. Dans le cas des émulsions concentrées, une forte agitation ou homogénéisation peut créer une rupture d'émulsion et aboutir à une inversion de phase.
De plus, les tensioactifs non ioniques polyethoxylés sont sensibles à la température et les groupements d'oxyde d'éthylène ont tendance à se desolvater au cours du chauffage. A partir d'une certaine température, le tensioactif n'est plus soluble dans l'eau et migre dans la phase grasse. Cette température est appelée température d'inversion de phase (PIT). Cette température est fonction de la longueur de la chaine carbonée de l'huile utilisée et de celle du tensioactif (Shinoda & Arai 1964). L'émulsion doit généralement être réalisée quelques degrés en dessous de cette température critique (Rieger & Rhein 1997).

1.2.3 Stabilité des émulsions

L'objectif principal dans l'étude de la stabilité des macro-émulsions est de prédire leur durée de vie dans des conditions normales de stockage. Il est donc important pour le formulateur de faire une estimation de la durée de vie requise du produit. Ce temps comprend le stockage par le fabricant après la production, le temps d'expédition, le stockage par le vendeur, et le temps nécessaire jusqu'à ce que les produits soient utilisés par le consommateur. Une durée de vie entre deux et cinq ans est généralement acceptée pour la plupart des produits de consommation. Etudier la stabilité des produits est également un moyen de comprendre les mécanismes mis en cause au cours de la déstabilisation des formulations.

a) Définitions

Stabilité physique

L'émulsion ne doit pas montrer de démixtion, qui peut être provoquée par de la coalescence ou par les phénomènes de crémage et sédimentation. Le comportement rhéologique et la granulométrie ne doivent pas varier au cours du temps.

Stabilité chimique

Les composants de l'émulsion ne doivent pas réagir chimiquement entre eux et modifier la stabilité physique ou les propriétés de l'émulsion.

Stabilité microbiologique

Pour éviter toute formation de levures, moisissures ou germes bactériens, il est nécessaire d'incorporer une sélection de conservateurs au sein de la formulation.

b) Vieillissement accéléré

Les formulateurs tentent de prédire la durée de vie sur la base de techniques d'essais accélérés. Les processus de déstabilisation peuvent être parfois très longs à repérer, et il est ainsi courant d'avoir recours à des méthodes d'accélération pour réduire les durées de

développement des formulations. Le plus souvent, les méthodes thermiques sont employées et consistent à augmenter la température afin d'accélérer les mécanismes de déstabilisation (Masmoudi *et al.* 2005). Les conditions de stress thermiques ne provoquent pas de modification chimique des composés de l'émulsion, mais impliquent des phénomènes de déstabilisation physique (Rieger 1991). Il faut cependant veiller à travailler à une température inférieure aux températures critiques d'inversion de phase et de dégradations chimiques. Travailler à des températures trop élevées peut en effet détruire l'émulsion. Cette hausse de température affecte la viscosité et également la tension interfaciale dans le cas des tensioactifs non ioniques, et plus généralement les forces d'interaction du système (Langenfeld, Schmitt & Stébé 1999). La viscosité en règle générale est réduite par chauffage. Ainsi, la probabilité de gouttelettes se rencontrant sous l'influence du mouvement brownien est plus grande. L'abaissement de la viscosité de la phase continue ou dispersée augmente la probabilité de coalescence lors de l'impact. Dans des conditions stationnaires, l'abaissement de la viscosité peut conduire à plus de sédimentation ou de crémage, conformément à la loi de Stokes (cf 1.2.2a) p.34) (Rieger 1991). L'étude de l'effet du vieillissement sur le comportement rhéologique montre que les émulsions eau dans huile vieillissent beaucoup plus rapidement que les émulsions huile-dans-eau (Pal 2004).

D'autres méthodes permettent un vieillissement accéléré : c'est le cas de l'accélération mécanique incluant la vibration, la centrifugation et l'agitation par exemple. Le produit est soumis à des phénomènes accentuant la coalescence (Salager 2000) La centrifugation à des forces d'accélération modérées est une méthode avérée pour repérer les processus de crémage et de sédimentation de l'émulsion. Ces techniques permettent également de simuler les conditions réelles du produit au cours de son utilisation.

c) Méthodes de stabilisation des émulsions

Pour fabriquer une émulsion cosmétique compatible avec une durée de vie réaliste, le formulateur doit essayer de retarder le processus de séparation de phase. Ceci peut être obtenu par l'addition d' émulsifiants spécifiques mixtes composés de tensioactifs ioniques ou non ioniques combinés avec des agents amphiphiles gras tels que des alcools gras (Eccleston 1997). Ils stabilisent les gouttelettes d'huile au moment de la fabrication par la formation d'un film interfacial, ce qui apporte une stabilité à long terme du produit en empêchant le rapprochement étroit des gouttelettes d'huile.

Sanchez *et al.* 1998 ont étudié l'évolution de la microstructure et de la rhéologie des émulsions huile-dans-eau, stabilisées par des émulsifiants hydrophiles à très bas poids moléculaire, au cours du processus d'émulsification. Ils remarquent l'influence décisive de la température de l'émulsion, qui favorise à la fois la dégradation et la coalescence des gouttelettes d'huile. Une augmentation de l'apport d'énergie produit toujours une stabilité accrue de l'émulsion.

Toutefois, si la température d'émulsification est élevée, la stabilité de l'émulsion finale est diminuée.

1.3 Principe et notions fondamentales de la caractérisation des émulsions

La caractérisation d'émulsion est utile dans la phase de développement d'une nouvelle formulation, mais aussi, pour l'étape de contrôle post fabrication, ainsi que l'assurance qualité.

1.3.1 Distribution de taille des gouttelettes d'une émulsion

Un des premiers critères de caractérisation de l'émulsion est la distribution de taille des gouttelettes. Généralement, dans une émulsion, les gouttelettes de phase dispersée sont de différentes tailles. Une population de gouttelettes est représentée par une distribution de taille. Le diamètre moyen des gouttes dans une dispersion est souvent donné par le diamètre moyen de Sauter D[3,2] défini par

$$d_{32} = \frac{\sum n_i {d_i}^3}{\sum n_i {d_i}^2}$$

Avec

n_i le nombre de gouttes de diamètre d_i

Il correspond au diamètre d'une gouttelette dont le rapport volume/surface est égal au volume total de toutes les gouttes par rapport à la surface totale couverte.
D'autres diamètres moyens sont également couramment utilisés (Merkus 2009) comme :

- *Le diamètre moyen en volume*, qui permet d'exprimer la taille des gouttes en fonction du volume de liquide dispersé.
- *Le diamètre médian en nombre* qui permet d'exprimer la grosseur des gouttes d'après le nombre de gouttes contenues dans le liquide. Ceci signifie que 50 % des gouttes ont un diamètre inférieur à ce diamètre moyen et 50 % un diamètre supérieur.

Il existe de nombreuses techniques de caractérisation de taille, en fonction des systèmes à étudier. Chaque technique de caractérisation mesure des propriétés différentes de la particule. Il faut également prendre en compte le paramètre de la gamme d'analyse en termes de taille de particules et de concentration en particules. La Figure 5 résume les différentes techniques qui peuvent être utilisées (Zeyons 2008).

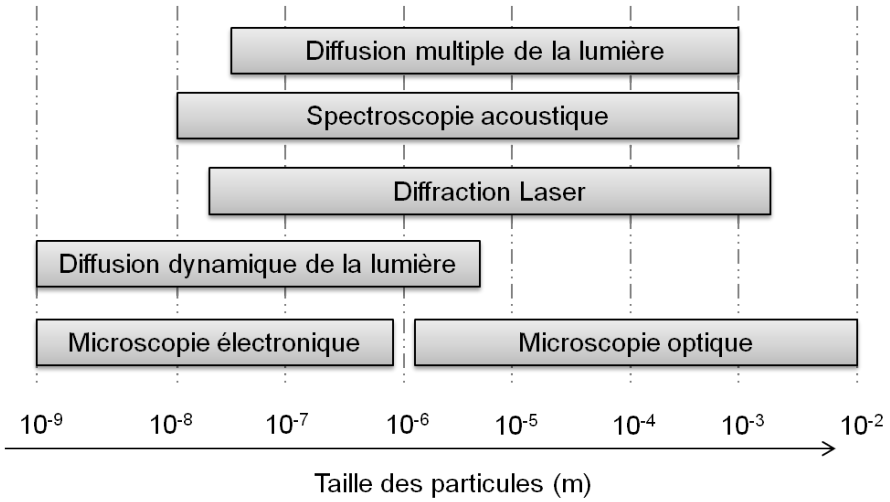


Figure 5 - Classement des techniques de granulométrie en fonction de la taille des particules

a) La diffraction laser

La technique de diffraction laser (ou diffusion statique de la lumière), s'appuie sur la théorie de Mie. Elle s'applique lorsque la dimension de la particule avoisine la longueur d'onde incidente : les phénomènes de réflexion et de réfraction interviennent pour une part non négligeable dans l'intensité diffusée. On suppose que le faisceau laser est non seulement diffracté par les particules, mais qu'il est également réfléchi et diffusé. La lumière va se propager jusqu'à ce qu'il y ait une variation dans l'indice de réfraction du milieu de propagation (Keck & Müller 2008). L'étude de la variation d'intensité diffusée par une particule sphérique dans l'espace renseigne sur sa taille et s'applique ainsi au cas des gouttelettes. L'émulsion, préalablement diluée, est éclairée par un faisceau laser et des détecteurs enregistrent la figure de diffraction résultante. Le résultat est représenté sous forme de courbe de distribution de taille des gouttelettes.

Dans la pratique, la coalescence des émulsions est précédée de la floculation des gouttelettes. La technique de granulométrie laser ne permet pas toujours de différencier les gouttelettes floculées des gouttelettes coalescées. La taille des gouttelettes des émulsions cosmétiques est généralement centrée autour du micromètre. Lors de l'utilisation de tensioactifs non-ioniques, la taille peut être plus grande du fait que la coalescence des gouttelettes se produit alors que la structure du système se consolide (Eccleston 1997). Les informations nécessaires à l'évaluation de la stabilité des émulsions sont la mesure de la taille des gouttelettes et leur déplacement vers des diamètres plus grands. La présence ou la formation de grosses gouttes de la phase interne dans une émulsion est un signe clair de son instabilité.

b) Microscopie optique

La microscopie optique est une technique très courante pour la caractérisation des émulsions cosmétiques. Elle permet d'obtenir des informations qualitatives essentielles à la compréhension générale de ces systèmes. C'est un outil idéal pour l'observation de la

répartition des gouttelettes et la détermination d'éventuels premiers signes d'instabilité (André *et al.* 2003). Elle permet d'évaluer la taille des gouttes, d'observer leur forme, d'estimer les dispersions de tailles, de déterminer l'état d'agrégation, et d'identifier certaines instabilités comme la coalescence.

1.3.2 Propriétés rhéologiques

a) Définitions de paramètres importants liés à la rhéologie

Nous rappellerons ici les grandeurs fondamentales de la rhéologie, ce qui nous permettra d'introduire les notations utilisées dans la suite du document. On s'appuiera sur la Figure 6 ci-dessous.

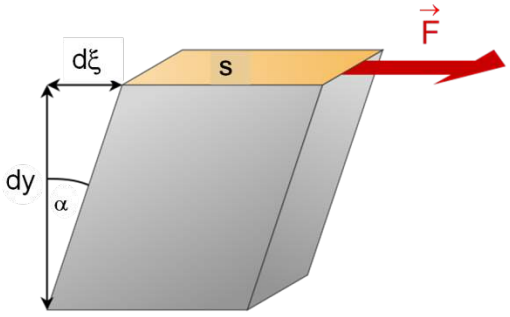


Figure 6 – Principe du cisaillement d'un fluide entre deux surfaces planes

Principe de cisaillement

Afin de caractériser l'écoulement d'un fluide, on étudie son comportement sous l'effet d'un mouvement de cisaillement. Dans la théorie des écoulements laminaires, un fluide est un empilement de plusieurs couches liquides. Le mouvement de cisaillement est le mouvement d'un échantillon entre deux surfaces planes, l'une immobile, l'autre animée d'un déplacement parallèle à la première. Les deux plans parallèles sont séparés d'une distance dy, et les deux couches de surface S se déplacent l'une par rapport à l'autre d'un déplacement dξ comme indiqué sur la Figure 6. Les forces de cisaillement $\vec{F}$ sont les forces de frottement qui apparaissent à la surface de ces deux couches, et s'exercent tangentiellement à leur surface (Coussot & Grossiord 2002).

Contrainte de cisaillement σ

La contrainte de cisaillement σ est définie comme la force de cisaillement rapportée à l'unité de surface ; elle est définie par l'équation $\sigma = \frac{dF}{dS}$ et s'exprime en N.m^{-2} ou Pa.

Déformation γ

Sous l'action de cette contrainte, le matériau va se déformer. On appelle déformation γ, la variation du déplacement ξ lorsqu'on passe d'une couche à une couche infiniment voisine

$$\gamma = \frac{d\xi}{dy} = tan\alpha$$

Taux de cisaillement $\dot{\gamma}$

La vitesse de déformation $\dot{\gamma}$ est définie comme la variation temporelle de la déformation γ, soit encore dans le cas de l'écoulement de cisaillement pur défini précédemment :

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{d}{dt}\frac{d\xi}{dy} = \frac{d}{dy}\frac{d\xi}{dt}$$

Or la vitesse de déplacement v de la couche mobile est la variation temporelle du déplacement

$$v = \frac{d\xi}{dt}$$

Donc

$$\dot{\gamma} = \frac{d}{dy}\frac{d\xi}{dt} = \frac{dv}{dy}$$

La vitesse de déformation $\dot{\gamma}$ est donc égale au gradient de vitesse $\frac{dv}{dy}$, également appelé taux de cisaillement (Schramm 1998).

b) Modes de mesures

L'étude rhéologique d'un produit cosmétique est une tâche difficile et complexe tant la variété des comportements et des modèles rhéologiques proposés est grande. Deux modes de mesure peuvent être mis en œuvre : les mesures en cisaillement simple (régime permanent), et les mesures en mode dynamique. Les deux approches fournissent des renseignements totalement différents mais complémentaires quant à la caractérisation des émulsions et suspensions. Ainsi, les mesures en cisaillement simple apportent des informations essentiellement sur le comportement en écoulement de l'émulsion, alors que les mesures en mode dynamique permettent de caractériser précisément son caractère viscoélastique. Nous détaillerons ici les mesures en mode dynamique qui nous permettront de caractériser le comportement réel des émulsions étudiées : selon la contrainte ou la déformation, ils peuvent présenter un comportement fluide, solide ou intermédiaire.

Analyse en mode dynamique

Les propriétés viscoélastiques ne sont pas faciles à déterminer par des mesures de cisaillement simple, et leur caractérisation ne fournit pas dans ce mode de mesure des paramètres clés identifiables. C'est pourquoi, la détermination des propriétés viscoélastiques des suspensions est réalisée en mode dynamique, en soumettant les fluides à des sollicitations de type sinusoïdal en fonction du temps. L'échantillon est soumis à une déformation oscillatoire à une fréquence donnée ω (rad.s^{-1}) ($\omega = 2\,\nu\,\pi$, où ν est la fréquence en Hz). La déformation imposée se situe dans le domaine de comportement viscoélastique linéaire de l'échantillon. L'angle de phase est donné par $\delta = \omega\,\Delta t$.

Si la déformation imposée est sinusoïdale et de faible amplitude,

$$\gamma = \gamma_0 e^{i\omega t}$$

La réponse en contrainte est également sinusoïdale avec un déphasage δ par rapport à la déformation

$$\sigma = \sigma_0 e^{i\omega t+\delta}$$

L'élasticité rend compte des propriétés mécaniques des solides élastiques qui obéissent à la loi de Hooke, où la contrainte est proportionnelle à la déformation, définie par l'équation

$$\sigma(t) = G^*(\omega).\gamma(t)$$

Dans ce cas, G* possède deux composantes : le module de conservation (élastique) G', partie réelle de G*, et le module de perte (visqueux), G'', partie imaginaire de G*.

$$G^* = G' + iG''$$

Le rapport de la contrainte maximum σ_0 et de la déformation maximum γ_0 donne le module complexe. $G^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0}$.

Les grandeurs rhéologiques caractéristiques de l'échantillon, sont donc (Ibanescu *et al.* 2010):

$G^* = \frac{\sigma_0}{\gamma_0}$	Le module de cisaillement
$G' = G^* cos\,\delta$	Le module élastique ou de conservation (correspond à l'énergie élastique emmagasinée)
$G'' = G^* sin\,\delta$	Le module visqueux ou de perte (caractérise l'énergie dissipée sous forme de frottements visqueux)
δ	Le déphasage entre contrainte et déformation, avec $tan\delta = \frac{G''}{G'}$

Par conséquent, la mesure de l'angle de déphasage donne une information sur le comportement de la suspension, ainsi :

- si $\delta < 45°$ alors $tan\delta < 1$ et donc $G' > G''$: le fluide présente un comportement à dominante élastique (un gel par exemple)
- si $\delta > 45°$, $tan\delta > 1$, $G' < G''$: le fluide présente un comportement majoritairement visqueux (un liquide par exemple) (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas 2005).

Parmi les différentes mesures d'oscillation sur des matériaux viscoélastiques, on distingue en particulier le balayage en déformation. Dans ce cas, la fréquence ω est maintenue constante et G*, G', et G'' sont mesurés en fonction de l'amplitude de déformation. G*, G' et G'' restent constants jusqu'à une certaine valeur critique γ_c, c'est la région de comportement visco-élastique linéaire dans laquelle les modules sont indépendants de la déformation appliquée. On obtient le type de courbe représenté sur la Figure 7.

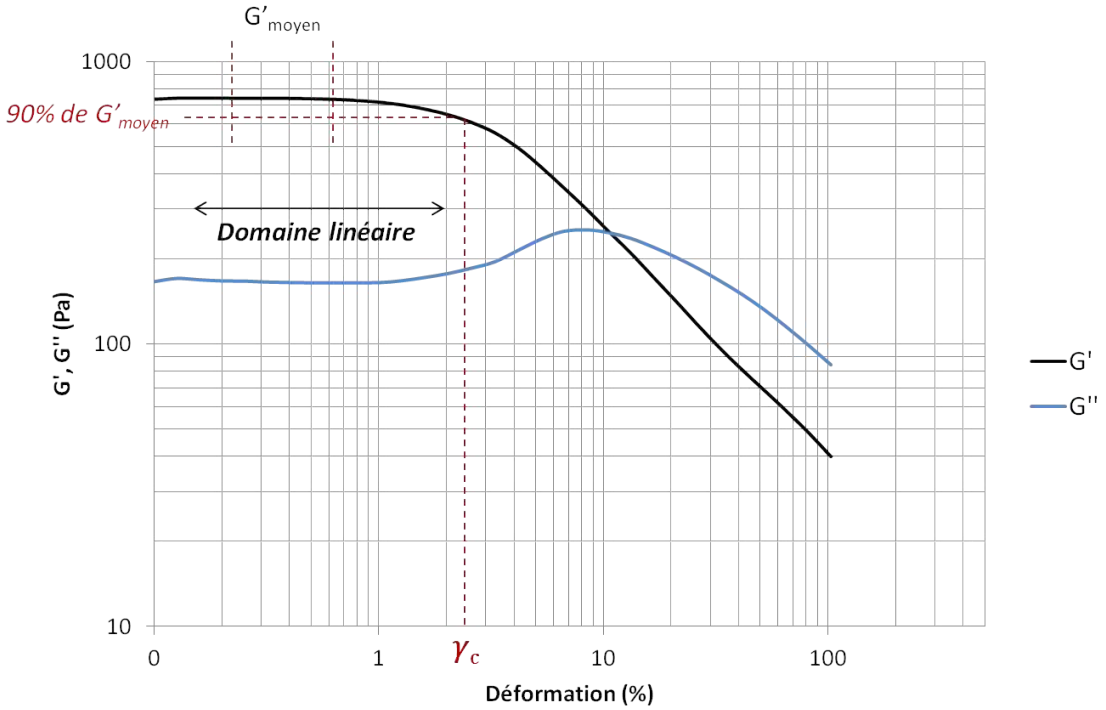


Figure 7 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de G' et G'' en fonction de la déformation

Au-delà de cette valeur $\gamma_{c,}$ G* et G' en général chutent avec la déformation. Il est également courant de relever une autre déformation critique, pour laquelle on observe l'inversion du comportement viscoélastique (G'' devient supérieur à G') ; on l'appelle « melting strain », correspondant à la déformation au-delà de laquelle le système devient plus visqueux qu'élastique. Sur la Figure 7 elle est égale à 10%.

L'étendue de la région de comportement viscoélastique linéaire dépend de la capacité des structures à résister aux contraintes et déformations extérieures. En outre, la valeur du paramètre tanδ dans la région viscoélastique linéaire caractérise les propriétés viscoélastiques du système non perturbé.

Un autre paramètre utile est la densité d'énergie cohésive E_c. C'est un paramètre important pour évaluer la force de la structure d'une dispersion. Il est obtenu par

$$E_c = \int_0^{\gamma c} \sigma \delta \gamma$$

Où $\sigma = G'$ et G' est la moyenne mesurée dans la région linéaire, comme indiqué sur la Figure 7.

$$E_c = \int_0^{\gamma c} G' \gamma_c \delta \gamma = \frac{1}{2} \gamma_c^2 G'$$

E_c peut être utilisée de manière quantitative comme mesure de l'ampleur et de la force de la structure floculée. En effet, plus la valeur de E_c est importante, plus la structure sera floculée. E_c dépend de la fraction volumique de la dispersion mais aussi de la distribution de taille des

particules. Ainsi, afin de comparer deux systèmes, il est nécessaire de s'assurer que la fraction volumique des particules dispersées est la même, et que les dispersions ont des distributions de taille similaires (Tadros 2004).

c) Profil rhéologique des crèmes cosmétiques

Influence des tensioactifs utilisés

Comme précisé plus haut, les crèmes cosmétiques contiennent une quantité de tensioactifs supérieure à la quantité nécessaire pour former des films interfaciaux monomoléculaires. Cette quantité de tensioactifs en excès interagit avec d'autres composants, au niveau des interfaces des gouttelettes ou dans la phase continue pour produire des formulations polyphasiques complexes. Les concentrations en tensioactifs sont des facteurs importants qui influent sur la structure et les propriétés rhéologiques des crèmes (Korhonen *et al.* 2000).

La plupart des émulsions cosmétiques sont floculées et ont des structures de gel. La floculation est responsable des propriétés rhéologiques de l'émulsion donnant une viscosité apparente plus élevée que dans le cas d'un fluide contenant des particules bien séparées. L'influence de la concentration en agent tensio-actif sur les propriétés rhéologiques des crèmes a été montrée (Korhonen *et al.* 2002). Une augmentation de plus de 50% de la quantité de tensioactif engendre une formulation nettement plus élastique. De plus, une longueur importante de la chaîne hydrocarbonée du tensioactif rend la structure de la crème plus cohérente. Des propriétés viscoélastiques, rhéofluidifiantes et l'existence d'une contrainte seuil, sont des propriétés optimales pour les crèmes (Forster & Herrington 1997) ; dans ce cas, les crèmes possèdent généralement une texture satisfaisante, restent stables pendant le stockage et sont faciles à appliquer.

Les propriétés rhéologiques sont également affectées par la rhéologie du film à l'interface, la viscosité et la composition chimique du milieu, de même que la distribution de la taille des gouttelettes (Tadros, 1993).

Influence de la granulométrie

La taille des gouttelettes est connue pour être une variable très importante dans la rhéologie de l'émulsion (Barnes 1994). Il y a une corrélation claire entre la distribution de la taille des gouttelettes et les propriétés viscoélastiques. Les crèmes avec les plus petites gouttelettes ont un comportement plus élastique, avec des valeurs de tan(δ) dans la région viscoélastique linéaire très inférieures à 1. Les paramètres qui déterminent la rhéologie de base d'une crème sont la rhéologie de la phase continue et la nature des gouttelettes (distribution de taille, déformabilité, viscosité interne, concentration et nature de l'interaction particule-particule) (Barnes, 1994). La rhéologie et la vitesse de crémage d'émulsions huile-dans-eau monodisperses sont fortement influencées par la taille des gouttelettes et leur concentration

ainsi que par les répulsions électrostatiques entre les gouttelettes chargées (Chanamai & McClements 2000). En effet la vitesse de crémage des émulsions diminue avec l'augmentation de la concentration de gouttelettes. La viscosité apparente de l'émulsion augmente avec l'augmentation de la concentration des gouttelettes, ce qui diminue la taille des gouttelettes et la contrainte de cisaillement.

Dans l'étude de Pal 2004, l'effet de la taille des gouttelettes sur le comportement rhéologique des émulsions eau dans huile et huile-dans-eau a été étudié et les résultats indiquent que la taille des gouttelettes a une influence considérable sur la rhéologie de l'émulsion. Les émulsions fines (eau-dans-huile ou huile-dans-eau) ont des viscosités et des modules élastiques beaucoup plus élevés que les émulsions grossières correspondantes.

Caractérisation de l'évolution d'une émulsion

Le rapport entre la rhéologie et la stabilité du produit dans le cas des émulsions, a été identifié comme un paramètre-clé dans la formulation de produit (Tamburic & Slobodanka 2009). Les changements dans les propriétés rhéologiques des crèmes annoncent une déstabilisation potentielle du produit (Rieger 1991). En effet, les variations des différents paramètres rhéologiques avec l'âge des émulsions, traduisent à l'échelle macroscopique des variations dans la structure des émulsions. Ces variations sont dues aux phénomènes de déstabilisation comme la coalescence, la floculation, la sédimentation ou le crémage. Il est donc essentiel de réaliser des mesures rhéologiques en fonction du temps afin d'obtenir des informations sur la stabilité du produit (Tadros 2004), l'objectif étant de pouvoir prédire la stabilité d'une émulsion à long terme à l'aide de mesures réalisées à court terme (Aubry, Sebag & Deroo 2006). On pourra ainsi interpréter lors d'un balayage en déformation, des évolutions de certains paramètres et les attribuer à des mécanismes particuliers, comme l'indique le tableau ci-dessous.

Tableau 2 –Signification de l'évolution au cours du temps des paramètres rhéologiques lors d'un balayage en déformation

Evolution au cours du temps	**G'**	**Tan(δ)**	**γ_c**
Accroissement de la valeur des paramètres	Augmentation de la résistance de l'émulsion à la déformation appliquée	Le comportement de l'émulsion devient plus visqueux	L'émulsion devient plus floculée
Diminution de la valeur des paramètres	- Augmentation de la taille des gouttelettes de l'émulsion - Modification des interactions entre les particules colloïdales	Le comportement de l'émulsion devient plus élastique	L'émulsion devient moins déformable, et le réseau des gouttelettes devient plus fragile

1.3.3 Caractérisation électrostatique

Le potentiel zêta caractérise la charge de surface des colloïdes en solution. Il représente la charge que la particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent lorsqu'elle est en solution. La couche de liquide qui entoure la particule est constituée de deux parties : une couche interne où les contre-ions sont fortement liés, appelée la couche de Stern, et une couche extérieure diffuse dite de Gouy, où les ions sont plus libres, comme cela est représenté sur la Figure 8. Il existe une limite dans cette couche diffuse, appelée plan de cisaillement, où les contre-ions et les particules forment une entité stable. Lorsque les particules sont mises en mouvement, par mouvement brownien ou induit, la couche de Stern et la partie jusqu'au plan de cisaillement restent liées à la particule, alors que le reste de la couche diffuse reste immobile ou bouge avec du retard par rapport à la particule. Le potentiel mesuré à ce plan de cisaillement est appelé le potentiel zêta.

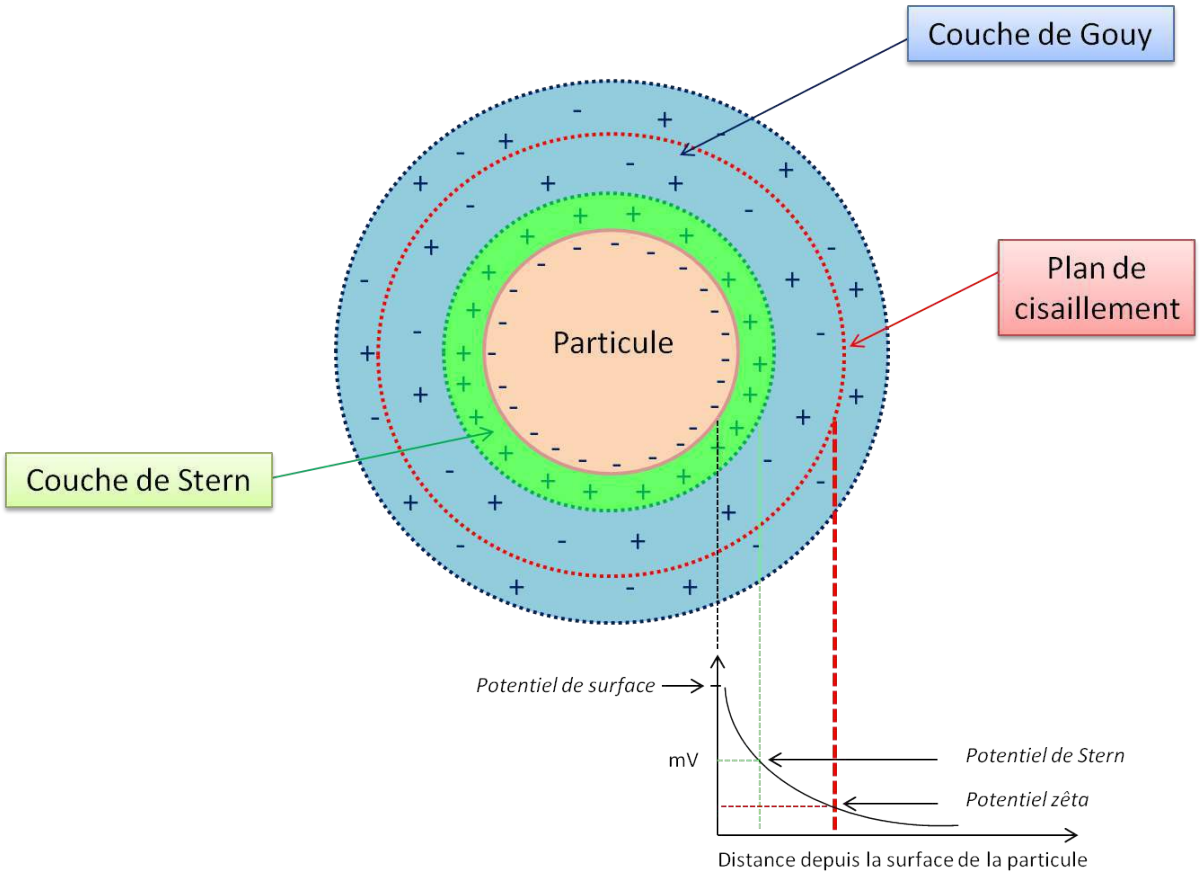


Figure 8 - Charges de surface d'une particule

Il est courant d'identifier le potentiel théorique de Stern par le potentiel zêta déterminé expérimentalement. Cette hypothèse est surtout valable aux faibles forces ioniques et pour des potentiels de surface faibles. L'adsorption de tensioactifs ou polymères peut décaler le plan de cisaillement quasiment jusqu'à la couche diffuse, si bien que la valeur mesurée zêta est bien inférieure au potentiel de Stern (Jacobasch, Simon & Weidenhammer 1998).

Il existe plusieurs techniques pour mesurer ce potentiel zêta, fondées sur les effets électrocinétiques: l'électrophorèse, l'électro-osmose, ou le potentiel d'écoulement (Sze *et al.* 2003). On appelle électrophorèse le mouvement d'une particule chargée par rapport au liquide dans lequel elle est en suspension sous l'influence d'un champ électrique appliqué. Le phénomène d'électro-osmose est le déplacement d'un liquide par rapport à une surface stationnaire chargée sous l'influence d'un champ électrique et le potentiel d'écoulement est le champ électrique généré lorsqu'un liquide est contraint de s'écouler au-delà d'une surface stationnaire chargée.

Nous détaillerons ici la mesure du potentiel zêta à partir de l'électrophorèse, selon le modèle de Smoluchowski. C'est en effet la méthode la plus courante de mesure du potentiel zêta. Lorsqu'un champ électrique est appliqué à travers un électrolyte, les particules chargées en suspension dans l'électrolyte sont attirées vers l'électrode de charge opposée. Les forces

visqueuses qui agissent sur les particules ont tendance à s'opposer à ce mouvement. Lorsque l'équilibre est atteint entre ces deux forces opposées, les particules se déplacent à une vitesse constante. La vitesse est fonction de la force de champ électrique, de la constante diélectrique du milieu, de la viscosité du milieu et du potentiel zêta. La vitesse d'une particule dans un champ électrique unité est appelée mobilité électrophorétique. Le potentiel zêta est lié à la mobilité électrophorétique par l'équation de Henry :

$$U = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta}$$

avec,

U = mobilité électrophorétique des particules

ζ = le potentiel zêta

η = viscosité de la phase continue

ε = constante diélectrique du liquide

$f(\kappa a)$ la fonction de Henry

κ = longueur de Debye

a = rayon de la particule

κ^{-1} est souvent considérée comme une mesure de l'épaisseur de la couche diélectrique. Le produit κa mesure le rapport entre le rayon de particule et l'épaisseur de la couche diélectrique. Les mesures de potentiel zêta sont le plus souvent réalisées dans des milieux aqueux avec une concentration d'électrolyte modérée : la valeur de $f(\kappa a)$ dans ce cas est de 1,5. Cette situation est connue comme l'approximation de Smoluchowski. Par conséquent le calcul du potentiel zêta à partir de la mobilité est simple pour les systèmes qui correspondent au modèle de Smoluchowski, et n'est valable que pour des particules dont le diamètre est supérieure à 0,2 µm dispersées dans des électrolytes à une concentration molaire en sels supérieure à 10^{-3} M. Pour les petites particules dans les milieux à faible constante diélectrique (par exemple des milieux non aqueux), $f(\kappa a)$ prend la valeur 1,0 et est connu comme l'approximation de Huckel (Ohshima 2012).

Le potentiel zêta permet ainsi de rendre compte des interactions entre les particules et avec les espèces chargées présentes en solution. Il est ainsi possible de caractériser le comportement de certains ions en contact avec une surface chargée (adsorption spécifique ou interaction purement électrostatique).

La zêtamétrie permet également de caractériser la stabilité des émulsions et suspensions colloïdales en fonction de différents paramètres : pH, concentration en ions ou en tensioactifs. On considère habituellement qu'une émulsion est stable lorsque son potentiel zêta est

supérieur ou égal à 25-30 mV en valeur absolue (Roland 2003). Cependant, Bhatt *et al.* 2010 précisent qu'une valeur de potentiel zêta élevée ne conduit pas nécessairement à la stabilité de l'émulsion. En revanche, la vitesse de diminution du potentiel zêta contrôle la stabilité de l'émulsion. La stabilité de l'émulsion est alors régie par la vitesse avec laquelle la désorption de l'émulsifiant du film interfacial a lieu au cours du vieillissement. Les modifications du potentiel zêta avec le temps peuvent s'expliquer également par les processus de coagulation et de solubilité des émulsifiants, ainsi que leur détérioration chimique. La baisse du potentiel zêta avec l'âge de l'émulsion serait aussi corrélée avec une augmentation du diamètre moyen des gouttelettes et à une baisse de la viscosité des émulsions (Rambhau, Phadke & Dorle 1977).

Nous avons décrit dans ce chapitre les principaux aspects physico-chimiques des émulsions, couramment utilisées dans l'industrie cosmétique. Ceux-ci caractérisent notamment les crèmes solaires, qui représentent une part importante du marché cosmétique. Le marché des soins pour le soleil est en effet orienté par la prise de conscience croissante des consommateurs en matière de protection contre le soleil et de santé de la peau, et on constate la présence d'écrans solaires dans de nombreux produits de soin. En particulier les filtres minéraux connaissent un essor important, en partie du fait de la méfiance du consommateur vis-à-vis des molécules organiques naturelles et surtout de synthèse, parfois allergisantes. Le dioxyde de titane est le filtre le plus utilisé, et très fréquemment sous forme de nanoparticules (FEBEA 2009).

Chapitre 2 *Les nanoparticules de dioxyde de titane en cosmétique*

2.1 Définition d'un nanomatériau

Récemment, la Commission européenne a adopté la 'Recommandation de la commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux' : un nanomatériau est donc désormais défini comme « un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50% des particules dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. ». Cette définition sera réexaminée en 2014 à la lumière de l'expérience et d'enseignements nouveaux. Selon la norme ('XP ISO/TS 80004-1' 2013), un nanomatériau est un matériau dont au moins une dimension externe est à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire comprise approximativement entre 1 et 100 nm, ou qui possède une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. Dans ce cadre, les nanoparticules sont catégorisées comme des nanomatériaux dont les trois dimensions externes sont à l'échelle nanométrique.

En France, le ministère de l'Ecologie, du Développement durable, des Transports et du Logement a établi par le décret du 17-02-2012, la définition d'une « substance à l'état nanoparticulaire » : « substance telle que définie à l'article 3 du règlement (CE) n° 1907/2006 (REACH), fabriquée intentionnellement à l'échelle nanométrique, contenant des particules, non liées ou sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont une proportion minimale des particules, dans la distribution des tailles en nombre, présente une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». Parmi les définitions posées figurent celles des termes de "particule", "agglomérat" et "agrégat":

a) on entend par "particule" un fragment de matière possédant des contours physiques bien définis

b) on entend par "agrégat" une particule constituée de particules fortement liées ou fusionnées

c) on entend par "agglomérat" un amas de particules ou d'agrégats faiblement liés dont la surface externe globale correspond à la somme des surfaces de ses constituants individuels.

Ces définitions sont aujourd'hui des outils nécessaires à la régulation de la fabrication et de l'utilisation des nanomatériaux. Désormais les institutions européennes ont une définition commune à laquelle se référer pour leurs éventuelles régulations. D'autre part les recherches scientifiques pourront également mettre en cohérence la terminologie de leurs méthodes d'évaluation et de gestion des risques.

2.2 Réactivité des nanoparticules

Les propriétés physico-chimiques des nanoparticules diffèrent de façon mesurable de celles des matériaux en vrac. À l'échelle nanométrique, la matière présente des propriétés

particulières : il s'agit des propriétés quantiques, mais aussi d'effets de surface, de volume, ou encore d'effets de bord. En effet, conformément aux lois de la mécanique quantique, certaines particules adopteront au niveau nanométrique un comportement ondulatoire aux dépens de comportement corpusculaire que nous lui connaissons au niveau macroscopique, avec l'apparition de niveaux discrets d'énergie (Pluchery & Carrière 2011), sans oublier des propriétés résultant de la modification du rapport surface-volume (Roduner 2006).
L'énergie de surface croît avec la surface spécifique qui est inversement proportionnelle à la taille de la particule. Plus une particule est petite et donc plus elle sera réactive (Macwan, Dave & Chaturvedi 2011). Les propriétés de nanoparticules ne sont donc plus équivalentes à celles du matériau constitutif (Grassian 2008).

2.3 Utilisation des nanoparticules de TiO_2 en cosmétique

2.3.1 Le marché cosmétique

Le *Woodrow Wilson Institute* dans le cadre du NanoTech Project (*www.nanotechproject.org*), dans sa dernière mise à jour de Mars 2011, recensait 1317 produits contenant des nanomatériaux sur le marché mondial. La catégorie la plus importante est celle appelée « santé et fitness » parmi laquelle figurent notamment des produits cosmétiques (143 produits répertoriés), des produits de soin personnel (267 produits répertoriés) et des crèmes solaires (33 produits répertoriés). En 2009, l'ONG *Environmental Working Group* (États-Unis) identifie pour le seul secteur des produits de soin personnel, près de 9 509 produits contenant des ingrédients de dimension nanométrique (*Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement* 2010). Les principaux produits issus des nanotechnologies utilisés pour la cosmétique, sont les nanoparticules utilisées dans les écrans solaires, à base de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc. Mais d'autres métaux sont également utilisés, comme l'or ou l'argent par exemple, pour leurs propriétés antibactériennes. Les fullerènes sont utilisés en tant que pigment dans des mascaras, ou comme actifs anti-âge, qui capteraient les radicaux. On distingue également les nano émulsions et nanosomes qui sont utilisés pour préserver les ingrédients comme les vitamines ou antioxydants, et améliorer la transparence et la clarté de l'émulsion.

2.3.2 Réglementation cosmétique des nanoparticules de TiO_2

Le règlement cosmétique de 2009 ('Règlement (CE) N° 1223/2009 du Parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques' 2009) propose la définition: « un nanomatériau est un matériau insoluble ou bio-persistant, fabriqué intentionnellement et se caractérisant par une ou plusieurs dimensions externes, ou une structure interne, sur une échelle de 1 à 100 nm». Ce règlement cosmétique stipule que cette définition est susceptible d'évoluer selon l'état des connaissances.

La législation concernant les produits de protection solaire diffère en fonction des continents. En Europe, ce sont des produits cosmétiques tandis qu'aux Etats-Unis, ils sont considérés comme des produits pharmaceutiques, des médicaments non soumis à prescription médicale, dits OTC (*Over-the-counter*) et sont ainsi régis par une législation plus rigoureuse. Leur mise sur le marché américain doit être approuvée par la Food and Drug Administration (FDA). Dans la communauté européenne, l'annexe VII de la XXVIème directive 2002/34 portant adaptation au progrès de la directive 76/768/CE modifiée, établit une liste de 27 filtres que peuvent contenir les produits de protection solaire et fixe les concentrations maximales autorisées et les conditions d'emploi pour chacun d'entre eux. Le dioxyde de titane est le seul filtre UV inorganique réglementé : en effet, l'oxyde de zinc, malgré sa présence fréquente dans les produits de protection solaire, n'est pas réglementé en tant que filtre UV en Europe. Après évaluation dans l'avis SCCNFP/0649/03 par le CSPC (Comité Scientifique des Produits de Consommation) en 2003, il est conclu que la sécurité de l'oxyde de zinc en tant que filtre UV n'a pas été suffisamment démontrée (The scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers 2003). Le TiO_2 est soumis à une restriction d'utilisation maximale de 25 w/w %.

Depuis le 1er janvier 2013, l'ensemble des fabricants, distributeurs et importateurs de nanoparticules doivent déclarer les usages de substances à l'état nanoparticulaire. Les quantités produites chaque année en France ont maintenant l'obligation d'être recensées. L'objectif est de "mieux connaître ces substances et leurs usages, de disposer d'une traçabilité des filières d'utilisation, d'une meilleure connaissance du marché et des volumes commercialisés, et de collecter les informations disponibles sur leurs propriétés toxicologiques et écotoxicologiques" (rappelé dans le décret n° 2012-232 du 17 février 2012 relatif à la déclaration annuelle des substances à l'état nanoparticulaire). Le règlement des cosmétiques de 2009 a exigé qu'à partir de juillet 2013 les fabricants indiquent la présence des nanomatériaux dans la liste des ingrédients des cosmétiques. La règle d'étiquetage demande que soit indiqué le terme « nano » entre crochets après le nom de l'ingrédient concerné. Un rapport sur la sécurité toxicologique sera alors exigé dans le cadre de cette procédure.

On recense à travers le monde plus d'un millier de produits issus des nanotechnologies, mais à ce jour, en dehors du domaine cosmétique, aucune réglementation n'est exigée. L'industrie cosmétique est ainsi le premier secteur économique à se doter d'un encadrement spécifique des nanomatériaux.

2.3.3 Les propriétés du dioxyde de titane

Le TiO_2 existe sous trois formes cristallines : l'anatase, le rutile et la brookite (Macwan, Dave & Chaturvedi 2011). Les propriétés d'absorption des rayons UV ne sont effectives qu'avec les

formes anatase et rutile étant donnée leur capacité d'absorption pour une longueur d'onde située aux alentours de 400 nm (Buchalska *et al.* 2010).

a) Effet de taille nanométrique

L'emploi de tailles nanométriques fut motivé par des raisons d'esthétisme, un critère non négligeable d'un point de vue cosmétique, sans compromettre l'efficacité de la protection des UV de façon trop importante.

Amélioration de l'efficacité

L'utilisation de particules nanométriques offre une meilleure efficacité d'atténuation de la lumière dans l'UVB. La diminution de la taille des particules entraîne un décalage du spectre d'absorbance vers les plus courtes longueurs d'onde ainsi qu'un rétrécissement de la largeur de la bande d'absorption (Forestier 2008), comme on peut le voir sur la Figure 9.

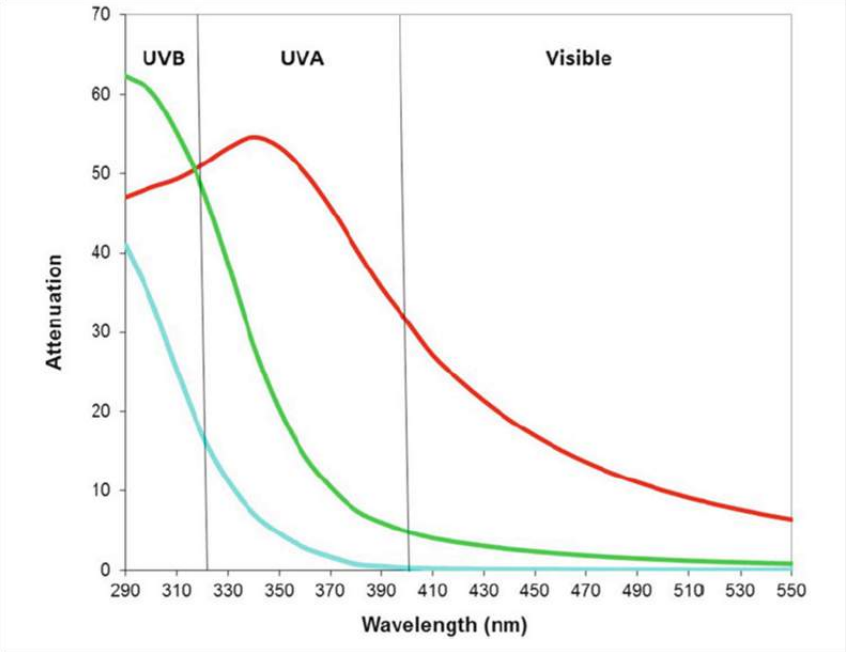


Figure 9 - Influence de la taille de particules du TiO_2 sur le spectre d'absorption (Chen, Tooley & Wang 2012). En bleu : 20nm, En vert : 50nm, en rouge : 100 nm

La meilleure protection serait obtenue avec une émulsion contenant des agrégats de nanoparticules de TiO_2 avec une taille variant entre 50 et 120 nm (Popov *et al.* 2005).

Lorsque les particules sont de taille nanométrique, les mécanismes de filtration de la lumière sont modifiés. Les formes micrométriques assurent une protection solaire par réflexion du rayonnement UV, alors que les formes nanométriques diffractent et absorbent la lumière (Dunford, Salinaro & Cai 1997). La filtration de la lumière est donc majoritairement réalisée par les phénomènes de diffusion (de type Rayleigh) et d'absorption.

Esthétisme : absorption dans le visible

Le mécanisme d'atténuation des UV par les filtres inorganiques dépend de la taille des particules. Lorsqu'elles sont de taille nanométrique, les mécanismes de filtration de la lumière sont modifiés (Petrazzuoli 2000). L'utilisation de filtres minéraux à base de dioxyde de titane a été longtemps limitée car leur opacité leur procurait une apparence cosmétique non acceptable après application sur la peau. En effet, à l'échelle micrométrique, le TiO_2 est de couleur blanche. La raison est que le TiO_2 n'absorbe presque pas de lumière incidente dans la région visible du spectre : elle est soit transmise, soit réfractée. Pour un cristal massif de TiO_2, il y a assez de lumière transmise pour que le cristal apparaisse transparent, en revanche, à l'échelle micrométrique, presque toute la lumière est réfléchie par les interfaces entre cristaux, ce qui donne à la poudre sa couleur blanche (Armand 2011). Pour une longueur d'onde de 590 nm, l'indice de réfraction du rutile est de 2,7 tandis que celui de l'anatase est de 2,55. La diminution de la taille du dioxyde de titane dans la gamme du nanomètre réduit leur interaction avec la lumière visible, ce qui leur donne un aspect transparent après application cutanée.

Théorie de Rayleigh

Lorsque la taille des particules est négligeable devant la longueur d'onde incidente λ, les photons sont diffusés par diffusion Rayleigh, un cas limite de la diffusion de Mie. La diffusion Rayleigh est une diffusion de type élastique. Les photons diffusés de cette manière par les nanoparticules sont donc de même longueur d'onde et énergie que les photons incidents. Les rayons visibles sont peu diffusés par ce mode de diffusion, ce qui atténue l'effet de blanchiment des produits solaires contenant des particules inorganiques. La Figure 10 résume différents phénomènes optiques qui se produisent lorsqu'un rayon UV incident rencontre un produit solaire contenant du TiO_2 nanométrique. Une petite partie du rayon incident I_0 est réfléchie (I_r) alors que la majeure partie est réfractée. Au contact des nanoparticules, le rayon réfracté est soit absorbé (I_a) soit diffusé (I_d) dans toutes les directions. Une petite partie du rayon diffusé est finalement transmise (I_t) en direction de la peau.

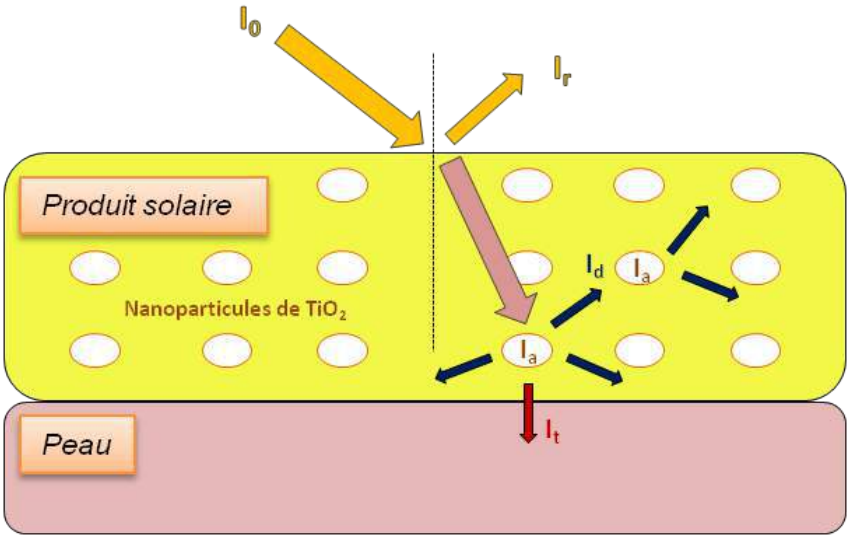


Figure 10 - Schéma du mécanisme d'atténuation des UV par des nanoparticules de TiO_2

b) Importance du traitement de surface

Etat de surface initial

Un certain nombre de mécanismes physico-chimiques peuvent se produire à la surface d'une nanoparticule inorganique. La Figure 11 représente les réactions qui peuvent exister à la suite de l'oxydation, de l'adsorption/désorption, des transferts d'électrons, de l'acido-basicité de la surface. La production d'espèces réactives à base d'oxygène ou encore la libération d'ions toxiques figurent parmi les exemples fréquents.

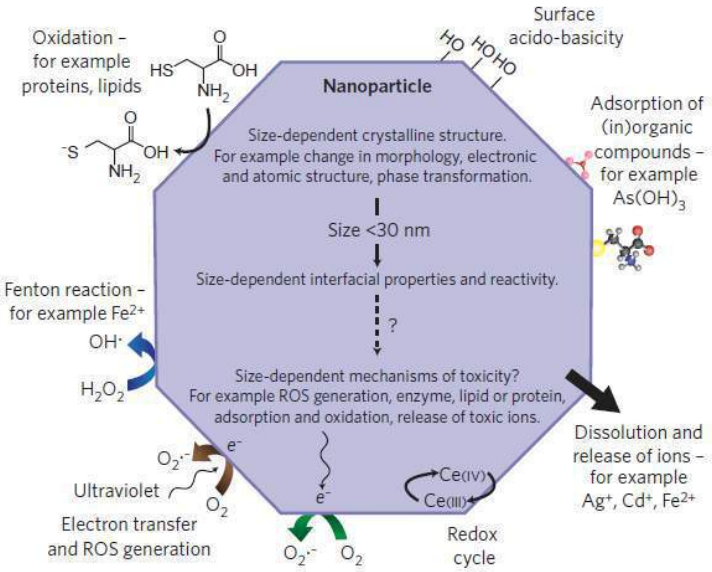


Figure 11 - Exemples des réactions liées aux différentes propriétés de surfaces d'une nanoparticule inorganique (Auffan et al. 2009)

Réduction de l'activité photocatalytique

Le mécanisme d'absorption est lié à la structure électronique du matériau. Il a lieu lorsque le photon incident possède une énergie au moins égale à la valeur de la bande interdite du matériau semi-conducteur. Dans un tel cas, l'énergie du photon est absorbée pour induire un transfert d'électron entre la bande de valence et la bande de conduction du matériau. Ce mécanisme est exalté lorsque la surface spécifique du matériau augmente (Dransfield *et al.* 2000). L'absorption de photons peut conduire à la photocatalyse, un phénomène générateur de radicaux libres agressifs pour les composés organiques.

Ces capacités photocatalytiques du TiO_2 peuvent avoir un certain nombre d'actions négatives sur les tissus vivants : au niveau de la perméabilité membranaire des cellules, de l'intégrité de l'ADN, de l'ARN et des protéines par exemple (Buchalska *et al.* 2010). La forme anatase possédant des propriétés photocatalytiques supérieures à celles présentées par la forme rutile (Tayade *et al.* 2007), l'industrie cosmétique s'attache à utiliser principalement la forme rutile du TiO_2 ou des mélanges d'anatase et rutile (Serpone, Dondi & Albini 2007).

Afin d'éviter au maximum les effets néfastes du TiO_2 dus à sa photoactivité, les particules utilisées en cosmétique sont enrobées afin de réduire la formation des espèces réactives d'oxygène (ROS) avant qu'elles ne puissent réagir avec les autres substances de la formulation et les cellules de l'épiderme (Tiano *et al.* 2010). La surface des nanoparticules est traitée avec de la silice, de l'alumine ou de la zircone. En effet, les oxydes d'enrobage formeraient des oxydes hydratés capables de capturer les radicaux hydroxyles issus de la photocatalyse (Dunford, Salinaro & Cai 1997). Cela augmente la photostabilité et réduit la probabilité que les molécules excitées libèrent des électrons. Certains enrobages semblent

plus efficaces que d'autres pour limiter les effets photocatalytiques. Ainsi, l'alumine et le dopage au manganèse ou bien le mélange alumine et dimethicone constituent des enrobages efficaces.

De même il a été montré que des traitements de surface organiques de type alkoxysilane permettent de réduire l'activité photocatalytique (Siddiquey *et al.* 2007).

Amélioration des capacités de dispersion

En plus de cet enrobage de passivation, les nanoparticules sont également traitées afin de faciliter leur dispersion soit dans la phase grasse de l'émulsion, en utilisant un traitement de surface lipophile et/ou hydrophobe, soit dans la phase aqueuse, en utilisant au besoin un traitement de surface hydrophile.

Il existe principalement deux types de techniques de modification de surface : l'adsorption physique, qui n'est pas détaillée dans le cadre de notre étude, et le greffage ou adsoprtion chimique. Le processus d'adsorption chimique résulte d'une réaction chimique avec formation de liaisons covalentes entre les molécules d'adsorbat et la surface d'adsorbant. On peut par exemple illustrer ce procédé dans le cas de la modification de surface d'une particule de TiO_2 par le triethoxycaprylylsilane (Figure 12). Ce dernier va subir l'hydrolyse des liaisons Si-O en présence d'eau pour former les groupements silanol correspondants. Cet intermédiaire est ensuite greffé chimiquement au pigment par l'intermédiaire d'une réaction de condensation des groupements silanol sur les groupements hydroxyles de la surface de l'oxyde métallique. À la fin de la réaction, les groupements caprylylsilyl sont liés de façon covalente à la surface de la particule et forment un traitement de surface stable (Zhao *et al.* 2012).

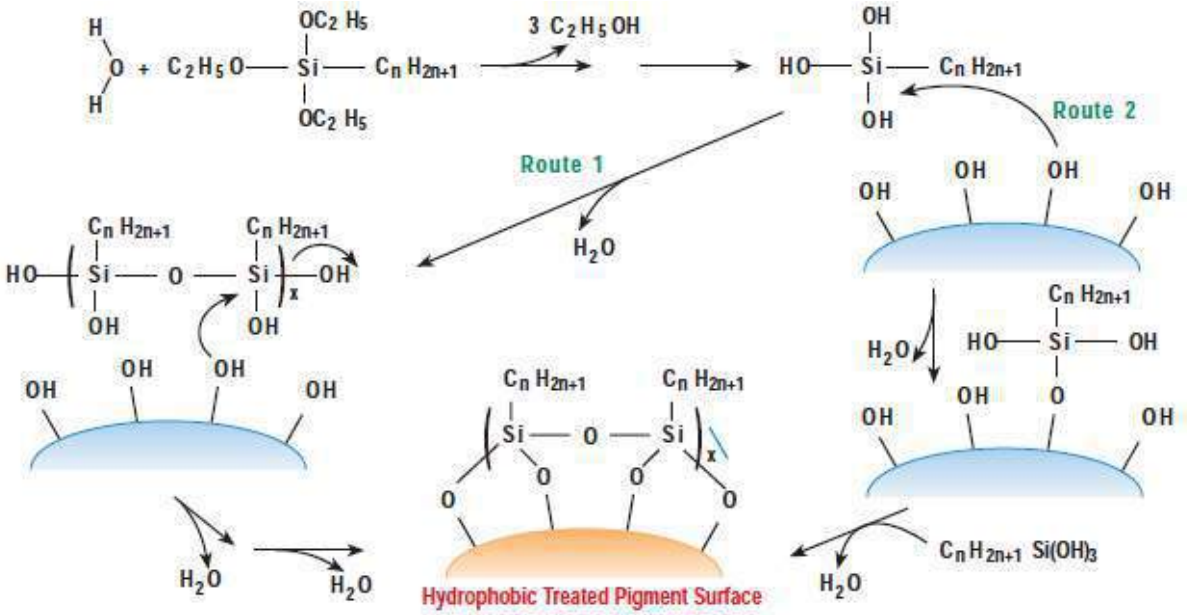


Figure 12 - Greffage du triethoxycaprylylsilane sur la surface de dioxyde de titane (Kobo 2012)

Les données de caractérisation ont confirmé que la liaison des organosilanols à la surface des particules est réalisée par des liaisons Si-O-Ti et que les liaisons carbone-carbone des groupements fonctionnels se situent loin de la surface des particules modifiées (Chen & Yakovlev 2010).

L'étude de Labille *et al.* 2010 indique que les nanoparticules de TiO_2 utilisées dans les produits de protection solaire sont implantées dans une couche amorphe mais qu'il n'est pas possible de distinguer les deux types de traitements de surface de la particule, malgré le recours à des techniques sophistiquées de microscopie électronique. Une disposition schématique des deux traitements de surface a été proposée où la couche organique (ici des polydimethylsiloxane) recouvre la couche de passivation constituée d'$Al(OH)_3$ qui elle-même recouvre la nanoparticule (Figure 13).

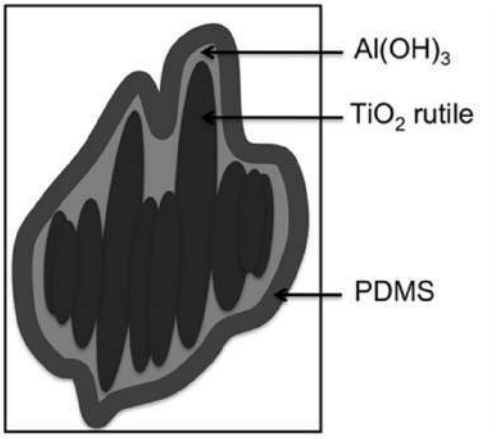


Figure 13 - Représentation schématique d'une nanoparticule de TiO_2 enrobée de deux couches successives de traitement de surface (Labille et al. 2010)

TiO_2 hydrophiles

Les traitements de surface hydrophiles des particules de dioxyde de titane sont généralement constitués d'oxydes tels que la silice ou l'alumine et constituent la couche de passivation. Des polymères tels que le polyacrylate de sodium peuvent également être utilisés en tant que dispersants des nanoparticules de TiO_2. Ce sont les forces de répulsion électrostatiques qui sont généralement responsables du maintien de la dispersion des particules dans l'eau, compte-tenu de leur charge de surface. Un des paramètres importants est le point isoélectrique, il dépend des traitements de surface de la particule et des agents dispersants utilisés. Cependant, en formulation, ce point isoélectrique doit être évité, puisqu'à ce pH, il n'y aura pas de répulsions électrostatiques et les particules pourront alors s'agglomérer. Le contrôle du pH de l'émulsion est donc un paramètre important lorsqu'on formule avec des particules hydrophiles en phase aqueuse. De plus, de tels systèmes peuvent mener à une

agglomération si un électrolyte est utilisé dans la phase aqueuse, qui peut modifier les répulsions électrostatiques.

TiO_2 hydrophobes

Couramment le TiO_2 nanométrique est dispersé dans les huiles : les particules de TiO_2 hydrophobes sont alors utilisées ; dans ce cas, les tensioactifs et les polymères sont employés afin de permettre des répulsions stériques entre les particules et ainsi de les maintenir sous forme dispersée. Un avantage de ces dispersions, est que les forces répulsives mises en jeu ne sont pas pH dépendantes. Ainsi elles ne présentent pas de point isoélectrique et peuvent être utilisées sur une large gamme de pH. Lorsque les particules de TiO_2 sont incorporées dans la phase huileuse, les charges de surface sont isolées et les forces électrostatiques sont faibles : dans ce cas, les répulsions stériques sont majoritaires. C'est le cas lors de l'utilisation de traitements de surface des particules avec des espèces silicones (comme le dimethicone) ou organiques (composés silanes par exemple).
Il a été montré que l'efficacité des produits solaires inorganiques dépendait de la taille de particules utilisées, permettant de couvrir un domaine plus large des UV, et des propriétés de surface des particules. Les tailles de particules nanométriques amélioreraient également la stabilité de la dispersion de la formulation (Chaudhuri & Majewski 1998). Ceci pourrait s'expliquer du fait que l'aire de surface des nanoparticules est plus grande, et crée donc une plus importante viscosité, ce qui empêche la sédimentation et l'agglutination des particules en diminuant leur mobilité (Himics & Pineiro 1998).

Une pré-dispersion des particules obtenue par broyage des particules dans le milieu de dispersion, permet d'obtenir une formulation de meilleure qualité (Nearn, Redshaw & Burgess 1996). Les poudres ultrafines sèches vont avoir tendance à s'agglomérer, et les agglomérats ne pourront pas être brisés par les énergies de mélange utilisées dans les techniques classiques de formulation cosmétique. Ainsi la dispersion n'est pas idéale, et la protection solaire est diminuée. Il est connu qu'en utilisant des poudres plutôt que des dispersions, il y a un risque que les particules se ré-agglomèrent au cours de l'utilisation du produit.

Des auteurs ont réalisé leurs propres formulations en s'inspirant de brevets de BASF, en utilisant des nanoparticules de TiO_2 coatées et non coatées ainsi que des particules de TiO_2 de tailles micrométriques. Il apparait que les particules de TiO_2 ont la même taille dans les formulations que les matériaux bruts, ce qui suggèrerait que le procédé de formulation n'affecte ni la taille et ni les formes des particules (Wokovich *et al.* 2009).

Stabilité du traitement de surface

Le CSSC, le Comité Scientifique Européen pour la Sécurité des Consommateurs, dans son avis de 2000 (SCCNFP 2000) précisait que la stabilité de certains enrobages utilisés avait été

évaluée par les industriels : les enrobages soumis à des variations de pH et de température ont été rapportés comme stables sous différentes conditions de stress. Néanmoins, (Auffan *et al.* 2010) ont montré que du dioxyde de titane hydrophobe utilisé pour les cosmétiques, et traité avec une couche $Al(OH)_3$ et une couche de polydimethylsiloxane, devient hydrophile au contact de l'eau et s'agrège rapidement. 90% de la quantité du silicium de la couche organique de silane est désorbée et le polydimethylsiloxane restant à la surface est oxydé. La couche $Al(OH)_3$ est également affectée mais prévient néanmoins encore toute photoactivité. D'autre part, Virkutyte, Al-Abed & Dionysiou 2012 ont montré que l'eau de piscine pouvait modifier les caractéristiques de surface du TiO_2 utilisé dans les filtres solaires car une augmentation de la concentration en chlore affectait significativement l'intégrité de la couche protectrice de $Al(OH)_3$ de la particule. Une augmentation significative du potentiel zêta était alors observée. Les particules pouvaient ainsi se retrouver de nouveau photoactives. Dans l'étude de Labille *et al.* 2010, une altération et une désorption du coating hydrophobe des TiO_2 en milieu aqueux sont observées. Les poudres de TiO_2 initialement hydrophobes ont été mises en contact avec de l'eau, sous agitation. Il apparait qu'au bout d'un certain temps, le comportement hydrophobe des nanocomposites évolue rapidement et la dispersion des particules devient possible. Des agglomérats de 200 µm se forment afin de minimiser l'interface solide-liquide, et des particules de 300 nm sont bien dispersées. De plus, une modification du potentiel zêta de ces particules est observée : initialement négatif, il devient positif après un certain temps d'agitation : le TiO_2 nanométrique subit une modification de surface, expliqué par une altération rapide et une désorption du revêtement hydrophobe de son traitement de surface en milieu aqueux.

Les particules de TiO_2 utilisées dans les filtres solaires sont de nature complexe. En effet, la présence d'un traitement de surface change la nature de l'interface entre la particule et l'environnement ou l'organisme. L'état actuel des connaissances scientifiques ne permet pas de déterminer si c'est le traitement de surface ou le matériau constitutif de la particule qui domine les interactions particule-environnement et particule-organisme.

c) Les phénomènes d'agglomération et d'agrégation

Afin d'obtenir une dispersion homogène au sein de l'émulsion, cela nécessite que les forces entre les particules soient assez répulsives afin d'éviter tout phénomène d'agglomération. Au sein de la formulation, ces forces répulsives doivent être maintenues afin de garder les particules correctement dispersées.

Les nanoparticules de dioxyde de titane, telles que déclarées par les fabricants, ont une taille de particules appelée taille primaire. Cela correspond à leur état avant incorporation dans les formulations (Delrieu & Shao). Ces particules primaires ont une tendance naturelle à s'agglomérer ou s'agréger, formant ainsi des particules de taille beaucoup plus importantes. On désigne généralement par agglomérat un groupe de particules dont la cohésion relève des forces de Van der Waals, des forces électrostatiques ou des forces développées par les

tensions de surface, par opposition à un agrégat où les particules sont plus fortement liées et ne peuvent donc plus se séparer (Jiang, Oberdörster & Biswas 2009).

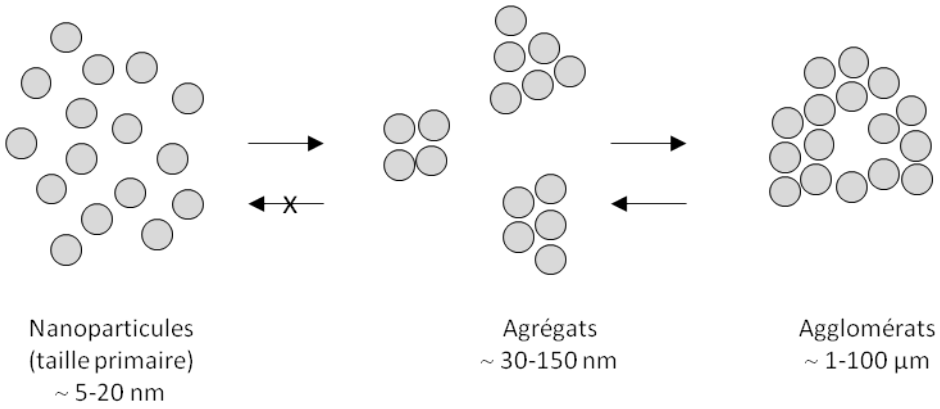


Figure 14 - Formation d'agrégats et agglomérats depuis des nanoparticules de tailles primaires

Ces agglomérats et agrégats peuvent avoir des formes complexes, non sphériques, et difficiles à caractériser. L'agglomération et l'agrégation de nanomatériaux peut aboutir à des particules colloïdales dont la taille est bien supérieure à 100 nm (Guzman, Finnegan & Banfield 2006). Ridley, Hackley, & Machesky 2006 ont observé qu'une suspension nanométrique de TiO_2 anatase avec une taille primaire de particules de 4 nm était principalement constituée d'agrégats d'un diamètre moyen entre 1 et 30 µm. Cette taille reste identique après sonication. Ce phénomène d'agglomération dépend des différentes conditions de dispersion des nanoparticules, de la puissance des ultrasons, du pH et de la force ionique (Domingos, Tufenkji & Wilkinson 2009), ou de la formulation contenant les nanoparticules. Le point isoélectrique pI, pH auquel la charge électronique à la surface de la particule est nulle, est lié au phénomène d'agrégation. A ce pH, les répulsions électrostatiques s'annulent, les forces de Van der Waals aux courtes distances deviennent prépondérantes, et les particules s'agrègent lorsqu'elles entrent en collision. Les agrégats tendent à être de taille inférieure lorsque le pH diffère du pI (Guzman, Finnegan & Banfield 2006). Ce pI dépend du traitement de surface des particules : le dioxyde de titane pur a un point isoélectrique aux alentours de 6, tandis que lorsqu'il est traité en surface avec de l'alumine et du dimethicone, le point isoélectrique a une valeur de 9 (Chaudhuri & Majewski 1998). En dessous de pH 9, les particules ont une charge positive, ce qui leur permet de se repousser les unes les autres en dispersion. Le point isoélectrique dépend également de la forme cristalline de la particule : les valeurs sont de 5,9 pour le rutile et 6,3 pour l'anatase (Finnegan, Zhang & Banfield 2007).

La quantité de particules libres dont la taille est inférieure à 100 nm dépend beaucoup également des conditions de synthèse des particules, de la température et de la présence de solutions tampons (Jiang, Oberdörster & Biswas 2009). Chaudhuri & Majewski 2000 constatent que l'utilisation des nanoparticules de TiO_2 d'une taille primaire de 10-20 nm, avec une taille

des agrégats et/ou agglomérats de 100 nm dans la formulation finale, permet d'obtenir une formulation efficace pour se protéger du rayonnement UV.
Les traitements de surface jouent également un rôle sur le comportement d'agrégation des particules. Une communication de Wiench *et al.* 2007 indiquait que des nanoparticules de TiO_2 rutile dont le traitement de surface était constitué d'une combinaison d'hydroxyde d'aluminium, de silice et de divers polymères, montraient des taux d'agglomération et de sédimentation inférieurs à des particules non enrobées.

Interactions électrostatiques
Lorsque le dioxyde de titane est exposé à l'eau, sa surface recouverte d'une couche de groupements hydroxyle peut réagir avec l'hydrogène (H^+) et les ions (OH^-) pour produire des ions d'une charge positive ou négative à la surface des particules. Tous les oxydes ont donc tendance à être chargés positivement à pH < pI et chargés négativement à pH > pI. Plus le point isoélectrique d'un oxyde sera faible, plus sa surface sera acide, tandis qu'à l'inverse plus le point isoélectrique sera élevé, plus la surface sera basique.

Les charges qui peuvent apparaître à la surface des particules peuvent avoir plusieurs origines : ionisation de groupements chimiques, perte d'ions, adsorption d'espèces chargées (Fernandez-Nieves & De Las Nieves 1999). Ceci a pour conséquence l'apparition d'une couche de charges électriques à la surface des particules, qui, en solution, sont neutralisées par les ions de la solution et créent une couche diélectrique. La valeur du potentiel zêta, comme dans le cas des émulsions décrit précédemment, permet de prédire la stabilité à long terme du système colloïdal. Si les particules en suspension possèdent une valeur absolue de potentiel suffisamment élevée (une valeur absolue supérieure à 30mV est classiquement considérée comme une valeur minimale autorisant la stabilisation électrostatique), elles tendent à se repousser mutuellement et ne peuvent se rassembler. En revanche, si leur potentiel zêta est faible, aucune force ne les empêche de se rassembler, favorisant ainsi les phénomènes de coagulation (Mandzy, Grulke & Druffel 2005).

Les effets de la surface des particules, la taille des particules primaires, et la phase cristalline de TiO_2 sur les propriétés de dispersion des nanoparticules ont été analysés (Suttiponparnit *et al.* 2011). Le pH de la solution et la force ionique jouent un rôle important sur le potentiel zêta de la dispersion et sur la valeur du diamètre hydrodynamique. L'augmentation de la surface spécifique du dioxyde de titane conduit à une diminution du pH de la solution, ce qui est expliqué par les auteurs par l'augmentation de la concentration d'ions H^+ lors de la mise en présence de la surface de titane et des ions hydroxyles de l'eau . À pH fixé, une augmentation de la concentration en masse de dioxyde de titane augmente la fréquence de collision entre les particules et donc crée davantage d'agglomération. De plus, les hautes forces ioniques de solution vont réduire l'épaisseur de la couche diélectrique entourant la nanoparticule chargée,

ce qui réduit les répulsions électrostatiques entre nanoparticules, créant ainsi de l'agrégation. L'effet du pH, la concentration en additif ou la force ionique du milieu liquide sur le potentiel zêta peuvent apporter des informations sur la formulation du produit permettant d'atteindre une stabilité maximale (Liao, Wu & Liao 2009).

Interactions stériques

Les polymères ajoutés au système et adsorbés à la surface des particules empêchent une mise en contact des surfaces de celles-ci. Ces forces répulsives sont d'origine entropique et dépendent du degré de couverture de la surface et de la qualité du solvant (Arditty 2004). Ce mécanisme de stabilisation stérique est souvent responsable d'une faible viscosité des produits formulés (Nasu & Otsubo 2008).

2.4 Caractérisation des nanoparticules de TiO_2

La métrologie des nanoparticules doit permettre de caractériser un ensemble de propriétés physiques et chimiques et comprend:

- leur dénombrement (non détaillé ici) ;
- des propriétés morphologiques (structure cristalline, forme des particules élémentaires et des agrégats, état de dispersion, surface spécifique) ;
- des propriétés chimiques (composition) ;
- des propriétés physico-chimiques (charge de surface).

On peut ainsi détailler certaines techniques de caractérisation fondamentales dans la métrologie des poudres nanoparticules.

La diffraction des rayons X (XRD) permet l'étude des arrangements atomiques dans les cristaux. La caractérisation par diffraction aux rayons X du TiO_2 utilisé en tant que filtres UV dans les crèmes solaires, permet de conclure quant à la forme cristallographique, rutile ou anatase (Dussert, Gooris & Hemmerle 1997).

L'analyse élémentaire renseigne sur la présence d'éléments comme l'aluminium et le silicium, très probablement utilisés pour le coating des particules (Lewicka *et al.* 2011).

La microscopie électronique en transmission (TEM pour *Transmission Electron Microscopy*) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon très mince. Cette technique, basée sur le principe de diffraction des électrons, informe sur les tailles et formes des nanoparticules. Il est par exemple possible de constater que les particules sont enrobées dans une couche amorphe, sans pour autant distinguer les différents traitements de surface utilisés, comme on l'a précisé plus haut (Labille *et al.* 2010).

Grâce à cette technique, il est aussi possible d'étudier la composition chimique de l'échantillon en étudiant le rayonnement X provoqué par le faisceau électronique et également de calculer la surface spécifique, c'est-à-dire la quantité de surface en $m^2.g^{-1}$ de nanoparticules.

Par *microscopie électronique à balayage*, Lewicka *et al.* 2011 a évalué l'épaisseur du coating à 2 nm.

Le microscope à force atomique (ou AFM pour *Atomic Force Microscope*) permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Il utilise la force d'interaction (généralement Van Der Waals, ou plus rarement électrostatique) entre la pointe de la sonde et l'échantillon. Il permet de visualiser les morphologies de surface d'échantillons de TiO_2 coatés (Euvananont *et al.* 2008).

La spectrométrie de photoélectrons induits par rayons X (XPS) est une technique spectroscopique quantitative qui permet de mesurer la composition élémentaire, l'état chimique et l'état électronique des éléments qui existent au sein d'un matériau. Elle est particulièrement utile pour des analyses d'extrême surface, et donc pour l'analyse des traitements de surface des nanoparticules de TiO_2 (Baer *et al.* 2010).

La spectroscopie infra-rouge est également utilisée par exemple pour prouver la nature de la liaison entre le stéarate et une surface d'oxyde de titane recouverte d'alumine (Egerton, Everall & Tooley 2005), ou pour caractériser des particules de dioxyde de titane traitées en surface avec de la silice (Li *et al.* 2005).

La mesure du potentiel zêta (décrit précédemment) permet de déterminer le potentiel électrique de surface des nanoparticules.

2.5 Emulsions avec nanoparticules

2.5.1 Cas des émulsions de Pickering, stabilisées par particules

Les émulsions de Pickering sont des dispersions de deux liquides non miscibles stabilisées par des particules solides. Cet effet de stabilisation par des particules fines, a été mis en évidence au départ par Ramsden en 1903, puis décrit de manière plus complète par Pickering en 1907. Ce dernier a établi que des particules peuvent, tout comme des tensioactifs, stabiliser des émulsions huile dans eau. La stabilisation des émulsions de Pickering est liée à l'adsorption des particules à l'interface entre les phases non miscibles.
Pour que les particules s'adsorbent à l'interface, il est nécessaire qu'elles soient partiellement mouillées par les deux phases en présence. Pour obtenir une stabilisation optimale des

émulsions, des particules solides doivent être davantage mouillées par le liquide de la phase dispersante de l'émulsion que par celui de la phase dispersée (Frelichowska 2009).

Dans une étude réalisée par Stiller *et al.* 2004 sur des émulsions stabilisées exclusivement par des particules de dioxyde de titane afin d'obtenir des émulsions sans tensioactif et permettant une protection solaire forte, il a été montré que seules les particules avec une hydrophobicité moyenne (avec des valeurs d'angles de contact θ entre 110 et 152°) sont capables de former des émulsions stables.

2.5.2 Emulsions avec tensioactifs et nanoparticules

a) Organisation des particules et des tensioactifs vis-à-vis de l'interface

Le comportement des émulsions stabilisées par des molécules de tensioactifs est bien connu ainsi que celui, plus récemment, des émulsions stabilisées uniquement par des particules solides. Depuis, de nombreuses formulations commerciales contiennent un mélange de ces deux types de particules. L'addition de tensioactifs à un système contenant des particules ou inversement est intéressant vis-à-vis des paramètres de mouillabilité et d'émulsification. Si les tensioactifs s'adsorbent sur les surfaces des particules, leur mouillabilité est modifiée, ce qui affecte leur efficacité en tant qu'agents tensioactifs. Cette adsorption peut aussi conduire à une agrégation des particules, ce qui peut être un avantage ou non quant à la stabilité de l'émulsion.

Ravera *et al.* 2007 a par exemple étudié la dispersion de particules de silice en présence de tensioactif: le rôle du surfactant étant de faire varier les propriétés de surface de la particule, en s'adsorbant sur elle. En fonction de leur mouillabilité, les nanoparticules ont tendance à se déplacer de la phase continue vers l'interface, ce qui tend à modifier les propriétés des interfaces : elles peuvent alors jouer un rôle pour éviter la coalescence ou pour stabiliser les émulsions. Une augmentation de la concentration de nanoparticules à l'interface cause une diminution de la tension interfaciale et superficielle. Si en revanche, les tensioactifs ne sont pas adsorbés sur les particules, il est possible que les deux espèces soient en compétition à l'interface eau-huile, où l'une prédominera. Le travail de Pichot, Spyropoulos, & Norton 2010 a montré que la position des particules à l'interface et donc les mécanismes de stabilité de ces types de systèmes étaient liés à la concentration en surfactants. De manière similaire, il est montré dans le travail de Vashisth *et al.* 2010, que l'ajout de molécules qui s'adsorbent préférentiellement à l'interface huile-eau a pour conséquence de déplacer les nanoparticules de cette interface. L'adsorption des surfactants à l'interface est énergétiquement favorisée et se produit le plus fréquemment avec ces systèmes. Cependant l'addition de particules à des systèmes comprenant des surfactants n'a pas toujours mené à une stabilisation de l'émulsion (Legrand *et al.* 2005).

L'étude de Binks, Desforges, & Duff 2007 apporte des compléments sur la compréhension du comportement des deux types d' émulsifiants vis-à-vis de la rhéologie de l'émulsion stabilisée par des tensioactifs non ioniques et des particules hydrophiles de silice. Il s'est avéré que l'influence du protocole de préparation, souvent négligée, est importante sur la stabilité de l'émulsion. Quant aux analyses de potentiel de surface, très peu se sont focalisées sur ce genre de systèmes. On peut citer l'étude de Sunkel & Berg 1996 qui s'est intéressée aux caractéristiques de stabilité de dispersions aqueuses de mélanges de dioxyde de titane et de gouttelettes d'émulsion d'huile minérale en fonction du pH, de la concentration et du type d' émulsifiant. Il apparaît que les gouttelettes d'huile sont chargées négativement dans l'eau.

b) Impact des particules sur la rhéologie de l'émulsion

D'après l'étude de Yan, Pal, & Masliyah 1991, l'ajout de matières solides à des émulsions augmente leur viscosité et accentue leur comportement non-newtonien. Le type de matières ajoutées joue un rôle important : en effet des solides de forme irrégulière (sable de silice) ont une viscosité beaucoup plus élevée que des solides sphériques (billes de verre) à la même fraction volumique de solides. Pour des concentrations d'huile et de matières solides données, les matières solides les plus petites ont une viscosité plus élevée que les solides de plus grande taille. Plus la taille des solides est proche de celle des gouttelettes, plus les interactions sont fortes. Lorsque les tailles des particules solides sont beaucoup plus grandes que les gouttelettes d'huile, l'émulsion se comporte comme une phase continue au regard des solides, et les interactions entre solides et gouttelettes deviennent négligeables. Les solides ne se comportent pas de la même manière que les gouttelettes d'huile, même avec des tailles similaires. En effet les gouttelettes d'huile sont déformables ce qui conduit à des interactions inter-particulaires. Il est également possible qu'une circulation au sein des gouttelettes d'huile se produise. Une émulsion avec des particules solides a ainsi une viscosité plus importante qu'une émulsion sans particules solides, à concentrations égales de phases dispersées.

Les effets de l'ajout de sphères de silice colloïdale de taille submicronique sur la rhéologie linéaire et non linéaire dans des solutions d'un gel viscoélastique ont été étudiés (Bandyopadhyay & Sood 2005). Les augmentations de la viscosité η_0 et du module G_0 lors de l'introduction de SiO_2 sont expliqués en considérant que des micelles géantes enchevêtrées sont formées en raison de la présence accrue d'interactions électrostatiques. La fluidité qui augmente par addition de SiO_2 peut être expliquée en considérant l'adsorption des surfactants à la surface des silices. La diminution observée des valeurs de G_0 et η_0, à des concentrations plus élevées de particules de silice s'explique ensuite en termes de formation de bicouches de tensioactifs en raison de l'adsorption du tensioactif chargé positivement sur la silice chargée négativement.

2.5.3 Emulsions cosmétiques : le cas des écrans solaires

a) Caractérisation de crèmes commerciales

Peu d'études se sont penchées sur la caractérisation physico-chimique des crèmes solaires contenant des nanoparticules de TiO_2. La caractérisation minéralogique de formulations commerciales, réalisée par diffraction des rayons X, révèle la présence de composés organiques, et renseigne sur la forme cristallographique rutile du TiO_2 (Wokovich *et al.* 2009; Botta *et al.* 2011). Les analyses ICP-AES permettent de quantifier la quantité de TiO_2 présente dans les formulations, cependant la couche du traitement de surface du TiO_2 n'est pas détectable par cette technique (Contado & Pagnoni 2008). Les analyses TEM permettent d'affirmer que les nanoparticules de TiO_2 sont organisées en agrégats micrométriques, et interagissent très certainement avec les composants organiques de la crème (Dussert, Gooris & Hemmerle 1997). Une étude s'est consacrée à la caractérisation des nanoparticules utilisées dans des échantillons de crèmes solaires commerciales, par l'utilisation des trois analyses microscopiques : la microscopie électronique à transmission, microscopie électronique à balayage par voie sèche et humide (Lorenz *et al.* 2010). La présence des filtres minéraux a été confirmée par l'analyse élémentaire et la combinaison des méthodes microscopiques a fourni des informations sur la taille, la composition et l'état plus ou moins aggloméré. Par TEM, il a été possible d'identifier la forme et les distributions de taille des particules, qui variaient très fortement d'un produit à l'autre. L'analyse MEB des échantillons non dilués à l'état sec et humide a montré que les filtres minéraux étaient présents sous forme de particules de tailles primaires et d'agglomérats jusqu'à l'ordre du micromètre. La distribution des tailles de particules ne semble quant à elle pas toujours homogène au sein de la crème.

Dans l'étude de Turkoglu & Yener 1997, des émulsions type solaire ont été réalisées, incorporant de 5 à 10% de dispersions de TiO_2 et ZnO, utilisant trois types de tensioactifs différents. La mesure de la viscosité a montré que toutes les émulsions ont un comportement thixotrope. C'est-à-dire que sous l'effet d'une contrainte constante, la viscosité apparente diminue au cours du temps. Après ajout des nanoparticules, le comportement des systèmes est très similaire à celui des émulsions de base ; elles montrent en effet toutes un comportement rhéofluidifiant et conservent leurs propriétés de thixotropie. Notons que l'addition de nanoparticules a pour conséquence d'augmenter leur viscosité. Après un stockage à haute température, deux émulsions sur trois montrent une diminution de viscosité ce qui indique l'instabilité de l'émulsion. La formulation la plus stable est celle obtenue avec le système cationique, cependant aucune explication n'a été fournie par les auteurs.

b) Vieillissement de crèmes commerciales

Les propriétés d'un écran solaire appliqué sur la peau peuvent être modifiées en raison de l'immersion dans l'eau, du rayonnement UV, de la température, de l'humidité ou encore à la

suite de l'abrasion sur une plage de sable, menant ainsi à la libération de résidus dans le système aquatique. Ces résidus peuvent comprendre des nanoparticules avec des propriétés de surface et un comportement colloïdal différents de celles de la crème solaire de départ ou des nanoparticules brutes, en fonction des processus de vieillissement subis. Extrêmement peu de travaux ont été menés sur le rejet de nanomatériaux issus de crèmes solaires dans l'environnement au cours leur cycle de vie. L'étude de Botta et *al*. 2011 s'est intéressée à l'évolution physico-chimique de crèmes solaires commerciales, ayant été soumises à un vieillissement artificiel dans l'eau. Les crèmes qui, au départ, n'étaient pas dispersibles dans l'eau, le sont devenues au bout de 30 min : elles libèrent des particules d'une taille inférieure au micron, et de façon plus importante avec le temps. Cela suggère une modification de surface des résidus initialement hydrophobes, dont la dispersion est ensuite possible en milieu aqueux. A chacune des étapes du cycle de vie d'une crème solaire contenant des nanoparticules, de nombreux paramètres entrent en ligne de compte. Le relargage des nanoparticules sera différent selon différents paramètres : sous forme de poudre, en solution, déposées sur une surface ou intégrées dans une matrice comme une formulation cosmétique ; les conditions de production et de gestion des déchets ou encore le milieu environnant (air, eau, sol). Il reste sur ce point un important travail à réaliser afin de comprendre d'une part les mécanismes de vieillissement des crèmes solaires contenant des nanoparticules, et d'autre part leur capacité à libérer des résidus dans l'environnement.

2.6 Une caractérisation adéquate des systèmes étudiés

Une caractérisation appropriée des nanomatériaux, seuls et dans les différents milieux dans lesquels ils évoluent, est nécessaire. Elle est importante à chacune des étapes du cycle de vie du matériau, et surtout parce que les propriétés évoluent avec les caractéristiques du milieu environnant. Les analyses de recherche doivent donc prendre en compte les modifications subies par la nanoparticule brute depuis sa production, au cours de la préparation de l'échantillon commercial jusqu'à son utilisation par le consommateur. Et bien qu'aujourd'hui la caractérisation ait été reconnue comme un aspect particulièrement important, aucune méthodologie de standardisation des analyses physico-chimiques n'a été mise en place (Jacobs, Poel & Osseweijer 2010). De nombreuses questions restent donc en suspens notamment au niveau de l'amélioration potentielle des méthodes existantes, et concernant l'influence des traitements de surface de TiO_2 au sein des produits de types écrans solaires. Ces caractérisations s'avèrent indispensables pour évaluer l'exposition des nanoparticules en émulsion, la mise en place d'études toxicologiques, et la compréhension des différents effets de toxicité. Il est donc nécessaire de pratiquer à une caractérisation physico-chimique adapté au système étudié afin d'interpréter et de pouvoir comparer les différentes études toxicologiques.

Chapitre 3 *Les problématiques de cytotoxicité des nanoparticules de TiO_2*

Les hommes ont depuis toujours été exposés aux particules ultrafines de taille nanométrique, essentiellement par voie respiratoire. Ces particules sont en effet un constituant important des fumées générées par des sources naturelles (comme les incendies ou les éruptions volcaniques) ou des sources anthropiques (les chauffages à bois ou les émissions des moteurs automobiles, par exemple). Ces particules sont connues pour leur toxicité (Hervé-Bazin 2007). Désormais, on distingue les nanomatériaux manufacturés qui ont été fabriqués intentionnellement afin d'être utilisées dans le cadre d'un processus industriel. Ils constituent aujourd'hui de nouvelles sources potentielles d'exposition et il est légitime de poser dès aujourd'hui la question de leur éventuelle toxicité pour l'homme et pour les écosystèmes. En effet, bien que constituant une avancée majeure au niveau technologique, ils suscitent des interrogations à la fois de la part de la communauté scientifique, des autorités et de la population générale vis-à-vis de la santé humaine (Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail 2006). En particulier, concernant les nanoparticules utilisées dans les produits de protection solaire, les travaux des laboratoires ont à ce jour porté principalement sur les développements technologiques visant la production de nouveaux matériaux aux caractéristiques uniques, et dont les effets sur la santé et sur l'environnement n'ont été que partiellement établis (*Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen* 2010).

Nous détaillerons dans ce chapitre les différents effets connus liées à la cytotoxicité des nanoparticules de dioxyde de titane ainsi que l'influence importante des divers paramètres physico-chimiques. Nous verrons que les nanoparticules peuvent interagir avec les milieux biologiques utilisés, et que les formulations cosmétiques sont très peu étudiées en terme de cytotoxicité. Nous terminerons l'état de l'art lié à la toxicité de ces nanomatériaux par une approche environnementale à la fin de ce chapitre.

3.1 Objectifs de la toxicologie

3.1.1 Définition

La toxicologie est la science qui étudie les effets des substances toxiques d'origine anthropique, des toxines animales, végétales ou bactériennes et des agents physiques tels que les rayonnements ionisants et les ondes électromagnétiques sur la santé des organismes. Ceci implique l'analyse des agents toxiques, l'étude de leurs voies de pénétration dans l'organisme, leur absorption et distribution tissulaire, leur métabolisme et leur excrétion, la construction éventuelle de modèles toxicodynamiques, l'étude des effets des composés toxiques ainsi des moyens de les déceler et de les combattre (Bally & Barouki 2010). Depuis la naissance de la toxicologie et, par exemple, les écrits pionniers de Paralcelse (1493-1541) affirmant que

"toutes les choses sont poison, et rien n'est sans poison ; seule la dose détermine ce qui n'est pas un poison", les effets délétères sont généralement considérés d'autant plus forts que la quantité de substance toxique incorporée par un organisme est élevée. Cette dépendance de la réponse à la dose trouve un cadre théorique standard dans les propriétés de liaison des ligands aux récepteurs biologiques, gouvernées par l'affinité moléculaire qui détermine la puissance de la substance et l'efficacité de l'activité biologique qui fixe l'effet maximal (Andersen & Barton 1998; Colquhoun 1998). Il convient néanmoins d'ajouter que, pour certaines substances et notamment pour les faibles doses, les effets toxiques n'augmentent pas strictement avec la concentration (Calabrese 2005). Dans le cas des nanomatériaux, les effets observés ne sont pas nécessairement non plus corrélés à la dose administrée. En effet, pour certains composés, à quantité égale, les effets toxiques diffèrent en fonction de la forme physico-chimique et sont parfois plus sévères dans le cas d'une exposition sous forme de particules de dimension nanométrique (Nel 2006).

3.1.2 Problématiques de toxicité des nanoparticules : un vaste sujet

De très nombreux travaux ont étudié la toxicité liée aux nanoparticules en général (pour revues Borm *et al.* 2006; Casals *et al.* 2009; Kroll *et al.* 2009) mais le manque d'homogénéité dans les paramètres examinés mène à une classification confuse et une évaluation manquant d'objectivité dans la relation dose - effet. Certaines études ont restreint leur analyse à la toxicité des nanoparticules de dioxyde de titane (pour revues Skocaj *et al.* 2011; Smijs & Pavel 2011; Valant, Iavicoli, & Drobne 2011) et ont comme conclusion que :

- les caractéristiques physiques et chimiques sont fondamentales pour expliquer l'activité biologique observée ;
- les conditions expérimentales comme la durée d'exposition, le type de lignée cellulaire ou le milieu de dispersion, peuvent modifier les réponses biologiques ;
- les dangers doivent être évalués dans des conditions probables de niveaux d'exposition : les doses sont parfois bien supérieures à celles correspondant à une exposition réelle.

Ces considérations guideront notre approche expérimentale et l'interprétation des résultats obtenus.

3.2 Voies d'expositions des écrans solaires

On distingue deux types d'exposition de la population générale aux nanomatériaux : les expositions directes et indirectes. On détaillera ces voies d'exposition dans le cadre du TiO_2 présent dans les crèmes solaires.

3.2.1 Les expositions indirectes

Les nanoparticules peuvent être relarguées dans l'environnement consécutivement à l'usure, à la dégradation ou à la fin de vie des produits. Dans ce contexte, la caractérisation des expositions humaines passe nécessairement par une compréhension préalable des phénomènes d'émission, de transport et d'accumulation dans l'environnement. Après application d'une crème solaire par exemple, le produit peut passer dans l'eau après un nettoyage ou un bain de mer, et désormais concerner l'environnement. La destruction des tubes de crèmes solaires dans des centres d'enfouissement de déchets ou par incinération peut également toucher la population générale. En l'état actuel des connaissances, on ne peut que dresser l'inventaire des voies d'exposition possibles, sans fournir de premiers éléments quantitatifs d'exposition humaine et de risque sanitaire corrélé (*RAPPORT Afsset «Nanomatériaux et sécurité au travail»* 2008).

3.2.2 Les expositions directes

Les nanoparticules peuvent entrer dans l'organisme par trois voies principales : les voies respiratoire (inhalation), cutanée (absorption par la peau) et gastro-intestinale (ingestion), comme schématisé sur la Figure 15.

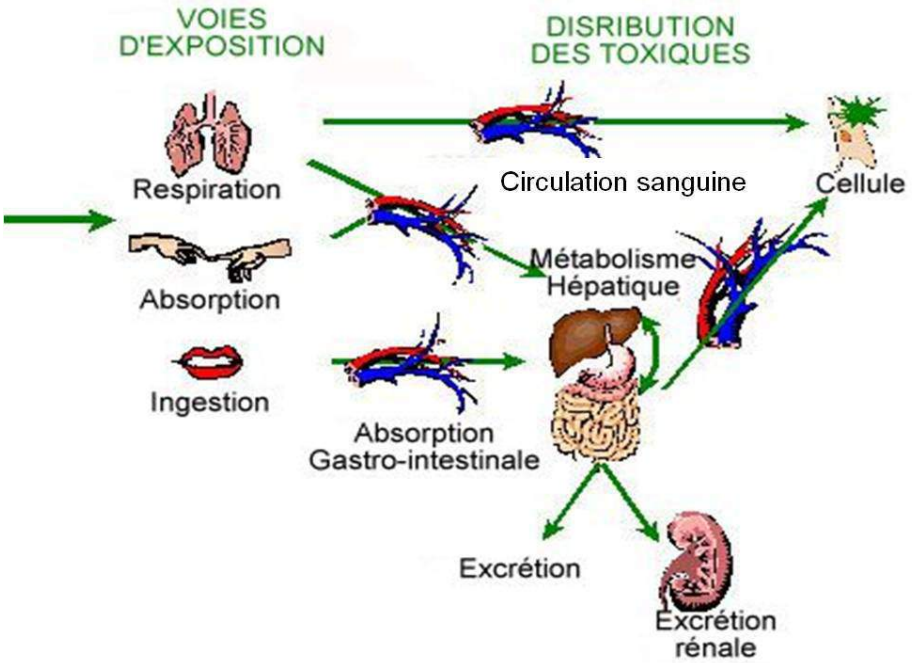


Figure 15 - Les voies d'exposition des substances toxiques et leur distribution dans l'organisme humain (El Yamani & Seret)

La voie cutanée reste la voie d'exposition majoritaire pour les produits cosmétiques de protection solaire. Toutefois, lors de l'utilisation de sprays aérosols, il peut être opportun de considérer la voie respiratoire comme une voie d'exposition possible.

De nombreuses études se sont intéressées à la toxicité des nanoparticules de TiO_2 au travers de la barrière cutanée. Une grande partie d'entre elles n'ont pas observé de pénétration ni d'absorption de ces nanoparticules. En effet, Durand et al. 2009 observent une très faible pénétration des filtres organiques présents dans des émulsions eau dans huile à travers des échantillons de peau humaine et aucune pénétration pour les films inorganiques. Gamer, Leibold, & Van Ravenzwaay 2006 ont examiné chez le porc le passage à travers la peau de solutions, similaires à des formulations solaires, contenant 10% de nanoparticules de TiO_2 enrobées avec du methicone ou un mélange de methicone et de silice. Les résultats ne montrent pas de passage des différentes nanoparticules à travers la couche cornée de la peau. Ces deux résultats suggèrent une faible probabilité d'absorption du TiO_2 nanoparticulaire au-delà du derme et donc inspirent peu de risque quant à son transport dans la circulation sanguine.

Néanmoins, l'étude de Sadrieh *et al.* 2010, qui est à ce jour celle retenue par l'Afssaps pour l'analyse de la pénétration cutanée des nanoparticules de TiO_2, conclut à une présence de fortes quantités de TiO_2 de tailles submicroniques (300-500 nm) enrobées et non enrobées dans le *stratum corneum*. Quelques particules isolées de TiO_2 ont également été retrouvées dans le derme pour les animaux traités avec ces particules. D'autres travaux montrent que des particules de TiO_2 submicroniques ont pénétré l'espace intercellulaire du *stratum granulosum* au sein du *stratum corneum*, 8h après application. Cette pénétration des écrans solaires contenant ces filtres UV physiques pourrait ainsi provoquer des allergies (Menzel *et al.* 2004). De plus, il apparait que le milieu dans lequel sont dispersées les nanoparticules est important : le TiO_2 dispersé dans une phase grasse pénètre plus profondément dans la peau qu'une dispersion aqueuse (Bennat & Muller-Goymann 2000).

De plus, concernant la peau abimée, il est probable que toute lésion de la peau de nature pathologique ou d'origine exogène puisse favoriser l'absorption des nanoparticules. Dans le cadre du projet Nanoderm (Butz 2007), la pénétration des nanoparticules de TiO_2 contenues dans des crèmes solaires commerciales est plus profonde au niveau du *stratum corneum* sur peau psoriasique que sur peau saine.

L'étude de Newman, Stotland, & Ellis 2009 examine en détail les résultats des nombreuses études d'absorption cutanée des filtres organiques. Bien que les travaux passés en revue suggèrent que les particules de dioxyde de titane (et d'oxyde de zinc) de taille nanométrique ne pénètrent pas dans le *stratum corneum*, ils ne permettent pas de conclure avec certitude que ces particules dans les écrans solaires ne posent aucun risque d'utilisation. De plus, dans toutes les études *in vivo*, il est nécessaire de considérer avec précaution les différents résultats en fonction du modèle de perméabilité cutanée utilisé : la pénétration au travers d'une peau de

lapin est plus grande que celle du rat, qui est elle-même plus grande que celle du porc, et de celle de l'homme. Enfin, les données sur la pénétration de la peau des nanoparticules de TiO_2 lors d'une exposition aux UV à long terme ou répétée, qui est en fait caractéristique de l'exposition dans la vie réelle, sont insuffisantes.

Ces quelques études demeurent donc insuffisantes pour conclure précisément sur les expositions par voie cutanée. Toutefois, si une absorption est possible, il est alors nécessaire d'envisager que ces particules puissent se retrouver dans le sang après avoir franchi les mécanismes de protection cutanée, et ainsi se distribuer dans les différents organes et s'accumuler dans certains sites spécifiques. La cytotoxicité de ces objets de très petite taille est donc nécessairement à étudier de très près.

3.3 Cytotoxicité des nanoparticules de dioxyde de titane

3.3.1 Quelques notions simples de biologie cellulaire

a) Définition de la cellule et de ses principaux composants

La cellule est l'unité de structure, fonctionnelle et/ou reproductrice constituant toute partie d'un organisme vivant. Toutes les cellules possèdent un matériel génétique et sont délimitées par une membrane. Alors que les cellules procaryotes ont leur propre matériel génétique libre dans la cellule et sont dépourvues de noyau (comme la bactérie *Escherichia coli* par exemple), les cellules eucaryotes sont compartimentées par un système endomembranaire. Dans ce cas, le milieu intracellulaire se compose donc d'un liquide appelé cytosol, contenant des édifices protéiques libres, parfois de grande taille comme le cytosquelette ou les ribosomes, ainsi que d'organites subcellulaires délimitées comme les mitochondries ou le noyau qui contient le matériel génétique. La membrane plasmique est composée de phospholipides amphiphiles, de protéines et de cholestérol organisés en une bicouche lipidique. Des récepteurs présents dans la membrane vont pouvoir reconnaitre certains signaux extérieurs et permettre à la cellule d'évoluer en réponse aux modifications de l'environnement (Lodish *et al.* 2005).

b) Le transport membranaire

Des échanges entre la cellule et le milieu extérieur se font soit par diffusion passive des molécules, soit par transport actif. Les molécules hydrophobes peuvent traverser la double couche par un mouvement spontané vers l'équilibre sans apport d'énergie, dans le sens du gradient de concentration : c'est un transport passif ; il s'effectue par diffusion simple. La membrane plasmique ne permet pas la diffusion passive de molécules polaires. Cependant, elle est néanmoins sélectivement perméable à un certain nombre de composés polaires nécessaires au maintien de l'activité cellulaire et de la croissance, et à des métabolites inutiles ou toxiques. Elle effectue ces échanges au travers de la membrane grâce au transport transmembranaire, via une diffusion facilitée ou à travers des pores aqueux (canaux) ou un

transport actif. Le transport actif repose sur une activité enzymatique portée par des protéines qui utilisent l'énergie produite par la cellule. Enfin, l'endocytose et l'exocytose sont également d'autres mécanismes de transport impliqués dans les échanges transmembranaires. L'endocytose se produit par invagination de la membrane plasmique : elle capture des éléments pour former des vésicules que l'on retrouve à l'intérieur de la cellule. Elle peut être de deux types : la phagocytose, qui correspond à la capture de particules solides plus ou moins grosses et la pinocytose qui est la capture de petites quantités de liquide extra cellulaire. L'exocytose, en revanche, permet aux substances intracellulaires d'être déversées dans le milieu extra cellulaire. Les produits à rejeter sont emprisonnés dans des vacuoles puis déversés hors de la cellule (Yeagle 2009).

c) Le cycle cellulaire

Certaines cellules de notre organisme se divisent, pour former deux cellules filles ayant les mêmes caractères morphologiques et physiologiques que la cellule mère. En se reproduisant elle transmet l'intégralité de son matériel génétique, l'ADN. Le cycle cellulaire est constitué de quatre phases successives : les phases G1, S, G2 (l'interphase) et M (mitose). La cellule grossit et duplique son matériel génétique durant l'interphase et se divise au cours de la mitose.

d) La mort cellulaire

Les mécanismes de mort cellulaires sont nombreux, à tel point qu'un Comité de Nomenclature sur la Mort Cellulaire (NCCD) s'est constitué en 2005 (Kroemer *et al.* 2008). Une cellule qui est engagée dans un processus de mort connaît un certain nombre de changements fonctionnels (processus physiologique ou pathologique, mort programmée ou accidentelle), morphologiques (gonflement ou condensation), enzymatiques (apparition d'activités enzymatiques de types caspase, calpaïne, cathepsine ou transglutaminase) ou encore immunologiques (réponse inflammatoire ou non). Finalement, le NCCD propose de retenir trois mécanismes responsables de la mort cellulaire : la nécrose, l'apoptose et la cornification, et de prendre en considération l'autophagie. L'ensemble de ces phénomènes relèvent de la Mort Cellulaire Programmée (MCP) au sens où chacun d'entre eux repose sur une signalisation particulière, une exécution progressive contrôlée et l'expression de gènes spécifiquement à l'origine d'une activité catabolique.

La cornification est une forme de MCP très spécifique qui correspond aux dernières étapes de la différenciation de cellules de l'épiderme. Ce processus aboutit à la desquamation des cornéocytes, forme morte des kératinocytes, à laquelle participent notamment des transglutaminases (Candi, Schmidt & Melino 2005).

La nécrose est le processus le plus ambigu dans la mesure où ce terme est utilisé à la fois pour désigner une mort cellulaire accidentelle liée à des dommages physiques importants (calcination, action des détergents, osmolyse) et une forme de MCP caractérisée par un

gonflement – et finalement l'éclatement – de la cellule et des organites, l'activation de protéases distinctes des caspases (comme la calpaïne et la cathepsine) et une activité sérine/thréonine kinase spécifique (Duprez *et al.* 2009). Certains auteurs préfèrent donc parler de nécroptose pour désigner la MCP nécrotique. Parmi les divers stimuli qui déclenchent la nécroptose on trouve des signaux libérés par les cellules de l'immunité, certains constituants des parois bactériennes et le stress oxydant (Kroemer *et al.* 2008). La nécrose accidentelle induit toujours une inflammation.

L'apoptose est la forme la plus documentée de MCP, souvent présentée par opposition à la nécrose. Lors de l'apoptose le noyau se condense, puis l'ADN est clivé en fragments réguliers (Wyllie *et al.* 1984). La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son environnement notamment grâce au changement de localisation des phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire. La mitochondrie de la cellule apoptotique va subir plusieurs modifications biochimiques majeures (Yang *et al.*; Kluck *et al.* 1997). L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée, ce qui modère le processus inflammatoire. L'apoptose peut être déclenchée par des signaux extrinsèques à la cellule, libérés par les cellules immunitaires, mais aussi par voie intrinsèque notamment en cas de dommages à l'ADN occasionné par des agents cytotoxiques (Zhivotovsky & Orrenius 2010).

3.3.2 Les mesures de toxicité cellulaire à court terme in vitro

La toxicité cellulaire ou cytotoxicité est la propriété qu'a une substance d'altérer les cellules (Zucco *et al.* 2004). Elle est mise en évidence à l'aide de tests mesurant directement les réponses fonctionnelles des cellules ou, plus indirectement, des modifications de l'expression, de la localisation et de la structure des molécules biologiques considérées comme des marqueurs moléculaires de toxicité. Les tests de toxicité cellulaire peuvent mettre en évidence des effets aigus, induisant une mort cellulaire rapide, et des effets subaigus, à l'origine de modifications des fonctions cellulaires (Yang, Cardona & Barile 2002). Les résultats obtenus à l'échelle cellulaire pour une substance toxique ont une certaine valeur prédictive en toxicologie humaine (Evans *et al.* 2001), selon le "concept de cytotoxicité fondamentale" proposé par Björn Ekwall en 1983. Ce concept stipule que, pour la plupart des substances, la toxicité est la conséquence d'altérations non spécifiques des fonctions cellulaires. Evaluer le potentiel cytotoxique d'un composé doit donc donner des indications sur son potentiel toxique *in vivo* (Ekwall 1983). En outre, les études de cytotoxicité permettent, dans une démarche mécanistique, de disséquer la succession des effets biophysicochimiques qui conduisent de la modification moléculaire initiale au dysfonctionnement fonctionnel général de la cellule. Les résultats obtenus participent à la compréhension des mécanismes toxiques en complément de

l'analyse toxicologique qui doit être conduite *in vivo*. Il convient néanmoins d'être prudent concernant cette dimension prédictive : en effet une substance cytotoxique *in vitro* ne sera pas nécessairement toxique sur l'organisme. L'eau par exemple, induit un stress osmotique létal sur les cellules isolées. La dioxine est également un exemple de composé qui s'est avéré très toxique chez le rat mais beaucoup moins chez l'homme (Birnbaum 1994). En matière de cytotoxicité, comme en toxicité, le choix de l'essai est le facteur le plus important qui conditionne l'interprétation des données obtenues à partir des tests de viabilité cellulaire *in vitro* (Pohjala *et al.* 2007).

Les essais de toxicité *in vitro* évaluent l'interaction entre les substances chimiques à tester et la préparation utilisée (organe isolé, modèle histotypique ou cellules en culture) à partir d'une réponse biologique. Ils sont principalement employés pour identifier les produits chimiques potentiellement dangereux et/ou confirmer l'absence de certaines propriétés toxiques dans le développement de nouvelles substances comme les médicaments, des produits chimiques agricoles, des additifs alimentaires ou des substances cosmétiques. Ces expérimentations *in vitro* constituent une alternative à l'expérimentation animale, sans s'y substituer, s'avérant moins complexe, plus aisément répétables, plus rapides et moins couteux à mettre en place.

3.3.3 Réponses cellulaires aux nanoparticules de TiO_2

La littérature scientifique propose de nombreux travaux décrivant différents effets des nanoparticules de TiO_2 sur cellules de mammifères revus récemment dans Iavicoli *et al.* 2011 et partiellement détaillés ci-dessous. Cependant toutes les études citées diffèrent dans les préparations biologiques, les concentrations et les durées d'expositions utilisées ainsi qu'en termes de réponses mesurées. Le manque et l'inhomogénéité des paramètres physico-chimiques examinés dans les différentes études conduit à une appréciation globale des résultats difficile. On présentera donc dans cette partie les différents effets biologiques qui sont couramment analysés dans le cas d'études de cytotoxicité. Cependant dans la majorité des études citées dans cette partie, les particules de dioxyde de titane sont rarement, sauf mention contraire, des nanoparticules de grade cosmétique, et sont parfois même relativement peu caractérisées en surface.

a) Etudes de survie/prolifération cellulaire

Les effets cytotoxiques aigus se traduisent par une altération de la survie des cellules quiescentes. Les effets toxiques sont fréquemment perceptibles sous forme d'une inhibition de la prolifération cellulaire. Diverses études ont été menées sur différentes lignées cellulaires comme les cellules respiratoires (A549 et H1299) (Tedja *et al.* 2011), nerveuses (PC12) (Liu *et al.* 2010), de peau (L929) (Jin *et al.* 2008), ou encore sanguines (MDM et MDDC) (Rothen-Rutishauser *et al.* 2007) et intestinales (Caco-2) (Fisichella *et al.* 2012). En fonction des études, il apparaît ou non une inhibition de la prolifération cellulaire en fonction des propriétés des

nanoparticules de TiO_2. Les études de viabilité cellulaire sont généralement complétées par d'autres tests de cytotoxicité.

b) Stress oxydant

Le stress oxydant est un type d'agression des constituants de la cellule, dû aux espèces réactives oxygénées (ou encore ROS pour *Reactive Oxygen Species*). Les ROS sont des espèces chimiques extrêmement réactives regroupant les radicaux libres possédant un électron célibataire non apparié (les radicaux hydroxyl $HO^{\cdot}$ ou alkoxyl $RO^{\cdot}$ par exemple) et également des dérivés non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène par exemple.

En effet, l'introduction d'espèces hautement réactives dans la cellule ou dans un organe, comme les nanoparticules, peut générer un stress oxydant. Si ces espèces sont nombreuses, les cellules n'arrivent plus à les traiter et peuvent libérer leurs oxydants dans l'organisme en provoquant une réaction inflammatoire exacerbée. L'étude de Jiang *et al.* 2008 a évalué la relation entre certaines propriétés physico-chimiques des nanoparticules de TiO_2 (taille, surface d'activité, forme cristalline) et le potentiel de génération d'un stress oxydant. La forte activité de génération d'espèces réactives, observée pour les particules de 30 nm semblerait être corrélée aux propriétés photocatalytiques du TiO_2. Sous irradiation UV, les nanoparticules de TiO_2 produisent différentes quantités de radicaux hydroxyles en fonction de leur structure cristalline et leur taille (Uchino *et al.* 2002). Il semble en effet que plus la particule est petite, et plus elle va créer des dommages oxydatifs (Gurr *et al.* 2005).

c) Réponse inflammatoire

Un des effets notés suite à une exposition aux nanoparticules de dioxyde de titane est la réponse inflammatoire. Elle correspond à l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. Des facteurs pro inflammatoires activent les cellules immunitaires à l'origine de l'inflammation. Palomäki *et al.* 2010 ont indiqué que le TiO_2 pur et enrobé de silice induisait une expression accrue des cytokines pro-inflammatoires dans les cellules dendritiques et dans les macrophages de souris. Durant une courte exposition, le TiO_2 active les leucocytes neutrophiles et modifient leur forme, tandis qu'après une plus longue exposition, il y a inhibition de l'apoptose et de la production de cytokines.

d) Génotoxicité et mutagénicité

La génotoxicité d'un produit chimique est une toxicité qui s'exerce sur le matériel génétique des cellules. Un produit génotoxique va donc provoquer des dommages à l'ADN. La conséquence essentielle de la génotoxicité des molécules est une augmentation des anomalies héréditaires (mutagenèse germinale) et de la fréquence des cancers (appelée cancérogenèse). La mutagénicité correspond à l'induction de modifications permanentes transmissibles dans la quantité ou la structure du matériel génétique de cellules ou d'organismes. Ces modifications peuvent intervenir sur un seul gène, un ensemble de gènes ou sur des chromosomes. Les

mutations peuvent donc affecter l'organisme par modification des cellules somatiques ou être transmises à la descendance en raison des lésions induites au niveau des cellules sexuelles. La génotoxicité précède ainsi la mutagénicité, mais la plupart des lésions génotoxiques sont réparées et ne sont jamais exprimées sous forme de mutations. Les résultats d'études de génotoxicité de nanoparticules sont parfois contradictoires. Par exemple, selon certains auteurs, aucune des particules de dioxyde de titane testées n'induit d'aberrations chromosomiques en l'absence ou en présence d'UV : elles ne présentent pas de génotoxicité (Theogaraj *et al.* 2007). D'autre part, les particules de TiO_2 seraient dépourvues d'activité mutagène dans les essais de mutation microbienne (Warheit *et al.* 2007). Précédemment, Dunford, Salinaro, & Cai 1997 avaient au contraire signalé de graves dommages à l'ADN plasmidique et à l'ADN nucléaire dans des fibroblastes humains avec des nanoparticules de TiO_2 extraites de lotions solaires.

e) Internalisation cellulaire

Afin de comprendre leurs mécanismes d'action, la localisation de nanoparticules en interaction avec des cellules a été étudiée (Simon-Deckers *et al.* 2008). La membrane cellulaire forme une barrière exerçant un contrôle du transfert transmembranaire des composés hydrophiles, naturellement imperméabilisants dans les bicouches lipidiques. Les molécules de petites tailles peuvent emprunter des transporteurs enzymatiques ou des pores passifs pour pénétrer dans les cellules. Les macromolécules ou particules polaires peuvent être internalisées par endocytose. Dans une étude, le TiO_2 a été trouvé à l'intérieur des cellules, sous plusieurs formes : en tant que gros agrégats liés à la membrane, ou sous forme d'agrégats plus petits et libres ou encore sous forme de particules individuelles dans le cytoplasme (Rothen-Rutishauser *et al.* 2007). En particulier il a été localisé par fluorescence (Xia *et al.* 2008).

3.4 Nécessité de corrélation avec propriétés physico-chimiques

En termes d'évaluation générale de toxicité, la composition chimique est classiquement le principal élément déterminant la toxicité d'un composé. Dans le cas des nanoparticules, la prise en compte des propriétés singulières liées à la dimension nanométrique, est nécessaire à l'estimation de la toxicité. De très nombreuses études se sont penchées sur le sujet, sans pour autant clarifier complètement la situation de ces nouveaux matériaux. Elles permettent néanmoins de penser que les facteurs suivants seraient impliqués dans des effets toxicologiques des nanoparticules manufacturées : la taille, l'aire et la réactivité de surface, la forme, la solubilité, la capacité à former des agrégats ou des agglomérats, le traitement de surface, la structure, les méthodes de fabrication et enfin le vieillissement de ces nanoparticules manufacturées. Ces facteurs peuvent aussi interagir entre eux et modifier l'effet biologique d'une nanoparticule manufacturée donnée. Nous expliquerons ici en quoi chacun des facteurs suivants influencent la réponse cytotoxique des nanoparticules de TiO_2.

3.4.1 Taille

Historiquement et naturellement, la taille a été le premier facteur considéré pour la toxicité des nanoparticules. La taille nanométrique confère des propriétés physico-chimiques différentes pouvant rendre des particules du point de vue biologique. Du fait de leur petite taille, les nanoparticules peuvent franchir les barrières biologiques de protection, atteindre des régions de l'organisme auxquelles les particules plus grosses n'ont pas accès et pénétrer à l'intérieur des cellules plus facilement (Oberdörster, Oberdörster & Oberdörster 2005).

3.4.2 Aire et réactivité de surface

Différentes études se sont intéressées au rôle de la surface dans les effets toxiques des nanoparticules manufacturées. Lorsqu'on évalue les relations dose-effet correspondantes de particules de tailles notablement différentes, c'est le paramètre surface qui semble le plus pertinent, plutôt que celui de la masse (Sager & Castranova 2009). Parmi les caractéristiques de surface les plus impliquées dans la toxicité des nanoparticules qui jouent un rôle important dans la réaction biologique, on peut distinguer le caractère hydrophile ou hydrophobe qui régit l'adsorption des macromolécules, les sites de surface capables de former de fortes liaisons hydrogène, notamment avec des particules d'oxydes métalliques, les sites de surface qui réagissent avec les molécules antioxydantes comme l'acide ascorbique ou le glutathion, défenses naturelles contre le stress oxydant, ou encore les charges de surface liées à la présence d'espèce ioniques (Hervé-Bazin 2007).

3.4.3 Structure cristalline

La structure cristalline influence également la cytotoxicité : la forme anatase du TiO_2 est cent fois plus cytotoxique que la forme rutile (Sayes *et al.* 2006). Elle perturbe l'intégrité de la membrane cellulaire, et cause une mort cellulaire par nécrose, tandis que le rutile induit de l'apoptose. Cette différence de toxicité entre les deux formes cristallines est liée à la capacité de générer des ROS (Braydich-Stolle *et al.* 2008).

3.4.4 Agrégation et/ou agglomération

L'état d'agrégation ou d'agglomération des nanoparticules (cf. définition 2.1 p.51 et propriétés 2.3.3c) p.61) modifie leur absorption par l'organisme et leur internalisation par les cellules. Ce constat se traduit par des effets biologiques qui peuvent exister mais différer de ceux décrits avec des particules idéalement dispersées, alors même alors que les matériaux ne présentent plus de dimension nanométrique dans la matrice biologique. Ainsi, les travaux de Tedja *et al.* (2011) indiquent que les agrégats de taille micrométriques sont plus facilement absorbés par les cellules que des agrégats submicroniques et ont donc, un impact biologique plus important. Des particules plus grosses, en raison de leur taux de sédimentation plus rapide, sont plus longtemps au contact avec les cellules dans le milieu de culture, et vont donc être

préférentiellement absorbées. Dans une autre étude, il est rapporté que de gros agrégats de dioxyde de titane montrent un plus grand effet sur la viabilité cellulaire et l'expression de certains gènes, que de plus petits agrégats (Okuda-Shimazaki *et al.* 2010). Ainsi, même agglomérées des nanoparticules de TiO_2, préparées en suspension dans le milieu de culture, déclenchent des réactions inflammatoires (Singh *et al.* 2007) comparables à celles causées par du TiO_2 nanométrique non aggloméré, et ces effets sont interprétés par leurs auteurs comme trouvant leur origine dans l'importante surface spécifique du matériau.

3.4.5 Effet du traitement de surface

Les traitements de surface modifient fondamentalement la nature de l'interface entre les nanoparticules de TiO_2 et l'environnement ou un organisme. Warheit *et al.* 2005 ont comparé la toxicité pulmonaire aiguë de nanoparticules de TiO_2 enrobées et non enrobées. L'administration intra-trachéale de concentrations élevées de nanoparticules non enrobées induit une réponse inflammatoire pulmonaire, alors que cette réponse n'est pas observée avec une concentration similaire de nanoparticules enrobées. Un résultat identique a été observé pour des particules de TiO_2 ayant un revêtement de silane hydrophobe par rapport au TiO_2 non traité hydrophile (Oberdörster 2001). Serpone, Dondi, & Albini 2007 mettent en évidence que le traitement de surface réduit l'activité de surface du dioxyde de titane et réduit ainsi la toxicité due à la génération de ROS après photoactivation par rayonnement UV dans le cas de particules de TiO_2 extraits de crèmes solaires commerciales. Ces modifications de surface ont donc un impact majeur sur la toxicité ou l'innocuité des nanoparticules. Cependant très peu d'études *in vitro* se sont intéressées à l'effet cytotoxique du traitement de surface. Des travaux suggèrent néanmoins que le dioxyde de titane enrobé présente une toxicité cellulaire plus faible que le dioxyde de titane non traité (Uchino, Ikarashi & Nishimura 2011). La principale cause des effets observés dans cette étude est liée à la présence de dioxyde de titane non enrobé dans le cytosol des cellules. Cela suggère que des particules non enrobées sont présentes dans la préparation d'origine ou que certaines particules perdent leur traitement de surface au cours de l'exposition biologique. C'est en effet un point extrêmement important qui s'avèrera fondamental dans notre travail. Il apparaît également que les dommages les plus importants au niveau de l'ADN se produisent dans les cellules exposées à des nanoparticules de TiO_2 non enrobées (Hamzeh & Sunahara 2013). Il est également montré que le TiO_2 non enrobé stimule davantage la production de ROS que le TiO_2 enrobé de polyacrylate (Hamzeh & Sunahara 2013). Le traitement de surface semblerait dans chacun des cas être à l'origine d'une réduction de la toxicité cellulaire des nanoparticules de TiO_2. Il est très probable que la couche d'hydroxyde d'aluminium utilisée dans de nombreux traitements de surface protège les cellules d'un contact direct avec le noyau d'oxyde métallique de la nanoparticule de TiO_2 (Fisichella *et al.* 2012).

3.4.6 Vieillissement des nanoparticules

On ne sait pas encore ni comment, ni dans quelles quantités, ni sous quelle forme sont libérées les nanoparticules dans l'environnement. Le cycle de vie du produit est fondamental et met en jeu des transformations majeures : la fabrication du produit fini peut profondément modifier les nanoparticules brutes de départ. Il en est de même de l'utilisation et du vieillissement du produit, et également de sa fin de vie comme par exemple l'incinération des ordures ménagères. Extrêmement peu de travaux se sont intéressés au vieillissement de produits contenant des nanoparticules de TiO_2. Une étude a été menée sur les émissions à partir de produits finis contenant du dioxyde de titane et a examiné la possibilité d'émission de particules à partir de matériaux de revêtement contenant du TiO_2 nanométrique sous plusieurs conditions de vieillissement (Hsu & Chein 2007). Il s'est avéré que la force de liaison entre le TiO_2 et la surface du substrat pouvait diminuer et, par conséquent, l'émission de particules libérées des revêtements pouvait être effective.

Bien que la toxicité des nanoparticules de TiO_2 non modifiées en surface ait été largement documentée, très peu d'études ont été menées sur des particules dégradées, qui sont cependant les plus susceptibles d'être rencontrées dans l'environnement. Nous avons donc très peu de recul concernant l'influence du vieillissement des nanoparticules sur leurs effets toxiques. A notre connaissance, une seule étude a montré que la production d'espèces réactives de l'oxygène est détectée avec des nanoparticules de TiO_2 non modifiées mais pas dans le cas de nanoparticules enrobées ou enrobées dégradées (Fisichella *et al.* 2012). Dans cette étude, les nanoparticules de TiO_2 modifiées en surface, dégradées ou non, ne sont pas nocives pour les cellules et sont peu susceptibles de pénétrer dans l'organisme. La morphologie des cellules reste intacte, et l'internalisation des nanoparticules modifiées n'a pas été constatée. Par ailleurs il n'a pas été constaté de modification dans l'analyse d'expression génique même à des expositions plus élevées que les concentrations environnementales potentielles.

3.5 Interactions avec le milieu biologique

3.5.1 Interaction avec le milieu de culture

La concentration des particules, la force ionique et la présence de protéines sont des facteurs qui influent sur la stabilité colloïdale des nanoparticules de TiO_2 dans un milieu de culture cellulaire, comme le RPMI. Dans du RPMI sans protéines les nanoparticules s'agglomèrent et sédimentent rapidement (Murdock *et al.* 2008), tandis que la présence de sérum de veau fœtal ou d'albumine renforce la stabilité des nanoparticules en suspension, et améliore la dispersion des particules dans le milieu de culture (Allouni *et al.* 2009). Dans ce cas, il se produit également un phénomène d'adsorption des protéines à la surface des nanoparticules, ce qui

entraîne une modification de la taille de la particule et une modification de son potentiel zêta (Ehrenberg *et al.* 2009). Cette couronne protéique ou « corona » qui se forme autour des particules, est en mesure de moduler les réponses cellulaires, modifier les capacités de la particule à interférer avec les tissus et influencer les réponses biologiques (Lundqvist *et al.* 2008).

3.5.2 Interférences lors de l'évaluation des effets biologiques

Les propriétés de surface des nanoparticules peuvent aussi interférer avec les méthodes d'évaluation des effets biologiques induits : le MTT, (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) par exemple, un réactif couramment utilisé dans les tests de viabilité cellulaire, peut s'adsorber sur les nanoparticules et conduit à une évaluation erronée de la cytotoxicité. Il s'agit alors de vérifier que les propriétés des nanoparticules n'interfèrent pas avec le dispositif utilisé pour la mesure (fluorescence, absorbance). Il a en effet été démontré que certains nanomatériaux pouvaient interférer avec le MTT ou le rouge neutre (Monteiro-Riviere, Inman & Zhang 2009). Ces indicateurs colorés ont conduit à des faux-positifs lors de l'évaluation avec des nanomatériaux carbonés, mais ont donné des résultats fiables avec les quanta dots : ces phénomènes d'interférence ne seraient pas liés à une perturbation de l'activité enzymatique, mais plutôt à la nature insoluble du MTT-formazan. Les nanomatériaux se lient aux cristaux de formazan et stabilisent leur structure chimique, empêchant ainsi l'étape de solubilisation, et pouvant mener à une surestimation de cytotoxicité (Wörle-Knirsch, Pulskamp & Krug 2006). De plus, les conditions particulières de milieux d'exposition sont à maîtriser, car certains ingrédients chimiques peuvent ne pas se solubiliser dans le milieu de culture, ou fausser les résultats du fait notamment de leur forte viscosité (Zanatta *et al.* 2008).

3.6 Toxicité de formulations cosmétiques

3.6.1 Evaluations de la toxicité et de la sécurité des produits cosmétiques

Les produits cosmétiques relèvent d'une directive européenne spécifique depuis 1976 (76/768/CEE). La réglementation ne prévoit pas d'autorisation préalable à la mise sur le marché mais impose aux responsables de garantir l'innocuité de leur produit comme le précise le *Rapport d'évaluation de la sécurité des produits cosmétiques destinés aux enfants de moins de trois ans* 2010 de l'Afsapps (Agence française de sécurité sanitaire des Produits de santé). Le fabricant doit donc constituer un dossier cosmétique à tenir à disposition des autorités de contrôle. Ce dossier comporte tous les éléments nécessaires relatifs à l'identité, à la qualité, à la sécurité pour la santé humaine et aux effets revendiqués par le produit cosmétique. Ces informations sur le produit doivent en particulier inclure un rapport sur la sécurité du produit cosmétique démontrant qu'une évaluation de la sécurité a été effectuée. Chaque produit cosmétique est considéré comme la résultante d'une combinaison d'ingrédients. C'est pourquoi, l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine du produit fini, est établie

notamment en prenant en considération la structure chimique des ingrédients, leur profil toxicologique général et leur niveau d'exposition ainsi que les caractéristiques spécifiques des zones corporelles sur lesquelles le produit sera appliqué ou de la population à laquelle il est destiné, comme le précise le rapport des *Recommandations aux fabricants ou aux responsables de la mise sur le marché relatives à l'évaluation de la sécurité pour la santé humaine d'un ingrédient ou d'une combinaison d'ingrédients à usage cosmétique*, un guide de « Bonnes Pratiques d'Evaluation » de l'Afsapps.

Le contexte actuel des exigences toxicologiques réglementaires interdit l'expérimentation animale depuis le 11 septembre 2004 pour les produits finis et depuis le 11 mars 2009 pour les ingrédients. La commercialisation de produit cosmétique contenant un ou plusieurs ingrédients testés sur animaux pour les essais de toxicité réitérée, toxicocinétique et reprotoxicité n'est plus autorisée depuis le 11 mars 2013. Les méthodes alternatives à l'expérimentation animale validées sont les tests *in vitro* de corrosion et irritation cutanées, phototoxicité, absorption percutanée, génotoxicité, mutagénicité et embryotoxicité.

Une fois l'évaluation toxicologique de la formulation validée, il convient de mettre en œuvre les études cliniques sur volontaires, permettant l'évaluation de la tolérance et de l'efficacité des produits cosmétiques.

Toutes ces données d'évaluation toxicologique ne sont pas accessibles et restent confidentielles. L'étude de l'efficacité des photoprotecteurs vis à vis des effets à court terme des rayonnements UV évaluée par mesures des Facteurs de Protection Solaire, à l'aide de méthodologies *in vitro* et/ou *in vivo*, dans le cas de formulations cosmétiques solaires est plus répandue (Moyal, Chardon & Kollias 2000; Bendová *et al.* 2007; Garoli *et al.* 2008).

3.6.2 Cytotoxicité de formulations cosmétiques

Très peu d'études dans la littérature ont évalué la cytotoxicité d'émulsions. Lance, Washington & Davis 1995 ont étudié la relation entre la toxicité *in vitro* de formulations d'émulsions à base d'amphotéricine B et de triglycérides, leur composition en phospholipides et la méthode de fabrication. La toxicité de l'émulsion s'est avérée être dépendante de la composition et la température de transition de phase de l'émulsifiant.

Zanatta *et al.* 2008 ont travaillé avec des crèmes et lotions, sur des gammes de concentration de 31 à 1000 mg/mL, contenant des tensioactifs afin de prédire une irritation potentielle de la peau. Le test au rouge neutre pendant une incubation de 10 min a révélé une faible cytotoxicité des émulsions étudiées et la valeur d'EC_{50} n'a pu être estimée. Il a également été montré qu'il existait des interactions entre ingrédients puisque lorsque de l'eau et un tensioactif ethoxylé étaient émulsionnés avec de l'huile de Buriti, les effets étaient moins cytotoxiques que lorsqu'ils

étaient testés seuls. Weyenberg *et al.* 2007 ont testé diverses émulsions H/E submicroniques contenant des nanoparticules lipidiques solides. La survie des macrophages a été fortement affectée par les nanoparticules composées d'acide stéarique et de stéarylamine. Le choix de la matrice lipidique et l'agent tensioactif s'est avéré indispensable en vue de formuler une préparation sûre et stable.

3.6.3 Cytotoxicité de formulation contenant des nanoparticules

La littérature est à ce jour très pauvre dans l'évaluation de la cytotoxicité de formulations type cosmétique, contenant des nanoparticules. Tous les travaux s'intéressant aux propriétés toxiques des nanoparticules ont très souvent étudié des dispersions et suspensions de nanoparticules, mais pas d'émulsions. Une étude a développé et caractérisé des formulations cosmétiques à cristaux liquides contenant des nanoparticules de dioxyde de titane (Manaia *et al.* 2012). Cependant, ils ne se sont intéressés à la cytotoxicité des nanoparticules en suspension et non pas en formulation. Le dosage au cristal violet n'a montré aucune cytotoxicité associée à la présence des nanoparticules sur les deux lignées cellulaires testées, des kératinocytes humains et des fibroblastes.

Le manque d'études pertinentes et représentatives des nanomatériaux réellement utilisés dans les produits cosmétiques ne permet pas de conclure sur l'innocuité de ces substances. Au vu de ces différents résultats, il est donc difficile d'évaluer aujourd'hui le risque lié à leur utilisation, en raison du manque de recul nécessaire, des lacunes dans les connaissances scientifiques actuelles et de l'absence de protocoles de caractérisation et de détection, validés à l'échelle internationale. La recherche doit continuer dans le domaine de la toxicologie des nanomatériaux utilisés dans les produits cosmétiques afin d'explorer les mécanismes de toxicité à long-terme.

3.7 Ouverture vers une étude d'écotoxicité

3.7.1 Définition de l'écotoxicologie

L'écotoxicologie est la science qui étudie le comportement et les effets toxiques d'agents d'origine anthropique sur les écosystèmes, ou bien d'agents de produits d'origine naturelle, dont l'homme modifie la répartition dans les différents compartiments de la biosphère et ceci en fonction de la nature de ces agents, leur concentration dans les milieux et leur rémanence. Ainsi, l'écotoxicologie étudie les mécanismes et les conséquences écologiques de la pollution à l'échelle des populations et des communautés. Une des spécificités de l'écotoxicologie est de prendre en compte, outre les polluants eux-mêmes, les différents facteurs abiotiques et biotiques et d'appréhender leurs interactions (contamination et matière organique, salinité, rayonnement UV). L'écotoxicologie couvre également des études sur des organismes dans la mesure où la compréhension de ces mécanismes aide à mieux aborder les effets sur les

populations et les communautés qui composent les écosystèmes (Bally & Barouki 2010). Les approches *in vitro* sont maintenant utilisées pour les mêmes raisons pratiques qui conduisent à les mettre en œuvre en toxicologie humaine (Isomaa & Lilius 1995; Baron *et al.* 2012). Dans un scénario d'exposition non directe, comme toute substance chimique, les nanoparticules introduites dans l'environnement peuvent par divers processus conduire à une contamination de l'air, du sol, des eaux des surfaces et souterraines, et par la suite entraîner une exposition des organismes vivants (Gottschalk & Nowack 2011). La connaissance des origines, de la composition, du comportement, des mécanismes de transfert ainsi que des transformations des nanoparticules dans l'environnement est essentielle pour évaluer les impacts environnementaux (Moore 2006).

3.7.2 La question des concentrations environnementales

En raison de l'absence d'informations sur les concentrations des nanoparticules dans l'environnement, la modélisation des concentrations environnementales est nécessaire. Mueller & Nowack 2008 ont estimé la concentration prévue dans l'environnement du TiO_2 entre 0,7 et 16 $\mu g.L^{-1}$, cependant cette analyse était limitée aux délimitations géographiques de la Suisse. Gottschalk *et al.* 2009 ont calculé la concentration environnementale, estimée sur la base d'une analyse des flux de matières probabiliste et en tenant compte du cycle de vie probable des produits contenant des nanoparticules. Les simulations permettent d'estimer des concentrations de l'ordre de 21 $ng.L^{-1}$ pour le dioxyde de titane dans les eaux de surface et à 4 $\mu g.L^{-1}$ dans les eaux usées. Le dioxyde de titane apparaît comme le matériau ayant les concentrations estimées les plus élevées, en comparaison aux fullerènes de carbone ou aux nanoparticules d'argent.

3.7.3 Bioaccumulation, bioconcentration, bioamplification

- La bioaccumulation est l'absorption d'un contaminant et son accumulation dans les tissus d'un organisme vivant. Le contaminant peut être absorbé directement à partir du milieu (eau, air, sol) ou par la consommation de proies contaminées.
- La bioconcentration est l'absorption d'un contaminant à partir du milieu ambiant et son accumulation à une concentration supérieure à celle présente dans l'environnement.
- La bioamplification (ou biomagnification) est le phénomène où les contaminants s'accumulent dans les organismes à la suite de l'ingestion d'espèces du niveau trophique précédent.

Zhu *et al.* 2010 ont apporté la preuve que les nanoparticules de TiO_2 pouvaient être transférées des daphnies au poisson-zèbre par exposition alimentaire. Par conséquent, l'apport alimentaire pourrait être une voie importante d'exposition aux nanoparticules pour les organismes

aquatiques. Le fait que les particules de TiO_2 peuvent entrer dans la chaîne alimentaire des organismes d'eau douce signifie qu'elles pourraient être transférées à l'Homme.

3.7.4 Toxicité sur les organismes aquatiques

a) Toxicité des nanoparticules de dioxyde de titane

Les études sur l'écotoxicité du TiO_2 nanométrique sont limitées à quelques études de toxicité aiguë, et pour la plupart, l'état de surface des particules n'est pas précisément détaillé en dehors du fait qu'elles sont coatées ou non. Les premiers résultats viennent de (Hund-Rinke & Simon 2006) qui ont constaté une toxicité dose -dépendante de TiO_2 pour les algues vertes (EC_{50} = 44 mg/L) , mais aucun effet lors les essais sur *Daphnia magna*. Une étude plus récente a révélé que ni le TiO_2 nanométrique ni le TiO_2 non nanométrique, même à des concentrations de 20 g/L, n'étaient toxiques pour les bactéries, ou de crustacés (Heinlaan *et al.* 2008). Il a également été montré que, indépendamment de la taille des particules, du traitement de surface, du type de milieu de dispersion, le TiO_2 montre une faible toxicité (EC_{50} > 100 mg/L) (Wiench *et al.* 2009). Une conclusion similaire a également été faites à des concentrations plus élevées telles que 500 mg/L (Zhu *et al.* 2008) .Mais de manière contradictoire, il a été montré que les nanoparticules de TiO_2 (dont le traitement de surface est inconnu) ont des effets néfastes sur la survie, la croissance et la reproduction de *Daphnia magna* après une exposition de 21 jours et que le nombre d'organismes en mesure de se reproduire diminue progressivement à mesure que la taille de TiO_2 diminue (Bang *et al.* 2011).

Selon ces études, les nanoparticules de TiO_2 semblent exercer aucune ou une faible toxicité pour les espèces aquatiques. Cependant, les tests d'écotoxicité de ces études ont été réalisés en utilisant des régimes d'exposition à court terme. Les effets chroniques et à long terme de ces particules sur les organismes aquatiques restent mal définis. Par exemple, une exposition pendant huit jours consécutifs à du TiO_2 nanométrique a provoqué une mortalité de 40% (Adams, Lyon & Alvarez 2006). Ainsi, un non effet dans les tests de toxicité aiguë peut s'avérer toxique sur période de temps prolongée.

Concernant les études *in vitro*, dans les hémocytes de la moule marine *Mytilus*, les suspensions de nanoparticules de TiO_2 stimulent des réponses immunitaires et inflammatoires, telles que la libération de lysozyme, l'accroissement du métabolisme oxydatif et la production d'oxyde nitrique (Canesi *et al.* 2010). Vevers & Jha 2008 ont démontré la génotoxicité intrinsèque et le potentiel cytotoxique du TiO_2 sur une lignée cellulaire de poissons sous l'action d'UVA. Reeves *et al.* 2008 ont montré une augmentation significative des dommages oxydatifs à l'ADN dans les cellules de poissons rouges, et ont établi que les dommages ne pouvaient pas être réparés par des mécanismes de réparation de l'ADN. Il a été montré que les cellules de poisson sont généralement plus vulnérables que celles de mammifères.

b) Toxicité du TiO_2 utilisé dans les crèmes cosmétiques

Les travaux sur les impacts environnementaux à la suite de l'utilisation du TiO_2 dans les crèmes solaires sont moins avancés que les recherches sur la santé humaine. Néanmoins, la dissémination potentielle dans l'environnement de nanoparticules manufacturées produites en masse soulève de nombreuses interrogations (Wiesner *et al.* 2006). Les rejets de TiO_2 nanométrique dans l'environnement aquatique ne seraient que de 36 à 56 tonnes par an contre 4000 à 6000 tonnes par an pour les filtres organiques (Danovaro *et al.* 2008), mais ils restent néanmoins significatifs. La particularité des nanoparticules est qu'il n'est pas envisageable d'étudier leur impact toxicologique comme celui d'autres xénobiotiques de l'environnement, tels les pesticides ou les résidus des principes actifs de médicaments. Peu de travaux ont étudié le devenir des nanoparticules de TiO_2 issus de produits de protection solaire commerciaux et vieillis. Dans l'étude de Lapied *et al.* 2011, l'écotoxicité et la tendance à la bioaccumulation ont été discutées, ainsi que l'effet potentiel sur la fréquence de l'apoptose dans différents tissus de vers de terre. Il apparait que le TiO_2 ne semble pas traverser l'épithélium intestinal pour d'atteindre les couches musculaires. Labille *et al.* 2010 ont démontré que 25% des particules de TiO_2 traitées en surface par de l'hydroxyde d'aluminium, issues de crèmes solaires, deviennent biodisponibles aux micro-organismes, tandis que les 75% restants sont probablement incorporées dans les sédiments géogéniques, où ils pourraient devenir biodisponibles pour la faune aquatique. De plus, l'irradiation solaire peut pénétrer jusqu'à 20 m dans l'eau et par conséquent photo-activer les particules dispersées dont le traitement de surface protecteur a pu être dégradé, ce qui pourrait avoir un effet défavorable sur divers organismes aquatiques (Tedetti & Sempéré 2006).

De plus, l'effet de nanomatériaux vieillis a été étudié dans un cadre environnemental. L'exposition chronique des daphnies à des résidus de nanoparticules de TiO_2 vieillis par voie alimentaire induit certes une faible mortalité mais dans le même temps une diminution de la croissance et de la reproduction, ce qui peut être en partie liée à la modification de la physiologie digestive de la daphnie (Fouqueray *et al.* 2012). Ces études démontrent que l'évaluation de l'impact écotoxicologique des nanomatériaux dans l'environnement aquatique devrait prendre davantage en compte le vieillissement de ces matériaux.

c) Importance de la caractérisation physico-chimique

Les nombreuses approches physico-chimiques qui tentent de comprendre et modéliser le comportement des nanoparticules en suspension constituent une réelle base de connaissance pour l'enjeu de la toxicologie environnementale en milieu aquatique : en effet une méconnaissance du comportement physico-chimique est susceptible de conduire à une mauvaise interprétation des données écotoxicologiques, ce qui a été le cas dans les premières études très contradictoires (Adams, Lyon & Alvarez 2006).

3.7.5 Toxicité sur les organismes du sol et dans les plantes

Les effets toxiques du TiO_2 nanométrique ont également été évalués *in vivo* sur des organismes du sol. Dans un premier cas sur des arthropodes (Drobne, Jemec & Pipan Tkalec 2009) : aucun effet délétère, tels que la mortalité, la modification du poids corporel ou la réduction d'alimentation, n'ont été observés. Au contraire, un taux d'alimentation accru, une efficacité d'absorption des aliments et une augmentation de l'activité catalase ont été observés. Dans une autre étude (Hu *et al.* 2010), le TiO_2 nanométrique semble être plus toxique pour les nématodes. Les particules de rutile peuvent être bio-accumulées dans les vers de terre, où ils induisent un stress oxydatif, inhibent l'activité de la cellulase et provoquent des lésions de l'ADN et des mitochondries.

Sur les plantes, la croissance et la génotoxicité en présence de nanoparticules vieillies n'ont montré aucun changement par rapport aux nanoparticules non vieillies. Néanmoins, en dépit de la faible réponse des paramètres biologiques, il a été révélé des concentrations élevées de titane et d'aluminium dans les racines et l'internalisation de titane dans les tissus des racines superficielles a été montrée par fluorescence (Foltête *et al.* 2011). Des éventuels effets à long terme sur les plantes peuvent donc se produire.

Les études des mécanismes de toxicité ont montré que les nanoparticules de TiO_2 induisaient des effets indésirables qui étaient principalement causés par le stress oxydatif, conduisant à des dommages cellulaires, des effets génotoxiques, et des réponses inflammatoires. Dans l'ensemble, l'exposition globale du TiO_2 nanométrique n'est pas connue, il demeure encore de nombreuses interrogations, et il est donc difficile de faire une évaluation quantitative et fiable du risque. L'un des principaux constats est qu'en raison de la polyvalence du TiO_2 en termes de taille, de forme, de traitement de surface, de structure cristalline, de sa dispersion dans un cadre biologique, aucune conclusion fiable ne semble pouvoir être tirée, puisque les différentes formes de TiO_2 peuvent agir très différemment. Par ailleurs les propriétés de ces particules peuvent être modifiées du fait des conditions environnementales, c'est pourquoi les effets observés en laboratoire sur certains organismes aquatiques peuvent être différents des effets réels pouvant survenir en milieu naturel.

Chapitre 4 *Les objectifs de la thèse*

Les nanoparticules de dioxyde de titane en poudre ou en suspension ont largement été caractérisées, que ce soit au niveau physico-chimique et au niveau de leur impact toxicologique. Il a été montré que les études toxicologiques doivent être corrélées à une caractérisation physico-chimique détaillée pour pouvoir conclure avec pertinence sur les résultats ; les caractéristiques réelles obtenues dans la matrice biologique en termes de structure, taille, composition de phase ou morphologie étant déterminantes pour l'activité biologique de ces composés. En particulier, les modifications de surface que subissent les particules constituent un paramètre extrêmement important dans l'évaluation des risques sur l'environnement et la santé humaine. D'autre part, les nanoparticules de dioxyde de titane ont été très peu étudiées lorsqu'elles sont intégrées dans un milieu physico-chimique complexe comme une formulation cosmétique. Le cas échéant, les analyses physico-chimiques sont réalisées sur des produits commerciaux dont la composition exacte n'est pas connue. Le vieillissement et la dégradation de ces systèmes sont très peu étudiés, alors que ces produits sont inévitablement voués à subir de telles modifications au cours de leur utilisation réelle.

L'objectif de cette thèse est de compléter la recherche sur les nanoparticules de TiO_2 utilisées dans les produits de protection solaire, en proposant de travailler sur la base d'une émulsion spécifiquement élaborée par nos soins. Il s'agit, dans une première étape, de caractériser par différentes techniques d'analyses physico-chimiques, l'état initial et la microstructure des émulsions contenant des nanoparticules de TiO_2 de grade cosmétique, puis de préciser les différents phénomènes de vieillissement observés et de comprendre le rôle des nanoparticules dans ces processus d'évolution. Plusieurs approches techniques, comme la rhéologie, la microscopie, la zêtamétrie ou la granulométrie, ont permis de collecter des données de caractérisation des systèmes, à l'état initial et au cours de leur évolution dans le temps afin de comprendre les mécanismes de migration des particules au sein de la formulation.

Dans une seconde étape, les nanoparticules sont extraites des formulations fraîches ou vieillies, afin de caractériser leur état de surface. Des techniques de caractérisation appropriées comme le potentiel zêta, l'analyse de surface XPS ou la spectroscopie infrarouge sont des outils nous permettant de déterminer les modifications de surface subies par les particules au cours du protocole de formulation et d'un vieillissement accéléré.

En parallèle, les propriétés toxicologiques, à la fois des émulsions et des nanoparticules extraites, sont évaluées par des tests *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines et de poisson. Les effets de ces différents systèmes sont recherchés par l'étude de viabilité cellulaire, de génotoxicité et d'embryotoxicité.

A partir de la collecte des données de caractérisations physico-chimiques et des résultats de toxicité, nous discuterons par une mise en commun de ces informations afin de dégager le principal résultat à retenir de ces travaux.

Partie 2 : Matériels et Méthodes

Dans cette partie, nous allons définir la stratégie de choix des matières premières sélectionnées, préciser les protocoles de formulation que nous avons mis en œuvre, les techniques d'analyse utilisées et les modèles cellulaires et tests de cytotoxicité choisis.

Prévention des risques lors d'une exposition professionnelle aux nanoparticules

Il est d'abord nécessaire de préciser que compte tenu des nombreuses interrogations liées à ces nouveaux matériaux, à leurs effets potentiels sur la santé et aux difficultés rencontrées pour caractériser l'exposition, une évaluation quantitative des risques s'avère, dans la majorité des situations de travail, difficile à mettre en œuvre. A l'heure actuelle, il n'a pas été défini dans les réglementations françaises et européennes de valeurs limites d'exposition professionnelle pour les nanomatériaux. En France, il existe toutefois des valeurs limites d'exposition relatives aux poussières de dioxyde de titane ; cependant ces valeurs limites ne sont pas applicables, en l'état, aux substances de quelques nanomètres (Ricaud & Witschger 2012). En 2011, le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) a établi deux valeurs limites d'exposition professionnelle pour le dioxyde de titane : 2,4 mg/m^3 pour le dioxyde de titane fin et 0,3 mg/m^3 pour le dioxyde de titane ultrafin (dont le diamètre des particules est inférieur à 100 nm).

Il convient donc, dans le laboratoire de recherche et tout au long du cycle de vie des produits, d'instaurer des procédures spécifiques de prévention des risques. En effet l'utilisation des nanoparticules, leur incorporation dans diverses matrices comme une formulation cosmétique, tout comme le nettoyage et le traitement des déchets constituent dans leur ensemble des sources d'exposition. En l'absence d'instruments et de méthodes de mesures adaptés, il convient d'évaluer qualitativement l'exposition aux nanoparticules : la prévention des risques repose principalement sur la limitation des expositions professionnelles. Il faut donc analyser chaque poste de travail et collecter les données relatives à l'exposition au cours de chaque opération de manipulation.

Ainsi, au cours des expériences de cette étude, la zone de travail de pesée des poudres de nanoparticules de TiO_2 a été clairement signalisée et délimitée. Une sorbonne de laboratoire a été spécialement réquisitionnée durant toute la durée des travaux de la thèse, et restreinte aux seuls opérateurs concernés. Une fois que les poudres ont été mises en suspensions dans des liquides, comme la phase grasse d'une émulsion, le confinement sous hotte n'est plus indispensable et il est possible de travailler dans les conditions classiques du laboratoire.

Il est également nécessaire d'utiliser des équipements de protection individuelle. Pour une protection respiratoire et compte tenu de la courte durée des manipulations, seul un masque à cartouche équipé de filtres anti poussières est utilisé. Le port d'une blouse ainsi qu'une surblouse en tissu ne contenant pas de fibres, avec serrage au cou et aux poignets ; le port de gants étanches et jetables ; et de lunettes équipées de protection latérale, sont obligatoires lors des manipulations de pesée des poudres. Le lieu de travail doit être exempt de toute

accumulation de nanomatériaux déposés pouvant être remis en suspension dans l'air, et donc les surfaces de travail, comme les appareils et ustensiles utilisés (balance, spatule) doivent être régulièrement dépoussiérés et nettoyés à l'aide d'un chiffon imprégné d'éthanol. Enfin, de l'eau doit être régulièrement vaporisée au sein de la sorbonne afin de condenser les poudres dispersées.

Les déchets de nanomatériaux doivent être conditionnés de manière étanche dans des emballages fermés, et doivent être étiquetés. Ces déchets concernent les contenants vides, les liquides de nettoyage, les équipements de protection cutanée jetables ou encore les papiers absorbants contaminés. Les déchets doivent être ensuite acheminés vers un centre d'élimination ou de traitement approprié.

Chapitre 1 *Formulation des émulsions cosmétiques*

Les premiers travaux de la thèse ont consisté à l'élaboration d'une formulation huile dans eau contenant des nanoparticules de TiO_2, ce qui correspond à un système classique dans le cas des produits solaires. Une fois la formulation réalisée, il a été envisagé, pour différents temps et conditions de vieillissement, d'extraire les nanoparticules de l'émulsion, afin de caractériser leur état de surface et leur activité biologique. Nous détaillons dans ce chapitre, le choix des ingrédients utilisés pour la formulation, le protocole d'émulsion suivi, ainsi que l'incorporation puis l'extraction des nanoparticules.

1.1 Choix des ingrédients utilisés

Les ingrédients sont désignés par leur appellation INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients). En effet, en Europe, depuis 1998, tous les cosmétiques doivent mentionner sur leur emballage la liste complète des ingrédients dans l'ordre décroissant de leur quantité et sous leur dénomination INCI. La nomenclature INCI est écrite dans deux langues : les extraits de plante sont donnés sous le nom latin de la plante et les noms de molécules et les noms usuels sont donnés en anglais. Les colorants sont désignés par un Colour Index, qui s'écrit CI puis un nombre à 5 chiffres.

1.1.1 Nanoparticules et traitements de surface : données caractéristiques

Les nanoparticules sélectionnées pour l'étude sont des filtres UV exclusivement minéraux (les nanoparticules de TiO_2), sans ajout de filtres UV organiques. La concentration maximale (en poids) de TiO_2 dans les écrans solaires autorisés par l'Europe, l'Australie, le Canada et les Etats-Unis est de 25%. Les concentrations effectivement utilisées, selon les étiquettes des produits, sont généralement comprises entre 2 et 15 % (*Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen* 2010). Nous avons travaillé sur des formulations contenant 2,5 ; 5 ; 7 et 10% en poids de TiO_2, ce qui est relativement courant dans les formulations commerciales. Comme cela a déjà été précisé, les nanoparticules de TiO_2 utilisées dans cette étude ont subi un traitement de surface de grade cosmétique et leurs caractéristiques d'état de surface sont connues : en plus d'avoir subi une passivation à l'alumine, la particule est traitée chimiquement, par un greffage de groupement lipophile. Dans cette étude, nous avons travaillé avec deux types de nanoparticules de dioxyde de titane commerciales présentant chacune un traitement de surface spécifique: le *coating 1: triethoxycaprylylsilane*, et le *coating 2: isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane*. Dans les deux cas, la structure cristalline est le rutile et la taille de particule primaire, qui correspond à la taille des cristaux obtenus après le procédé de fabrication, est donnée par le fournisseur à 10 nm. Sous forme de poudre, les cristaux forment alors des agrégats de taille supérieure au micromètre. Pour être utilisés en formulation, ces agrégats doivent être réduits, grâce au procédé de formulation.

a) Les nanoparticules avec le coating *triethoxycaprylylsilane (NP1)*

La réaction de greffage du triethoxycaprylsilane dont la structure chimique est détaillée sur la Figure 16, a été décrite précédemment dans l'Etude bibliographique (Figure 12, p.59) et permet d'obtenir un traitement de surface très hydrophobe, compatible avec les huiles et esters. D'après le fabricant, il est idéal pour les émulsions nécessitant l'incorporation de poudres et permet d'obtenir un produit de faible viscosité due à l'excellent mouillage de ces pigments. Il permet également une charge relativement élevée de pigments au sein de l'émulsion, aux alentours des 5%.

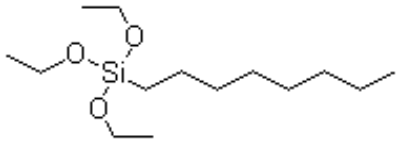


Figure 16 - Structure chimique du triethoxycaprylylsilane

Le traitement de surface au silane est conçu pour assurer la compatibilité de la matière minérale dans la phase grasse de la formulation ; la nature du groupe organique sur le silane doit donc être similaire à la structure chimique du composant majoritaire de la phase grasse : par exemple, un groupe alkyle à chaîne longue ou un groupe alkyle en caprylyl (C8) de l'huile ou de l'ester utilisé dans l'émulsion aidera à la dispersion du pigment dans le milieu.

b) Les nanoparticules avec le coating isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane (NP2)

Le second coating est un traitement de surface hybride de type polymère « croisé » c'est-à-dire synthétisé à partir de deux monomères : l'isopropyl titanium triisostearate et le triethoxycaprylylsilane. L'isopropyl titanium triisostearate est représenté par sa formule topologique sur la Figure 17.

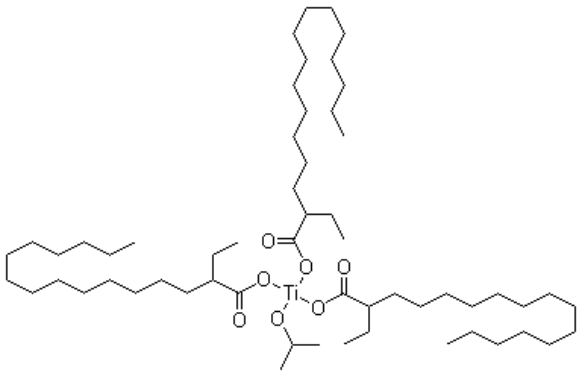


Figure 17 – Structure chimique de l'isopropyl titanium triisostearate (ITT)

La réaction chimique s'effectuant entre cette espèce chimique et la surface du TiO_2 hydrophile est représentée sur la Figure 18.

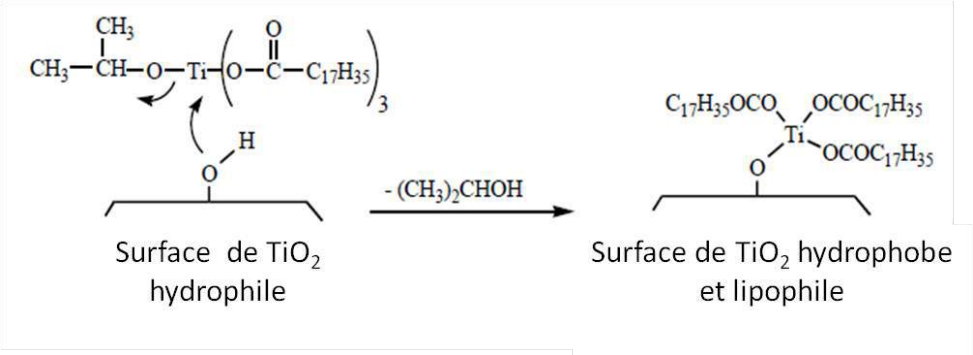


Figure 18 - Réaction chimique entre l'ITT et la surface du TiO_2 (Kobo)

A partir de cette espèce ITT et d'une nouvelle molécule d'alkoxysilane il est possible de synthétiser un nouveau polymère avec les avantages de chacune des espèces monomères. En associant par greffage un silane très hydrophobe, on peut obtenir un coating hybride améliorant ainsi l'efficacité du traitement de surface. Sur la Figure 19, lorsque $R=C_8H_{15}$, on obtient le polymère croisé désiré.

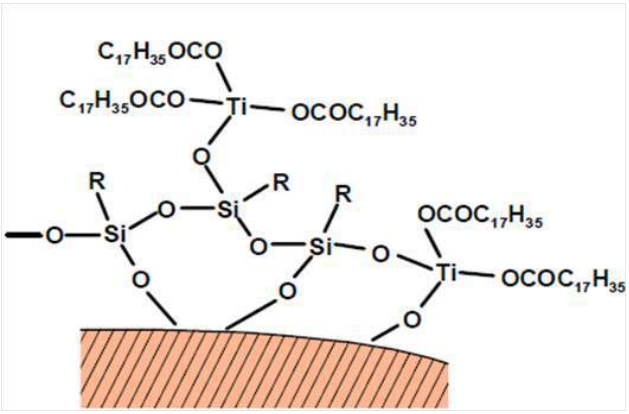


Figure 19 - Représentation de la structure chimique du coating 2, $R=C_8H_{15}$ (Kobo)

Ce traitement de surface est annoncé par le fournisseur comme favorisant la dispersion du TiO_2 dans les esters, les hydrocarbones et les silicones ; de plus, le traitement de surface présente une très grande stabilité dans une large gamme de pH (Schlossman, Shao, & Orr, 2012).

Tableau 3 - Composition des nanoparticules de TiO_2 utilisées et proportion de leur traitement de surface (en gras)

Nom	***Nom INCI***	***Composition***
NP 1	Titanium dioxide Alumina **Triethoxycaprylylsilane**	73,5-82% 12,5-17,5% **6-8%**
NP 2	Titanium dioxide Alumina Isopropyl Titanium **Triisostearate/Triethoxycaprylylsilane Crosspolymer**	73,5-82% 12,5-17,5% 3-4% **3- 4%**

1.1.2 Les ingrédients de l'émulsion

Les produits de protection solaire sont essentiellement des émulsions, de types E/H et H/E. Nous avons décidé d'incorporer les nanoparticules dans des émulsions H/E, ces dernières étant plus couramment utilisées. La première contrainte de formulation est de travailler avec des matières premières et des procédés proches des formulations commerciales, tout en restant réalisables au laboratoire et compatibles avec les futures analyses de culture cellulaire.

Deux principales formulations ont été réalisées : la formulation F à partir de laquelle F-0, F-N1 et F-N2 ont été préparées, et la formulation F' à partir de laquelle F'-0, F'-N (2,5%), F'-N (5%), F'-N (7%) F'-N (10%) comme l'indique le tableau ci-dessous.

Tableau 4 – Appellations des formulations F et F'

Formulation F *(Agent de consistance : paraffine)*	**Sans nanoparticules**	**5% de nanoparticules de coating 1**	**5% de nanoparticules de coating 2**
	F-0	F-N1	F-N2

Formulation F' *(Agent de consistance : cetearyl alcohol)*		**Nanoparticules de coating 2**			
	Sans nanoparticules	**2,5%**	**5%**	**7%**	**10%**
	F'-0	F'-N (2,5%)	F'-N (5%)	F'-N (7%)	F'-N (10%)

Les ingrédients ainsi que leur proportion dans l'émulsion, répertoriés dans le

Tableau 5 suivant ont été choisis pour l'émulsion F-0 et F-N en s'inspirant des formulations solaires commerciales brevetées tout en minimisant le nombre d'ingrédients (Andre & Brotzman). La formulation F' est identique à F avec l'utilisation de l'alcool cetearylique (agent de consistance, *Cognis*) à la place de la paraffine et incorpore un pourcentage croissant de nanoparticules de coating 2.

Tableau 5 - Ingrédients de la phase A grasse et de la phase B aqueuse, utilisés pour la préparation des émulsions avec (F-N) ou sans nanoparticules (F-0), avec leur proportion, leur fonction et leur fournisseur

	F-0	F-N			
	% massique		**Ingrédients - Nom INCI**	**Fonction**	**Fournisseur**
A	2,75		Steareth 2	Emulsifiant	*Croda*
	1,75		Steareth 21	Emulsifiant	*Croda*
	2		Paraffin	Emollient Agent de contrôle de la viscosité	*Baërlocher*
	0,2		Bees wax	Emollient	*Baërlocher*
	20		Cetearyl ethylhexanoate	Emollient	*Stéarinerie Dubois*
B	0,1		Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	Agent gélifiant	*Lubrizol*
	0,1		Triethanolamin	Base – agent tampon	*BASF*
	0,5		Phenoxyethanol Methylparaben Ethylparaben Propylparaben	Conservateur	*Jan Dekker*
	Qs		Distilled water		
	0	5	Titanium dioxide (CI 77891) Voir Tableau 3 p.100	Filtres UV	*Kobo Products*

1.1.3 Rôle de chacun des ingrédients

a) Les émulsifiants

Les tensioactifs non ioniques Steareth 2 et 21 sont des éthers de polyoxyethylène (ou éthers de polyéthylène glycol) dérivés de l'alcool stéarylique, et couramment utilisés dans les

émulsions cosmétiques. Les chiffres 2 et 21 indiquent le nombre moyen de groupement oxydes d'éthylène que comportent généralement ces molécules. Ainsi, pour ce type de composé, la solubilité dans une phase grasse ou aqueuse pourra varier en fonction du nombre d'éthoxylation; ceci peut être représenté par le nombre HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance). Le concept de HLB, introduit par Griffin en 1949, est un nombre qui caractérise la solubilité préférentielle des molécules de tensioactif dans l'eau ou dans l'huile. Pour un HLB d'une valeur entre 0 et 9, l'émulsifiant est de caractère lipophile tandis qu'entre 11 et 20, il a un caractère hydrophile. Grâce à leurs différences de HLB : 4,9 pour le Steareth 2 et 15,5 pour le Steareth 21, ils sont efficaces lorsqu'ils sont utilisés en combinaison afin de produire des émulsions H/E stables. Ce sont des composés pouvant être utilisés à pH élevé et qui tolèrent des fortes teneurs en électrolytes.

b) Les émollients et agents de consistance

Ces composés ont pour fonction d'assouplir et d'adoucir la peau. Constitués de lipides naturels, ils protègent la surface de la peau en comblant les microfissures qui se forment entre les cellules des couches superficielles de l'épiderme. L'émollient principal choisi dans notre formulation est le cetearylethylhexanoate, qui est l'ester de l'alcool cétéarylique et de l'acide éthyl-2-hexanoïque. Cet ester est liquide à température ambiante et d'après les données fournies par le fabricant, sa densité est comprise entre 0,851 et 0,861 et son indice de réfraction entre 1,445 et 1,447. De plus, l'alcool cétéarylique étant un mélange d'alcools cétylique (C16) et stéarylique (C18), le fabriquant indique un pourcentage en Ethyl-2 hexanoate de cetyl entre 60 et 70% et un pourcentage en ethyl-2 hexanoate de stéaryle entre 25 et 35%. Sachant que la longueur des chaînes carbonées de cet ester est du même ordre de grandeur que celle des chaînes carbonées du traitement de surface des nanoparticules NP1 et NP2, cet ester sera compatible avec les deux types de traitements de surface des nanoparticules.

La cire d'abeille naturelle, sécrétée par les abeilles, est principalement composée de palmitate myricylique (alcool cétylique (C16) estérifié par l'acide palmitique (C16)), d'esters d'acides cérotique (acide gras saturé (C26)) et de paraffines à haute teneur en carbone. Nous avons utilisé pour la formulation une forme purifiée de la cire d'abeille, la cire d'abeille blanche, qui présente un point de fusion aux alentours de 64°C. A l'état solide à température ambiante, elle permet d'éviter les séparations de phase et d'augmenter la viscosité de l'émulsion.

La paraffine est une cire blanche dérivée du pétrole. Les cires de paraffine sont principalement composées de chaines hydrocarbonées variant de 18 à 40 atomes de carbone, la longueur moyenne de la chaîne carbonée déterminant leur point de fusion. Dans notre cas, le point de fusion se situe sur une plage de température entre 62 et 64°C.

L'alcool gras, l'alcool cetearylique, utilisé dans la formulation F' à la place de la paraffine, est un agent de consistance utilisé dans les émulsions cosmétiques huile dans eau, afin de contrôler la viscosité du produit. Son point de fusion est situé entre 49 et 56°C.

c) Les agents gélifiants

Le Carbopol Ultrez 21 (INCI Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate) est un polymère de polyacrylate. Il est conçu pour apporter des propriétés épaississantes, stabilisantes. Il ne nécessite pas d'agitation lors de son mouillage dans la phase aqueuse. Dans la plupart des cas, le polymère doit être ajouté à l'eau au début de la formulation pour lui permettre de bien s'hydrater et de se disperser. À ce stade, le pH sera d'environ 3 avec une très faible viscosité. Après neutralisation avec une base, la triéthanolamine dans notre cas, le polymère épaissit instantanément le milieu, à la suite de l'ionisation des chaines de l'acide polyacrylique. Une telle ionisation a lieu lorsque le pH est augmenté au-delà d'une valeur de 5. Du fait de cette augmentation de viscosité, il est préférable d'ajouter l'agent neutralisant à la fin du protocole de formulation, après l'émulsification.

d) Les conservateurs

Les conservateurs ont pour rôle principal d'empêcher le développement de micro-organismes (bactéries et champignons) dans les produits cosmétiques afin de lui garantir une durée de vie suffisante, mais également une sécurité d'utilisation maximale pour le consommateur. Ils ont pour mission de protéger les produits cosmétiques des contaminations qui peuvent être apportées par la fabrication mais également par l'utilisateur au moment du prélèvement et de la manipulation du produit. Leur activité peut s'expliquer par trois grands modes d'action (Fernadez, Merck & Kerdudo 2012) :

- la dénaturation des protéines ;
- l'altération des systèmes enzymatiques de la cellule bactérienne ;
- la modification du système de reproduction en dénaturant les acides nucléiques.

Cependant, leur utilisation est de plus en plus décriée, car ils ne peuvent pas détruire les bactéries sans causer fréquemment des irritations cutanées, des allergies, ou même un risque de toxicité. Certains conservateurs peuvent détruire les bactéries qui nous protègent comme la flore saprophyte, ils pénètrent profondément la peau et sont très persistants. Néanmoins ils sont indispensables à la bonne conservation de la formulation cosmétique, en particulier pour des émulsions huile dans eau contenant une phase aqueuse en proportion importante. De plus, compte tenu des tests *in vitro* de cette étude, il est absolument primordial de travailler sur des formulations dépourvues de toute contamination microbienne. Nous avons utilisé un mélange de Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben qui est un conservateur à large spectre. Les parabènes sont des antibactériens et des antimycosiques solubles dans l'eau lorsque leur chaîne alkyle est courte. Couramment, un mélange de deux ou trois parabènes permet de protéger les émulsions contre la contamination microbienne ; et leur mécanisme d'action reste assez peu connu (Nguyen *et al.* 2005). Le phénoxyéthanol est un éther aromatique appartenant à la famille chimique des éthers de glycol. Des études ont identifié le site d'action bactéricide du phénoxyéthanol comme étant la membrane cellulaire où il provoque une augmentation de la perméabilité aux ions potassium (Fitzgerald, Davies &

Russell 1992). En plus de ses propriétés antibactériennes intrinsèques, la perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire des bactéries semble lui permettre de potentialiser l'action de nombreux conservateurs comme les parabènes, auxquels il est fréquemment associé (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé 2012).

1.2 Protocole de préparation des émulsions

1.2.1 Protocole pour l'émulsion sans nanoparticules F-0

L'agent gélifiant est saupoudré dans la phase aqueuse et mis à hydrater sans agitation pendant 20 min. Ce mélange et la phase A sont chauffés séparément à 80°C sous agitation mécanique moyenne. Lorsque les deux phases sont à 80°C, la phase A est ajoutée à la phase B (phase aqueuse) sous agitation à 11 000 tours par minute pendant 1 min 30 avec un homogénéisateur type rotor-stator (Ultra-Turrax muni d'une tige T25 rotor stator : stator 25 mm de diamètre, rotor 18 mm de diamètre, *IKA*). Le mélange est ensuite agité à 500 tours par minute à la défloculeuse (Turbotest, turbine à écoulement radial de diamètre 55mm, *VMI Rayneri*), et la triéthanolamine est ajoutée immédiatement (avant que la température n'atteigne 50°C) afin de neutraliser le polymère. La vitesse est augmentée jusqu'à 1000 tours par minute, pendant 15 min : la crème devient plus consistante. A 40°C, le mélange est ensuite refroidi avec un bain d'eau froide, jusqu'à 30°C avec une agitation constante. Le conservateur est ajouté en-dessous de 30°C, et le mélange est agité 5 minutes supplémentaires. La crème est ensuite mise sous vide afin d'éliminer l'air incorporé pendant le processus.

1.2.2 Formulation avec nanoparticules : F-N1 et F-N2

Le protocole précédemment décrit reste le même pour les émulsions contenant des nanoparticules ; cependant, au préalable, pour permettre une meilleure homogénéisation et une dispersion plus facile, les nanoparticules sous forme de poudre sont incorporées selon un protocole spécifique. Une pâte de nanoparticules est préparée, constituée de 40% en masse de nanoparticules et 60% en cetearylethylhexanoate. Cette pâte est ensuite broyée sur un broyeur tricylindre *Exakt 50*, une fois pour le *coating 1* et trois fois pour le *coating 2*, jusqu'à obtenir une dispersion fine et homogène contrôlée au microscope optique. Cette pâte est alors additionnée après l'émulsion selon le protocole suivant : après ajout de la phase A à la phase aqueuse sous agitation à 11 000 rpm pendant 1 min, la dispersion de nanoparticules est incorporée en maintenant la même agitation pendant une minute supplémentaire. En tenant compte du cetearylethylhexanoate présent dans la dispersion de nanoparticules, la quantité de cetearylethylhexanoate dans la phase grasse est adaptée pour obtenir le même pourcentage final que pour la formulation sans nanoparticules. La formulation de nanoparticules avec le traitement de surface 1 sera appelée F-N1 et celle avec le traitement de surface 2, F-N2.

1.3 Extraction des nanoparticules de la formulation

Afin d'étudier les phénomènes subis par les nanoparticules au cours de l'émulsification et du vieillissement des émulsions, nous avons procédé à l'extraction et la récupération des nanoparticules de la formulation.

Dans certaines études, les protocoles d'extraction sont très succinctement décrits par l'ajout de solvants (Dunford, Salinaro & Cai 1997), et le sont plus longuement dans d'autres (Lewicka *et al.* 2011; Nischwitz & Goenaga-Infante 2012). L'étude de Nischwitz & Goenaga-Infante 2012 décrit par exemple l'optimisation des méthodes d'extraction pour des nanoparticules de dioxyde de titane issues d'échantillons de crème solaire. La crème est lavée avec de l'hexane afin d'extraire la phase grasse, puis traitée aux ultrasons dans le méthanol permettant ainsi d'extraire la phase aqueuse. On obtient alors des suspensions stables de dioxyde de titane à l'état de taille primaire de particules. Dans celle de Lewicka *et al.* 2011, les auteurs ont isolé les particules de TiO_2 et ZnO de produits commerciaux, en utilisant trois différentes méthodes d'extraction : par évaporation sous vide poussé du microscope électronique à balayage, par dilution dans l'eau ou l'éthanol avant une séparation sur supports solides ou encore par dilution dans le chloroforme suivie d'une centrifugation. Dans une troisième étude (Mori, Okastu & Tsujimoto 2001), les particules de titane sont récupérées à partir d'une microémulsion, après un lavage à l'eau et l'éthanol, une centrifugation, et finalement un séchage sous vide à 373K. Enfin dans l'étude de Contado & Pagnoni 2008, les particules de TiO_2 ont été extraites de la crème solaire en ayant été mélangées et traitées aux ultrasons dans de l'eau, puis dans un mélange eau-méthanol, et enfin dans un mélange eau-méthanol-hexane. Les phases aqueuses et organiques ont ensuite été séparées et la présence de titane dans la phase eau/méthanol a été déterminée par ICP-AES après évaporation du méthanol.

Dans notre étude, nous nous sommes inspirés directement du travail de Nischwitz & Goenaga-Infante 2012. Par un procédé simple, il permet d'obtenir des suspensions de particules de dioxyde de titane désagrégées et similaires en terme de tailles aux nanoparticules brutes. Les solvants ont été choisis sachant que les particules d'oxyde métallique sont le plus souvent extraites en utilisant des solvants tels que l'acétone, le chloroforme, l'isopropanol, l'hexane et le méthanol (Lewicka *et al.* 2011).

Le protocole complet est détaillé ci-dessous :

- 2 g d'émulsion sont mélangés à 50 mL d'heptane.
- Le mélange a été soumis à 5 min d'ultrasons, puis centrifugé 5 min à 1690 g à l'aide d'une centrifugeuse Heraeus Centrifuge 16R (*Thermo Scientific*).
- Le surnageant est vidé, le culot est mis en suspension avec 40mL d'heptane et 10 mL de méthanol. Le mélange est de nouveau soumis aux ultrasons puis centrifugé.

- Le surnageant est vidé, le culot est mis en suspension avec 20 mL de DMSO. Le mélange est de nouveau soumis aux ultrasons puis centrifugé.
- Le surnageant est vidé, le culot est mis en suspension avec 20 mL de méthanol. Le mélange est de nouveau soumis aux ultrasons puis centrifugé.
- Le culot est récupéré et mis à sécher sous vide pendant une nuit.

Dans la suite des résultats, deux types de protocole sont suivis : le protocole 1 réalisé sans l'étape au DMSO, et le protocole 2 complet, décrit ci-dessus.

1.4 Conditionnement et contrôle de la stabilité des émulsions

Afin d'évaluer la stabilité des émulsions formulées, nous avons stocké pendant trois mois, deux lots de chaque émulsion à :

- Température ambiante de 20°C, dans des flacons en plastique opaque
- Haute température 50°C, dans des flacons en verre fermés, dans une étuve Heraeus (*Thermo Scientific*)

Le stockage à 50°C permet d'accélérer le processus de vieillissement et d'accélérer le mécanisme de déstabilisation de l'émulsion (Masmoudi *et al.* 2005). L'hypothèse est généralement faite que, si une émulsion ne montre pas de sédimentation, crémage ou séparation à 50°C pendant un mois, alors le système ne montre pas de séparation à température ambiante pendant plus d'un an. Cela est valable si on considère que la viscosité η de la formulation suit l'équation d'Arrhenius, qui prévoit une augmentation linéaire de $ln\,\eta$ avec $\frac{1}{T}$, avec T la température.

L'échantillonnage se fait à différents temps après émulsification : t_0 +24 heures, +72 heures, +7 jours, +14 jours, +21 jours, +28 jours, +43 jours et +65 jours. Les différentes analyses physico-chimiques décrites ci-dessous sont effectuées sur chaque échantillon d'émulsion à chaque temps de vieillissement sous les deux conditions de température de stockage.

Chapitre 2 *Techniques de caractérisation physico-chimique*

Les formulations avec et sans nanoparticules, ainsi que les nanoparticules brutes ou extraites des émulsions ont été soumises à différentes caractérisations physico-chimiques, adaptées à chaque type de système. Nous détaillerons dans ce chapitre pour chaque technique d'analyse utilisée, le principe de la mesure, et les protocoles et matériels utilisés dans cette étude.

2.1 Mesures granulométriques

2.1.1 Principe de la mesure

L'analyse granulométrique permet de mesurer par diffraction laser des échantillons dispersés en milieu liquide (cf 1.3.1a) p.40). Un faisceau laser émet une lumière rouge de faible puissance.

Les particules éclairées par la lumière laser dévient la lumière de son axe principal. La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent de mesurer avec précision la taille des particules (Figure 20). La gamme des diamètres mesurables s'étend de 20 nm à 2 mm. Les intensités reçues aux différents angles par des photodiodes en silicium sont numérisées puis analysées par calcul sur des matrices inverses. Le logiciel Mastersizer 2000 contrôle le système pendant le processus de mesure et analyse les données de diffusion pour calculer la distribution de taille des particules. Le résultat du calcul est représenté sous forme d'histogramme.

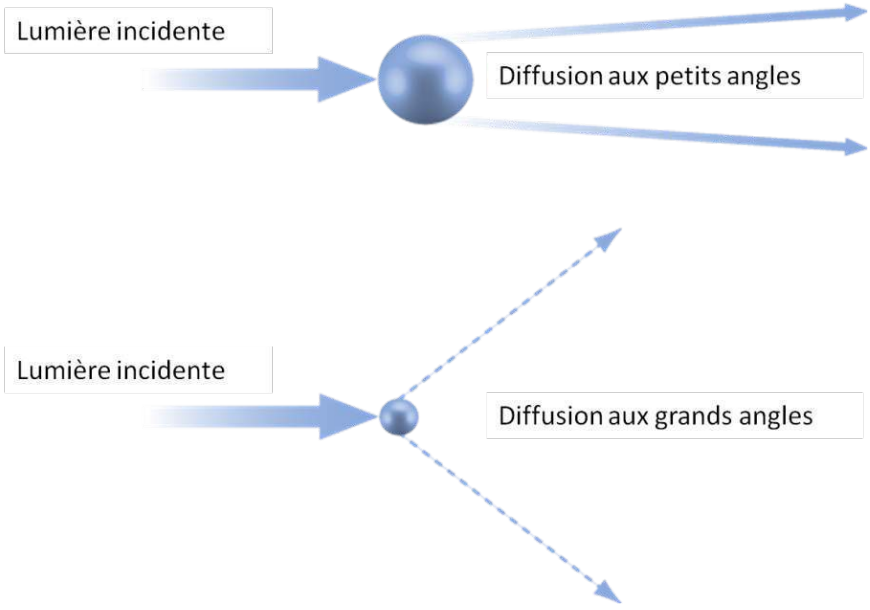


Figure 20 - Représentation schématique des phénomènes de diffusion de la lumière incidente en fonction de la taille des particules

2.1.2 Protocole opératoire

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un granulomètre Mastersizer 2000 (*Malvern Instruments*). Les données ont été traitées avec le logiciel Mastersizer 2000, (*Malvern Application*, version 5.60). L'échantillon mesuré est dilué puis mis en circulation à l'aide du module de dispersion d'échantillon manuel Hydro 2000MU. L'indice de réfraction complexe de l'échantillon à mesurer doit être connu. Il est constitué d'une partie réelle correspondant à l'indice de réfraction et d'une partie imaginaire correspondant à l'indice d'absorption. La partie réelle a été déterminée par des mesures de réfractométrie au réfractomètre portable Refracto (*Mettler Toledo*). Les propriétés optiques de l'échantillon ont donc été définies comme suit : pour les émulsions sans nanoparticules, l'indice de réfraction est de 1,450 et celui d'absorption de 0,1. Pour les formulations avec nanoparticules, l'indice de réfraction et d'absorption sont respectivement de 1,458 et 0,1. Le modèle mathématique de calcul utilisé est le modèle « General Purpose », avec une forme de particules considérées comme sphériques. Pour la pâte de nanoparticules pré-dispersées dans le DMSO, l'indice de réfraction et d'absorption sont respectivement de 1,47 et 0,1 et le modèle utilisé est « Irregular mode » où les particules ne sont pas considérées comme des sphères.

La préparation d'échantillon consiste à diluer environ 0,1 g de l'émulsion ou de la pâte de nanoparticules dans 600 ml d'eau ultra-pure. L'analyse ne nécessite aucune calibration avant mesure. L'échantillon est dispersé par ultrasons pendant 2 minutes, jusqu'à ce qu'un taux d'obscurcissement de 10-20% soit obtenu. Le blanc puis l'échantillon sont mesurés pendant 10 s. Chaque échantillon a été mesuré en triplicat et le résultat final est reporté sous forme de moyenne.

2.1.3 Courbe type obtenue

Le résultat produit par l'analyse est une distribution en volume qui est la proportion volumique pour chaque catégorie de taille en fonction du volume total des particules. Il est possible de convertir cette distribution en une distribution en nombre, en surface ou en longueur. Cependant un petit volume de particules de petite taille pourra être transformé en une partie très importante de la distribution en nombre, et si ce petit volume est dû au bruit ou à des erreurs de mesure, alors il pourra masquer la répartition réelle désirée. Nous avons préféré rendre compte de la répartition volumique. Il est également possible de représenter les résultats graphiquement sous forme de courbe cumulative (Figure 21). Elle affiche le résultat sous la forme d'une courbe continue montrant la probabilité de trouver une particule à une taille spécifique. La courbe est normalisée afin de montrer la proportion de résultat entre deux tailles.

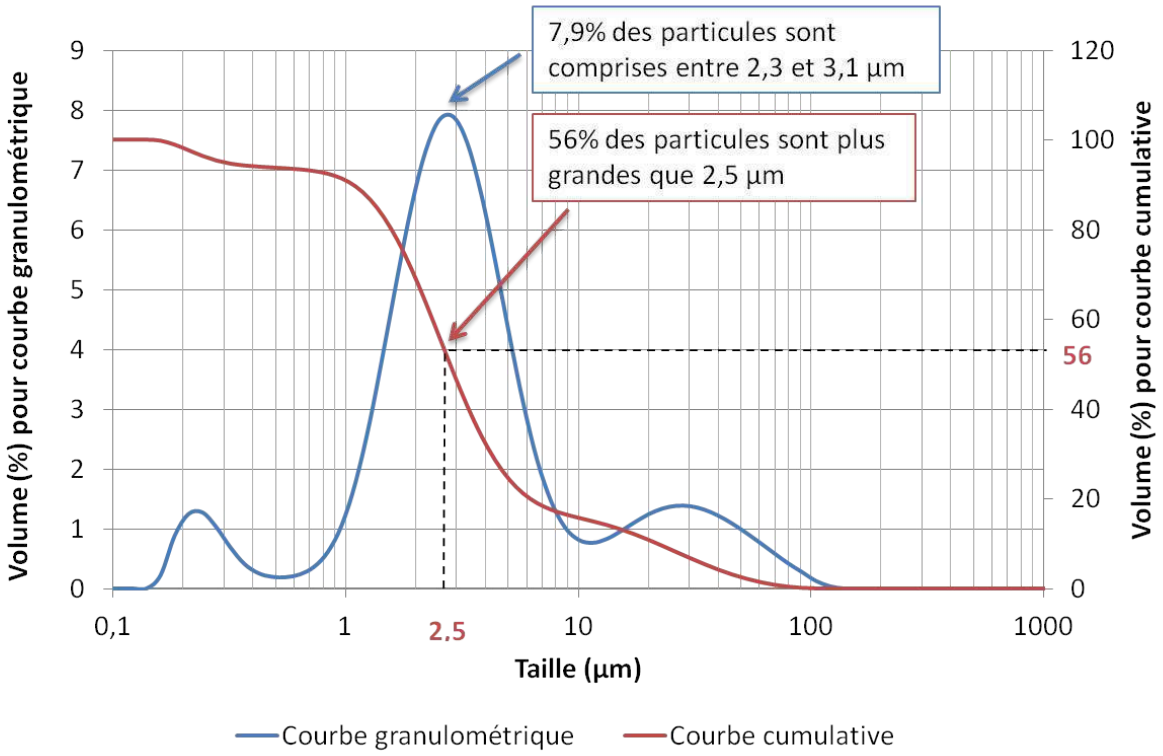


Figure 21 - Courbes type obtenues de distribution de taille de particules colloïdales en pourcentage volumique : courbe granulométrique (en bleu) et courbe cumulative (en rouge)

2.2 Observations par microscopie optique

Les analyses microscopiques optiques ont été réalisées en transmission sur un microscope *DMLP/DC300, Leica Microsystems* équipé d'une caméra, et les clichés microscopiques ont été pris à un grossissement de x 200, à l'aide du logiciel IM 1000. Les échantillons sont préparés par dépôt d'une pointe de spatule de crème disposée entre une lamelle et une lame de verre. Trois prélèvements sont réalisés à différents endroits de l'émulsion.

2.3 Analyses rhéologiques

2.3.1 Principe de la mesure

Le but de l'étude rhéologique est dans un premier temps de caractériser les propriétés mécaniques des formulations sans et en présence des nanoparticules. Puis le suivi de l'évolution des valeurs des paramètres viscoélastiques du fluide au cours du temps, nous permettra de juger de la stabilité des émulsions étudiées et des différents types de mécanisme de déstabilisation mis en jeu au cours du vieillissement. Les paramètres G', G'', tan(δ) et γ_c, précédemment définis au paragraphe 1.3.2b) p. 42, ont été déterminés dans la région de viscoélasticité linéaire et caractérisent le comportement élastique et visqueux du fluide.

2.3.2 Protocole opératoire

Les tests de balayage en déformation ont été réalisés à 25°C sur une gamme de 0,01 à 100 % à 10 points par décade, à une fréquence de 1 Hz à l'aide d'un rhéomètre AR 2000 (TA Instruments). La géométrie utilisée est une géométrie cône-plan en acrylique de diamètre 40 mm, d'angle 0,59° et d'entrefer 0,027 mm. Le contrôle de température du plan inférieur est assuré par un système à effet Peltier. Les mesures ont été réalisées en triplicat.

2.3.3 Courbe type obtenue

Lors d'un balayage en déformation, on obtient les évolutions des paramètres G', G'', et tan(δ) en fonction du pourcentage de déformation, comme l'indiquent les Figure 22 et Figure 23.
On rappelle que

- δ est l'angle de phase
- G'', le module de perte, $G'' = G \sin \delta$
- G', le module de conservation $G' = G \cos \delta$
- γ_c, la déformation critique. Elle correspond à la valeur du pourcentage de déformation pour lequel G' vaut 90% de la valeur de la moyenne de G' dans la région linéaire.

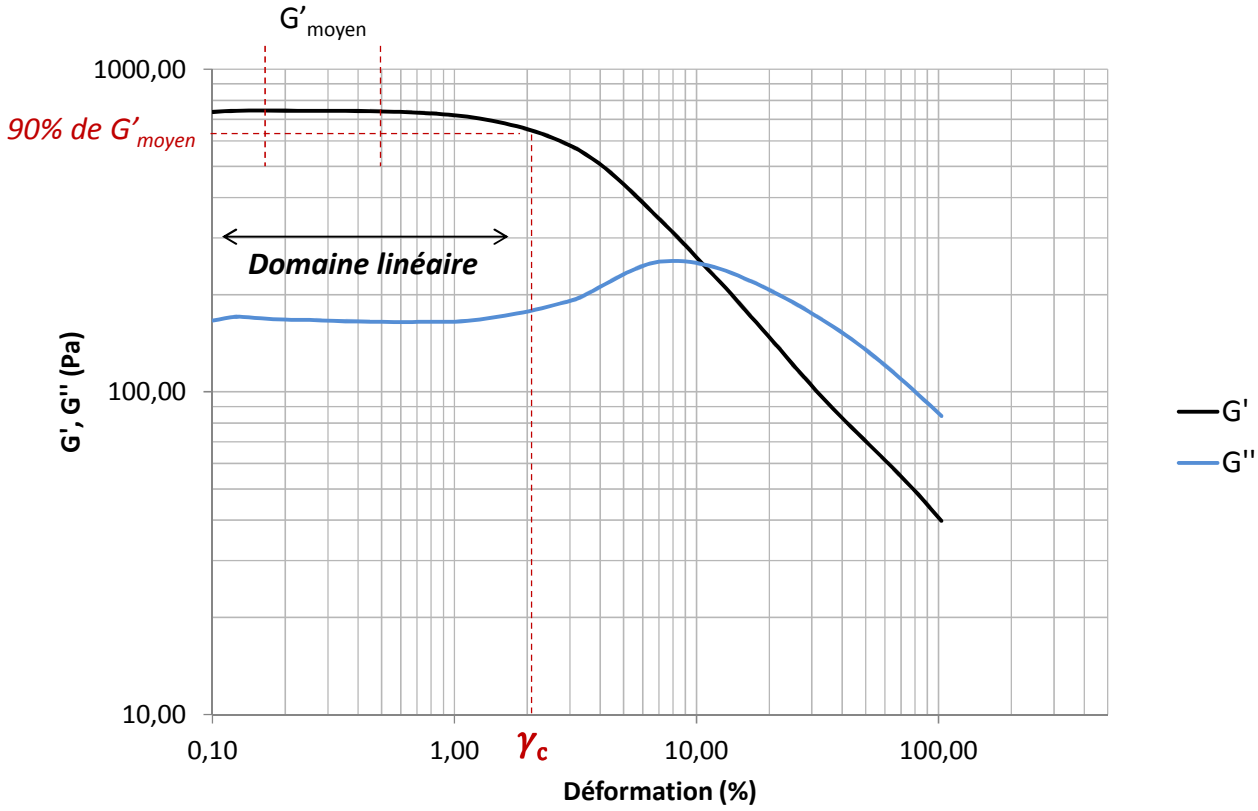


Figure 22 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de G' et G'' en fonction de la déformation

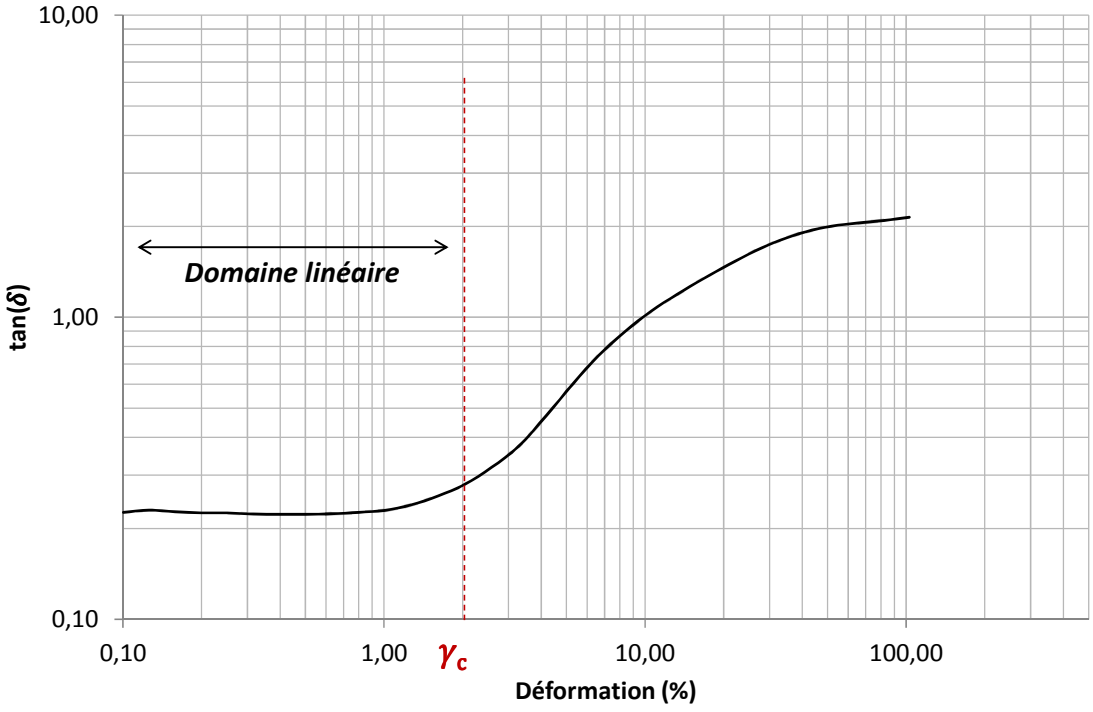


Figure 23 - Balayage en déformation : représentation de tan (δ) en fonction de la déformation

2.4 Mesures de potentiel Zêta

2.4.1 Principe de la mesure

Le phénomène le plus connu et le plus exploité pour mesurer le potentiel zêta est l'électrophorèse, c'est-à- dire le mouvement de particules chargées, en suspension dans un liquide, sous l'influence d'un champ électrique (cf 1.3.3 p.47). La mesure du potentiel zêta est fondée sur la technique optique de vélocimétrie laser Doppler, reposant sur la mesure du décalage en fréquence de faisceaux laser éclairant des particules très fines entrainées par un fluide. Cette technique permet de mesurer la vitesse de particules dans un fluide. Lorsque l'appareil applique un champ électrique dans la suspension contenant les particules chargées, celles-ci sont entraînées avec une certaine mobilité. Dans notre cas, le champ appliqué est alternatif afin d'éviter la polarisation des électrodes. La mobilité des particules est fonction de leur charge et de leur cortège ionique, et donc de leur potentiel zêta.

On rappelle que la mobilité électrophorétique U_E s'exprime de la manière suivante :

$$U_E = \frac{V}{E}$$

avec

V la vitesse des particules et E le champ électrique.

Le potentiel zêta, ζ, est déduit par la loi de Henry :

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta}$$

avec,

U = mobilité électrophorétique des particules

ζ = le potentiel zêta

η = viscosité de la phase continue

ε = constante diélectrique du liquide

$f(\kappa a)$ la fonction de Henry

Les seuls paramètres nécessaires à la détermination du potentiel zêta sont la constante diélectrique du liquide, son indice de réfraction et sa viscosité. Tous les résultats seront mesurés selon le modèle suivant l'approximation de Schomulowski.

2.4.2 Protocole opératoire

Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées sur un appareil Zeta Sizer Nano Z (*Malvern Instruments*). Il existe différents types de cellules de mesure de potentiel zêta. Nous en utiliserons deux, en fonction de nos conditions d'analyse. La première est appelée la « folded capillary cell », une cellule de mesure jetable, utilisée pour la mesure du potentiel zêta d'échantillons diluées dans des dispersants aqueux. En présence de solvants non aqueux à

faible constante diélectrique, des forces élevées de champ électrique sont nécessaires pour mesurer la vitesse des particules dispersées. On utilise alors la cellule dite « dip-cell ».

- Pour le suivi d'émulsions, les émulsions sont diluées à 0,5 w/w% dans de l'eau ultra-pure (résistivité > 15 mΩ.cm), chargée à 10^{-4} mol.L^{-1} en NaCl. Six échantillons de cette solution sont fixés à pH 2, 4, 6, 8, 10 ,12 par ajout de soude NaOH et d'acide chlorhydrique HCl à 0,1 mol.L^{-1}. L'analyse est effectuée dans une cellule de mesure jetable, en prenant soin de ne pas y inclure de bulles.

- Pour la mesure du potentiel zêta des nanoparticules, celles-ci sont diluées à 0,1 w/w% dans du DMSO, passées et injectées dans une cuve en verre dans laquelle la cellule « Dip-cell » est plongée.

Les cellules de mesure sont ensuite insérées dans l'appareil. Le logiciel de l'instrument détermine alors automatiquement l'intensité adaptée du champ électrique. Il ajuste l'intensité du faisceau de référence pour obtenir un rapport signal sur bruit optimal. Enfin, il collecte et analyse les données pour présenter les résultats à l'utilisateur.

2.4.3 Courbe type obtenue

Les résultats obtenus lors de la mesure sont représentés sous forme de graphe de distribution du potentiel zêta (Figure 24) et la valeur moyenne du potentiel zêta est calculée. A partir de cette valeur on tracera ensuite la courbe de l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH.

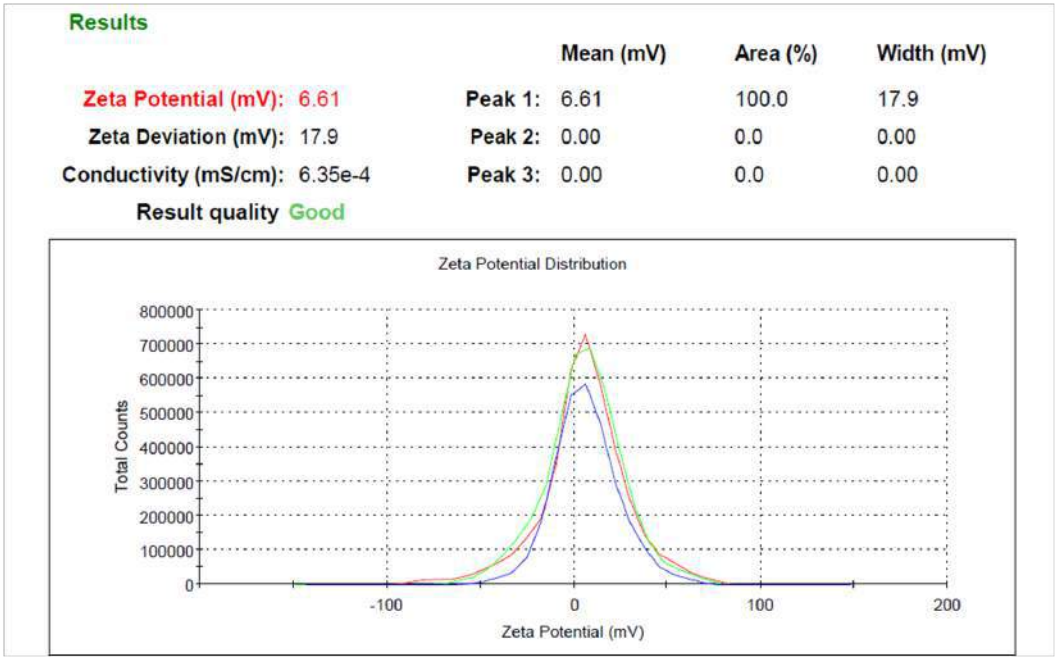


Figure 24 - Courbe type obtenue de la distribution de potentiel zêta pour trois mesures

2.5 Mesures Infrarouge

2.5.1 Principe de la mesure

Lors de la mesure de spectroscopie infrarouge, un rayonnement polychromatique est envoyé sur le matériau, et l'échantillon absorbe une partie de ce rayonnement. Le champ électromagnétique du rayonnement interagit avec les charges électriques de la molécule. Lorsque la fréquence de champ est voisine de la fréquence de vibration de la molécule, cela crée une transition directe entre deux niveaux de vibration par absorption de l'énergie du rayonnement incident. Une bande d'absorption est donc observée sur le spectre à un nombre d'onde caractéristique de la liaison.

2.5.2 Protocole opératoire

Les mesures de spectroscopie d'absorption IR ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre à transformée de Fourier, Frontier (*Perkin-Elmer*) en mode de réflexion totale atténuée (ATR). L'ATR nécessite l'utilisation d'un cristal (diamant, ZnSe) en contact avec l'échantillon à analyser. Le faisceau IR se propage dans le cristal ; si l'indice de réfraction du cristal est supérieur à celui de l'échantillon, alors le faisceau subit des réflexions totales au-delà d'un certain angle d'incidence à l'interface échantillon/cristal à l'exception d'une onde, dite onde évanescente qui émerge du cristal et est absorbée par l'échantillon. C'est cette onde évanescente qui est responsable du spectre IR observé. La profondeur de pénétration est de l'ordre de 1 à 2 micromètres, fournissant ainsi une information de surface. Cela est particulièrement intéressant pour l'analyse des échantillons purs (sans dilution dans une matrice KBr) puisque le risque de voir les pics saturer est très faible. De plus, aux basses énergies, la résolution est en général meilleure que pour un spectre "classique" en transmission. Les échantillons ont été analysés dans la gamme de fréquence 650 - 4000 cm^{-1} et traités grâce au logiciel Spectrum.

2.5.3 Courbe type obtenue

Le spectre obtenu comporte généralement plusieurs bandes d'absorption qui sont caractéristiques de la structure des molécules analysées. A titre d'exemple, la Figure 25 représente le spectre d'absorption de nanoparticules de dioxyde de titane.

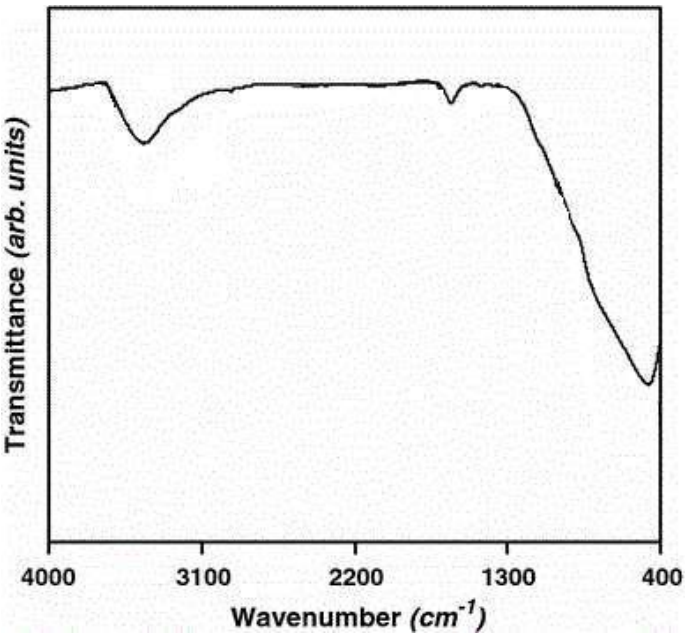


Figure 25 - Spectre d'absorption de nanoparticules de dioxyde de titane (Baiju et al. 2009)

2.6 Spectroscopie de photoélectron X (XPS)

2.6.1 Principe de la mesure

C'est une méthode non destructive utilisée pour caractériser la composition chimique d'extrême surface des matériaux, en mesurant la composition atomique de couches entre 1 et 10 nm. Elle donne des informations non seulement sur la composition élémentaire d'un matériau jusqu'à 1% atomique, mais aussi sur l'état de liaison de différents éléments. L'énergie de liaison d'un électron dépend du niveau électronique auquel il appartient mais aussi de l'état d'oxydation et de l'environnement de l'atome considéré. Cette technique consiste à irradier un échantillon par un faisceau de rayons X suffisamment énergétique puis à détecter les électrons éjectés lors de l'ionisation des atomes de l'échantillon (Figure 26). L'énergie cinétique E_c des photoélectrons est mesurée et permet de remonter à l'énergie de liaison E_l des photoélectrons, caractéristique de chaque élément, via la formule:

$$E_c = h\nu - E_l - W$$

Avec

$h\nu$: l'énergie du rayonnement incident

W : la fonction de travail spécifique à l'instrument

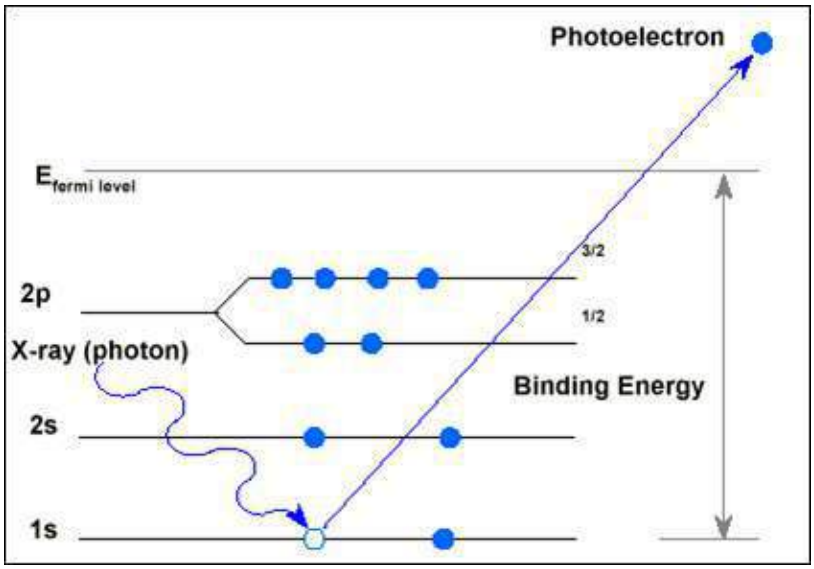


Figure 26 - Principe schématique de la spectroscopie de photoélectrons X (http://www.coretechint.com/technical_info-xps.php)

2.6.2 Protocole opératoire

Les analyses ont été réalisées par le laboratoire *Unité de Catalyse et Chimie du Solide* (UCCS) de Lille, sur un spectromètre Axis Ultra DLD (*Kratos Analytical*). La source de rayons X a été fournie par la raie Kα de l'aluminium, d'énergie $h\nu = 1486{,}6\ eV$, avec une tension de 15 kV et une puissance de 150 W. Les échantillons ont été déposés sur de l'adhésif double face carboné. La calibration des mesures a été réalisée à l'aide d'un échantillon de référence en cuivre. Les spectres ont été recalés en énergie en se référençant à la composante du Carbone 1s correspondant aux liaisons C-C, C-H fixée à 285,0 eV. La marge d'erreur sur les valeurs d'énergie de liaison est de ± 0,1eV. La marge d'erreur sur les quantifications est de l'ordre de 10-20%. La limite de détection est d'environ 0,1% atomique.

2.6.3 Courbe type obtenue

Le spectre résultant, d'intensité d'électrons émis en fonction de l'énergie de liaison, peut être illustré par le spectre de la Figure 27.

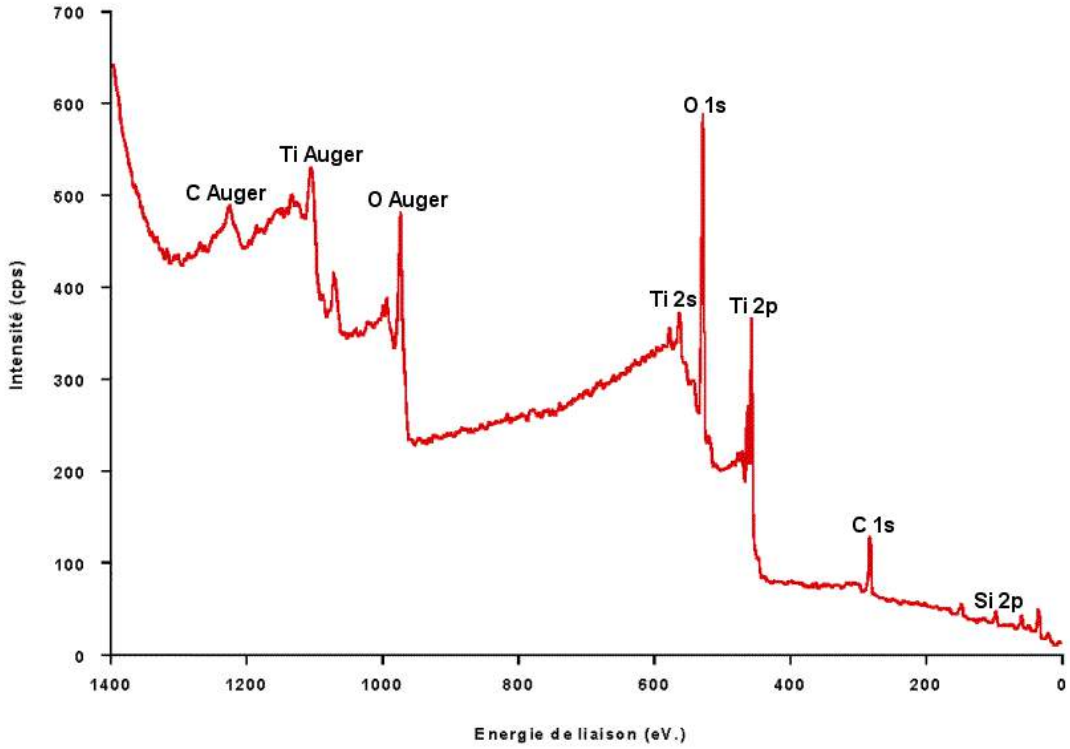


Figure 27 – Spectre obtenue lors d'une mesure XPS dans le cas d'un dépôt ultra mince de TiO_2 sur silicium (http://icb.u-bourgogne.fr/SCAI/Analyses/SIMS/XPS4.html)

Les bandes caractéristiques correspondent au type d'électron de cœur initialement éjecté lors de l'irradiation aux rayons X. L'énergie de liaison est donc caractéristique d'un élément et le nombre de coups caractéristique de l'abondance de cet élément dans l'échantillon.

Chapitre 3 *Les modèles biologiques et tests de toxicité*

Dans ce chapitre, nous détaillerons les modèles cellulaires choisis, les différents tests de toxicité utilisés, ainsi que les protocoles adaptés aux différents systèmes étudiés.

3.1 Tests de cytotoxicité

3.1.1 La lignée humaine MCF-7

Nous travaillons en premier lieu sur des lignées de cellules tumorales mammaires MCF-7. La lignée tumorale MCF-7 est une lignée adénocarcinomateuse mammaire humaine qui a été obtenue en 1970 à partir d'une effusion pleurale sur une patiente du type caucasien âgée de 69 ans, présentant un cancer du sein métastasé (Soule *et al.* 1973). Les cellules MCF-7 sont des cellules apparentées à des cellules luminales épithéliales. Ce sont des cellules faiblement invasives qui sont responsables d'un cancer de type carcinome canalaire in situ. En culture, sur un substrat plastique, les MCF-7 forment des colonies de cellules polygonales. Grâce à leur origine pleurale, les MCF-7 ont l'avantage de ne pas, ou très peu, être contaminées par des fibroblastes ou d'autres cellules cancéreuses. Les cellules MCF-7 sont aneuploïdes et hétéroploïdes, avec un caryotype qui varie de 65 à 88 chromosomes (Lacroix & Leclercq 2004).

Les MCF-7 sont connues pour être les premières cellules de lignée à répondre à l'exposition à des hormones (Levenson & Jordan 1997). Les caractéristiques particulières de cette lignée lui ont permis d'être adoptée par des équipes du monde entier. Plusieurs équipes ont obtenu des cellules dérivées de la lignée parentale par sélection après traitements cytotoxiques (Lacroix & Leclercq 2004). Ainsi, en cultivant des cellules MCF-7 en présence de doses croissantes de cytotoxiques (par exemple la doxorubicine ou vincristine), il est possible d'induire et de sélectionner des cellules possédant un phénotype résistance aux cytotoxiques par surexpression d'ABC transporteurs comme la P-glycoprotéine (Lacroix & Leclercq 2004). Il existe alors deux phénotypes distincts pour la même lignée MCF-7, le phénotype dit sensible et le phénotype dit résistant. Ces deux phénotypes prennent le nom de variant. Ainsi, il existe plusieurs couples de variants MCF-7 sensible/résistant utilisés dans les études du phénotype MDR (Kim *et al.* 1997; Fu *et al.* 2002; Pasquier *et al.* 2012). Nous travaillerons sur le phénotype sensible.

Le temps de doublement des cellules MCF-7 sur lesquelles nous avons travaillé est t_D et vaut $\frac{ln2}{\lambda}$ avec λ le taux de croissance des cellules. Il est calculé à 29 $\pm$ 1,26 h.

3.1.2 Culture des cellules MCF-7

Les cellules MCF-7 sont un don généreux du Pr Marie, responsable du service d'hématologie de l'Hôtel Dieu à Paris. Le milieu de culture « complet » est constitué de RPMI 1640 *(Sigma-Aldrich)*, de 5% de sérum de veau fœtal *(Sigma-Aldrich)* préalablement décomplémenté par chauffage à 60°C pendant 30 minutes, de 1% L-glutamine *(Sigma-Aldrich)*, et de 1% de solution antibiotique/antimycotiques *(Sigma-Aldrich)*.

Les cellules sont incubées dans un incubateur Heracell (*Heraeus*) à 37 °C en atmosphère humide contrôlée à teneur de 5 % en CO_2. Elles sont cultivées dans des flacons à col incliné de 25 cm² (*BD Falcon*) avec des plastiques traités leur offrant des capacités d'adhérence. A 80% de confluence, après rinçage au milieu RPMI non complet, les cellules sont décollées par incubation pendant 3 à 5 minutes à 37°C dans un mélange trypsine (5 mg/ml) et EDTA (0,1%). L'action de la trypsine est ensuite stoppée par dilution dans du RPMI complet. Les cellules sont centrifugées (270 x g, 5 minutes) et le culot repris dans 5 ml de milieu complet. Les cellules sont ensuite redistribuées à la dilution souhaitée dans différents flacons.

La conservation des cellules se fait par cryoconservation dans l'azote liquide à -196°C. Les cellules sont placées en présence de RPMI complet, de SVF et de DMSO dans des microtubes *Eppendorf* de 1,5 ml. La décongélation des cellules se fait de manière rapide, en versant le contenu du cryotube partiellement décongelé dans un tube contenant 30 mL de milieu complet.

3.1.3 Test de viabilité/prolifération cellulaire au MTT sur MCF-7

a) Principe

Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Le tétrazolium est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan selon la réaction schématisée sur la Figure 28.

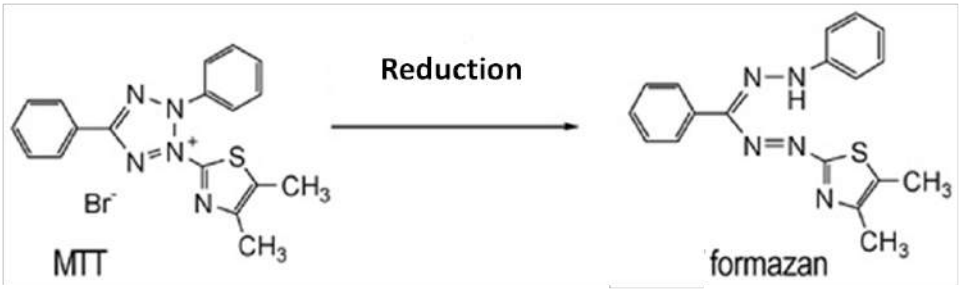


Figure 28 - Réduction du MTT en formazan

Cette réaction entraîne la formation d'un précipité de couleur violette dans la mitochondrie, dont la quantité est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (Twentyman & Luscombe 1987). Après 4h d'incubation des cellules avec du MTT à 37 °C, les précipités de formazan violets sont dissous dans du DMSO. Un simple dosage de la densité optique par spectroscopie

permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes et actives métaboliquement (Pasquier, Magal et al. 2011).

b) Protocole

Une solution mère de MTT est préparée à 5 mg/mL dans du milieu RPMI 1640 puis filtrée stérilement à 0,2 µm, puis conservée à 4°C pendant une semaine. Plusieurs expériences sont réalisées simultanément dans des plaques de 96 puits en réplicats (n=6) : 5 000 cellules sont ensemencées par puits avec 200 µL de milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite laissées adhérer 24 heures à 37°C, 5% CO2.

c) Comptage du nombre de cellules N_0 24h après ensemencement

24h après l'ensemencement, 40 µL de la solution mère de MTT est ajoutée dans chacun des 6 puits. Ceux-ci sont incubés 4 heures à 37°C, 5% CO_2. Le milieu est ensuite aspiré, puis les cellules sont lysées avec 200 µL de DMSO frais afin de dissoudre parfaitement les cristaux de formazan. La plaque 96 puits est ensuite lue au lecteur de microplaque Infinite 200 (*Tecan*) à 570 nm contre le fond à 630 nm ; on obtient ainsi les valeurs de densité optique correspondant au nombre de cellules N_0.

d) Préparation des solutions d'exposition

Les formulations

D'après la littérature les concentrations maximales en nanoparticules de dioxyde de titane utilisées pour exposer des cellules peuvent atteindre 3000 mg/L (Sayes *et al.* 2006). Sur la base de cette information, les formulations F-0 et F-N à tester sur les cellules sont préparées à différentes concentrations : 10, 30, 100, 500, 1000 mg/L. Pour des raisons de stérilité, les formulations sont préparées la veille de l'exposition, et les émulsions diluées dans le RPMI sont aliquotées et stockées au congélateur.

Les nanoparticules

Les nanoparticules sont mélangées dans le DMSO (40/60 w/w%) et sont ensuite diluées dans le RPMI afin d'obtenir les concentrations finales du Tableau 6. Avant chaque exposition aux cellules, les dilutions sont soniquées 5 minutes pour s'assurer d'une dispersion homogène et correspondant à une population de particules nanométriques. La dose réelle de nanoparticules exposée aux cellules est fonction du pourcentage massique de nanoparticules incorporées dans la formulation ; les concentrations correspondantes sont récapitulées dans le Tableau 6.

Tableau 6 - Concentrations en formulation et en nanoparticules dans le RPMI

Concentrations utilisées pour les **FORMULATIONS** dans le RPMI	Concentrations finales en **NANOPARTICULES** (avec 5% massique de nanoparticules dans la formulation)
10 mg/L	0,5 mg/L
30 mg/L	1,5 mg/L
100 mg/L	5 mg/L
300 mg/L	15 mg/L
500 mg/L	25 mg/L
1000 mg/L	50 mg/L

La gamme de concentration testée pour les nanoparticules poudres s'étend donc de 0,5 à 50 mg/L et correspond à une gamme de concentrations pour la formulation allant de 10 à 1000 mg/L avec une charge en nanoparticules fixée à 5 %.

Exposition à la solution testée 24h après ensemencement

Les cellules sont exposées aux solutions de formulations ou de nanoparticules 24h après ensemencement. Le milieu complet est aspiré, et 200 µL de solution d'exposition sont ajoutées en fonction des conditions d'expérience dans chaque puits. Les plaques sont incubées à 37°C, 5% CO_2 pendant 72h jusqu'à la prochaine lecture de densité optique.

Comptage de N après 72h d'exposition

Le comptage du nombre de cellules est répété selon le même mode opératoire que pour N_0, comme décrit précédemment. La densité optique des puits de cellules contenant les toxiques ont été évaluées 72h après exposition. Le taux de croissance est calculé en rapportant les valeurs de densité optique DO à 72h après exposition aux formulations, aux valeurs obtenues dans les cultures de cellules seules DO_0 : il est le coefficient directeur de la droite d'équation $\ln\left(\frac{DO}{DO_0}\right) = f(t)$. L'$EC_{50}$ est calculée à l'aide du logiciel Sigmaplot selon l'équation

$$y = \min + \frac{(\max - \min)}{\left(1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)\right)^{(-\text{Hillslope})}} .$$

3.2 Traitement des données

Toutes les données quantitatives ont été exprimées en moyenne ± erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Chicago, IL). Un test de normalité de Shapiro-Wilk, avec un p = 0,05 comme valeur de rejet, a été utilisé pour tester la distribution normale des données avant une analyse plus poussée. La significativité des différences entre échantillons multiples présentant une distribution normale a été recherchée par une analyse de variance suivie par un test post hoc de Holm-Sidak ou, en cas de distribution non normale, par une analyse de Kruskal-Wallis de la variance sur les rangs suivie

par un test posthoc de Tukey. Les comparaisons par paires ont été effectuées à l'aide du test de Student ou, en cas de variance inégale, du test de Mann-Whitney. La significativité statistique des différences a été acceptée pour * p <0,1 ; ** p <0,01 ou *** p <0,001. Aux fins du calcul de la valeur EC_{50}, les données ont été ajustées à un modèle sigmoïde à trois paramètres de la relation dose-réponse selon l'équation :

$$y = b + \frac{a - b}{1 + 10^{(logEC_{50} - x)}}$$

Où *y* est le taux de croissance des cellules MCF-7 en présence de formulation, *x* est le logarithme de la concentration en formulation et l'EC_{50} la concentration de toxique correspondant à 50% de l'effet maximal.

3.2.1 La lignée de poisson SAF-1

Ces tests ont été réalisés par le laboratoire TOXEM au Havre.
Les cellules de poisson utilisées sont des SAF-1, des fibroblastes de nageoire dorsale de daurade (*Sparus aurata*) (Bejar, Borrego & Alvarez 1997). Elles sont cultivées en présence de leur milieu complet (L15 Liebovitz's additionné de 15% de SVF, de 4 mM de L-glutamine, de pénicilline 100 U /mL et de streptomycine 0,1 mg/mL) dans l'étuve à 25°C.

Après décongélation, les cellules ont été amplifiées afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules pour l'expérimentation. Les cellules ont été ensuite ensemencées en plaque 96 puits à une concentration de 5000 cellules/puits dans 90 µL de milieu complet (en triplicat), puis incubées 24h à 25°C. Après incubation, les cellules ont été traitées avec les formulations ou nanoparticules à différentes concentrations. Les cellules ont été ensuite incubées à 25°C pendant 4 jours.

Test au Cell Tracker Green
La viabilité cellulaire est évaluée à l'aide du réactif Cell Tracker vert CMFDA (5-diacétate chlorométhylfluorescéine). Ce réactif non fluorescent est converti en produit fluorescent au sein des cellules à la suite de l'activation d'estérases. Une fois clivé par ces enzymes, il reste retenu par les cellules vivantes.

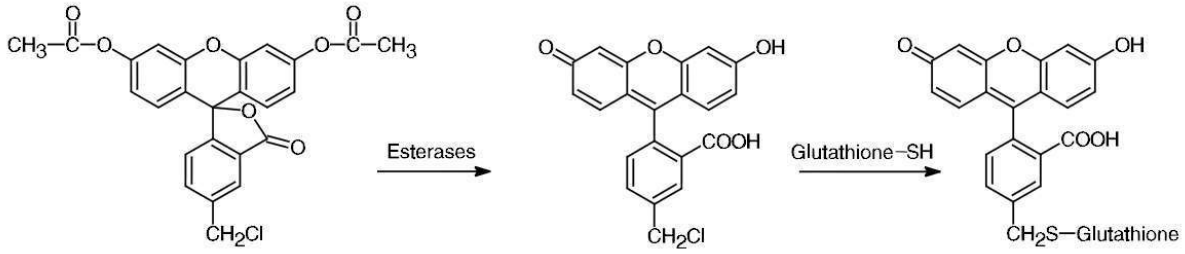


Figure 29 - Les deux réactions intracellulaires du CellTracker Vert, CMFDA.

La viabilité cellulaire a été observée 96 heures après le traitement par ajout du réactif Cell Tracker Green CMFDA à 1 µM dans un milieu sans SVF dans chaque puits. Les cellules ont ensuite été incubées 45 minutes à 25°C, puis 30 minutes à 25°C dans du milieu complet. Après cette incubation, le signal de fluorescence a été mesuré dans les conditions suivantes : excitation 485 nm, émission 528 nm (Invitrogen 2008).

3.3 Tests de génotoxicité et mutagénicité

Ces tests ont été réalisés par le laboratoire TOXEM au Havre, spécialisé dans le développement de tests *in vitro* et dans l'évaluation en screening de la mutagénicité et de la génotoxicité.

3.3.1 Evaluation de la génotoxicité par SOS Chromotest

a) Principe

Le SOS Chromotest est un test colorimétrique qui met en œuvre une souche génétiquement modifiée d'*Escherichia coli* (PQ37), chez laquelle a été réalisée une délétion partielle de la région portant le gène lacZ de la β-galactosidase ainsi qu'une fusion entre les gènes sfiA et lacZ (Quillardet & Hofnung 1985). Chez l'*Escherichia coli*, le système dit « SOS » est mis en action lors de dommages à l'ADN. Si un défaut sur l'ADN entraine un blocage de la fourche de réplication, la protéine RecA se lie à la zone monocaténaire bloquée et passe à l'état activé. A l'état activé, RecA déclenche l'hydrolyse sur un site particulier de la protéine LexA qui est une protéine se comportant comme le propre répresseur de synthèse de RecA et comme le répresseur d'une série de gènes intervenant dans la réparation d'ADN dont le gène sfiA. De ce fait, le principe du SOS Chromotest est le suivant : plus un composé est génotoxique, plus le taux d'altérations de l'ADN de la souche sera élevé, plus le système de réparation « SOS » sera induit et plus l'activité enzymatique β-galactosidase de la bactérie sera importante. Ainsi, à l'aide d'un réactif spécifique nous mesurons l'induction de cette activité : le SOS Induction Factor.

Dans le cadre de cette étude d'induction de la réponse SOS dans les bactéries, la souche PQ37 d'*Escherichia coli* a été exposée à différentes concentrations des substances testées, en présence et en l'absence d'une activation métabolique mammalienne (coincubation).

b) Protocole opératoire

Une culture de nuit de la souche PQ37 dans du milieu LB additionné d'ampicilline (30 µg/mL) est ensemencée à 37°C sous agitation à 250 rpm.

Sans bioactivation

Cette préculture est diluée dans du milieu LB de façon à obtenir une DO comprise entre 6 – 8.10^6 CFU/mL. Dans une microplaque 96 puits est distribué 190 µL de la culture et 10 µL de l'échantillon de formulation de concentration variable produits à tester.

Avec bioactivation

Les cellules sont additionnées au mélange d'activation S9 à 30%. Celui-ci est préparé dans une solution tampon (KCl 33mM, $MgCL_2$ 8mM G-6-P 5mM, NADP mM, NaH_2PO_4 10mM). Il est ensuite redilué environ 7 fois. Dans chaque puits est ajouté 190 µl de ce mélange et 10 µL de l'échantillon de formulation de concentration variable à tester.

Les plaques sont exposées 3 heures à 37°C sous agitation (250 rpm). Elles sont ensuite centrifugées 20 min à 1200 x g à 37°C et le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension dans 200 µl de tampon de resuspension. Celui-ci est préparé à partir de 4,85 g de tris (hydroxy-methyl) aminométhane dans 200 mL avec eau MQ et le pH est ajusté avec de l'acide chlorydrique. Puis 100 µl sont transférés dans les puits vides de la plaque. Selon l'activité enzymatique mesurée, 100 µL de tampon SOS Chromogen (400 mL de Méthanol, 5 mL de Toluène, 100 mL de N, N-dimethyl formamide dans 1L avec eau MQ ajustement du pH aux alentours de 7,8) ONPG (4 mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) ou PNPP (1 mg/mL de p-nitrophenyl phosphate) sont ajoutés et laissés incuber 1 à 2 heures (selon la coloration) à 37°C, 100 rpm. La DO est lue à 420 nm.

3.3.2 Evaluation de la génotoxicité à l'aide du test "micronoyaux" sur cellules CHO

a) Principe

Le but du test de numération des micronoyaux est d'évaluer la capacité de molécules chimiques à induire des dommages primaires à l'ADN sur une lignée cellulaire Chinese Hamster Ovary (CHO) ('OECD Guideline 487 for the testing of chemicals - In Vitro Micronucleus Test' 2004). Les micronoyaux se définissent comme des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers perdus par le noyau cellulaire au cours de la mitose et formant de petites entités bien individualisées dans le cytoplasme des cellules. Ils proviennent de cassures chromosomiques ou d'anomalies du fuseau mitotique, et reflètent une action génotoxique directe ou indirecte qui aboutissent tous deux à l'apparition de mutations chromosomiques stables et héréditaires et/ou à des anomalies du nombre de chromosomes (effet aneugène).

Le test in vitro de numération des micronoyaux est un test à court terme de génotoxicité qui permet d'identifier les agents chimiques clastogènes, c'est- à-dire capables d'induire la formation de cassures doubles-brins dans des cellules ou des anomalies du nombre de chromosomes. Selon les guidelines de l'OCDE 487, le test de micronoyaux a été réalisé sur la lignée cellulaire CHO sans blocage à la cytochalasine B. Afin de déterminer les concentrations à utiliser pour le test de micronoyaux, l'évaluation de la cytotoxicité est réalisée parallèlement au test de numération des micronoyaux. L'exposition de cellules en culture à différentes

concentrations de molécules pures ou en mélange permet la détermination de l'EC_{50} (dose létale induisant 50% de mortalité) dans le cas où celles-ci présentent des propriétés cytotoxiques. Basée sur la détection de l'activité mitochondriale des cellules, l'utilisation d'un réactif coloré (WST-1) (Roche 2006) constitué de sel de tétrazolium modifié permet de quantifier la quantité de cellules vivantes via une réaction colorimétrique.

b) Culture et traitement des cellules CHO

Etude de la viabilité cellulaire

Cette étude permet de déterminer les concentrations à utiliser pour le test de micronoyaux, la concentration maximale ne devant pas induire plus de 60% de mortalité.

Ensemencement des cellules

Après décongélation, les cellules ont été amplifiées afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules pour l'expérimentation. Les cellules ont été ensuite ensemencées en plaque 96 puits à 7000 cellules par puits dans 100 µL de milieu frais contenant du SVF puis incubées 24h à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO_2.

Traitement des cellules et incubation

Après cette incubation, les cellules ont été traitées avec la molécule à tester avec et sans fraction S9 à différentes concentrations. Les cellules ont été ensuite exposées 6h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2. Après remplacement du milieu par du milieu frais exempt des molécules à tester et les cellules ont été remises à incuber 18h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2.

Test au WST-1

Après cette incubation, la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du réactif WST-1 (10 µL/puits). Les cellules ont été ensuite incubées 4h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2. Après cette incubation, l'absorbance a été mesurée à 450 nm et à 620 nm.

Détermination du % de la viabilité

$$\%\ de\ viabilité = \frac{Absorbance\ 450 - 620\ dans\ le\ puits\ traité}{Absorbance\ 450 - 620\ dans\ le\ puits\ contrôle}\ x\ 100$$

c) Numération des micronoyaux

Ensemencement des cellules

Les cellules ont été ensemencées en lame LabTek 8 puits à 20000 cellules par puits dans 250 µL de milieu frais contenant du SVF puis incubées 24h à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO_2.

Traitement des cellules et incubation

Après cette incubation, les cellules ont été traitées avec la formulation à tester avec et sans fraction S9 à différentes concentrations. Les cellules ont été ensuite exposées 6h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2. Le milieu a été ensuite remplacé par du milieu frais exempt des molécules à tester et les cellules ont été remises à incuber 18h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2.

Fixation cellulaire

Après cette incubation, les cellules ont été rincées au PBS, pré-fixées avec une solution de méthanol/acide acétique (3V/1V) 30 secondes, puis fixées avec une solution d'éthanol/acide acétique (3V/1V) pendant 10 minutes et rincées deux fois dans du PBS. Les cellules ont été ensuite colorées au DAPI (1 µg/mL) pendant 15 min (3 rinçages au PBS avant montage).

Analyse des lames

Les lames ont été observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Les micronoyaux ont été comptés sur 2400 cellules des témoins négatifs et positifs ainsi que sur 2400 cellules de la concentration induisant moins de 60% de mortalité (800 cellules/puits en triplicats).

Un test de Student a été réalisé afin de déterminer si le nombre de micronoyaux observés à la concentration induisant moins de 60% de mortalité est significativement supérieur à celui observé dans le témoin négatif.

3.3.3 Evaluation de la mutagénicité

a) Principe du test d'Ames fluctuation

Le but de cette expérimentation est de déterminer le potentiel mutagène des substances testées. Ce potentiel mutagène est déterminé à l'aide du test d'Ames fluctuation (test d'Ames en milieu liquide). Le test d'Ames fluctuation, au même titre que le test d'Ames standard, s'est révélé être un excellent test pour déterminer le potentiel cancérogène d'une substance chimique en se basant sur ses propriétés mutagènes (Gee *et al.* 1998; Kamber *et al.* 2009).

Environ 10^7 cellules bactériennes His- de la souche TA98 (souche utilisée pour la détection de mutations « frameshift ») et TAMIX (Mix de souches spécifiquement développées pour la détection des mutations par substitution de base) de *Salmonella typhimurium* sont exposées pendant 90 minutes à chacune des 6 concentrations des échantillons A et B, dont on souhaite évaluer la mutagénicité. Cette exposition est réalisée avec et sans activation métabolique mammalienne. Les cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu indicateur de pH sans histidine. Cette culture est alors aliquotée dans 48 puits d'une plaque de 384 puits (chaque concentration étant réalisée en triplicat). Après 48 heures de culture, les cellules ayant retrouvé leur prototrophie histidine (Mutants révertants His+) se sont multipliées diminuant ainsi le pH du milieu de culture qui change alors de couleur.

Pour chacune des concentrations testées de la substance, le nombre de puits contenant des bactéries « révertantes » est alors dénombré puis comparé au témoin négatif après confirmation que les témoins positifs (le 2-nitrofluorene pour la souche TA98 et le 4-Nitroquinoline N-oxide pour la souche TAMIX) ont induit les réactions appropriées chez les souches correspondantes.

b) Protocole opératoire (*Xenometrix*)

Les souches de Salmonella typhimurium TA98 et TAMix sont mises en culture à 37°C dans 2mL de milieu « growth medium » (GTA-22GM), avec ou sans ampicilline (50 mg/mL) sous une agitation de 250 rpm. Le lendemain, 100 µL de cette culture est additionnée de 900 µL de « growth medium » et la DO est lue à 600 nm. La valeur obtenue multipliée par 10 doit dépasser la valeur de 2, tandis que celle d'un témoin sans bactérie ne dépasse pas 0,05.

Sans bioactivation, la culture bactérienne est diluée dix fois dans du milieu d'exposition (GTA-22EMC). Avec bioactivation, la culture (0,2mL) est diluée dans un mélange de milieu d'exposition (2mL), de mix S9 (0,4mL) détaillé plus haut. Dans chacun des deux cas, 240 µL de ce mélange est distribué dans des plaques 24 puits, additionné de 10 %L d'échantillons de formulations à étudier. Les plaques sont incubées 90 minutes à 37°C sous une agitation de 250 rpm. 2,8 mL de milieu indicateur (GTA-22IM) sont ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont transférées dans des plaques 384 puits. Celles-ci sont placées dans un sac plastique fermé afin d'empêcher l'évaporation, et incubées à 37°C pendant deux jours. Le nombre de puits révertants (jaunes) sont comptés pour chaque concentration.

3.4 Test d'embryotoxicité

Le but de cette expérimentation est de déterminer le potentiel toxique des échantillons testés (formulations et nanoparticules) en évaluant leurs capacités à perturber le développement embryo - larvaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

3.4.1 Principe du test de développement larvaire

Le test d'embryotoxicité sur larves d'huitres creuses est un test statique d'écotoxicité aquatique qui vise à déterminer l'induction d'anomalies du développement chez un certain nombre d'individus après exposition à différentes concentrations d'une molécule dont on veut évaluer la toxicité (American Society for Testing and Materials 1994; His, Seaman & Beiras 1997).
Les critères d'effet mesurés sur les larves, comme montré sur la Figure 30 sont :

- une altération de la coquille (charnière non rectiligne, valves inégales ou incomplètes)
- une hypertrophie du manteau
- le blocage à un stade embryonnaire

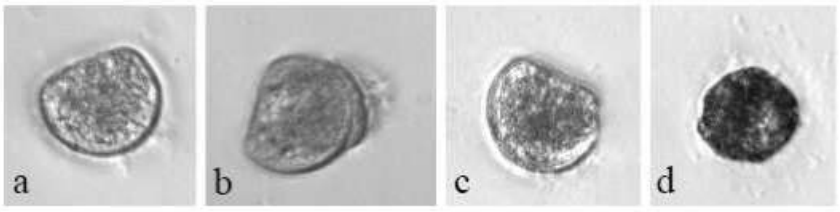


Figure 30 - Différentes anomalies du développement embryonnaire de l'huître: larve normale (a), anomalie du manteau (b), anomalie de la charnière (c) et blocage au stade embryonnaire (d).

Les résultats de ce test permettent d'exprimer une valeur de EC_{50} (Concentration efficace 50%), ainsi que de CMEO (Concentration minimale avec effet observé) et de CSEO (Concentration sans effet observé).

3.4.2 Protocole opératoire

Les géniteurs de *Crassostrea Gigas* matures proviennent de la Société Atlantique de Mariculture (SATMAR) de Gatteville-le-Phare (Manche).

Les gamètes ont été obtenus par scarification des gonades de femelles et de mâles matures. Après réhydratation des gamètes dans l'eau de mer de référence (60 minutes pour les ovocytes et 15 minutes pour les spermatozoïdes), les fécondations ont été réalisées en eau de mer de référence dans les proportions suivantes : 5 à 10 spermatozoïdes pour un ovocyte. La suspension ainsi obtenue a été maintenue à 24°C sous une légère agitation pendant deux heures afin d'éviter la polyspermie. Les œufs fécondés ont été ensuite répartis dans les différentes concentrations d'échantillon à tester à raison de 100 œufs/mL. Chaque concentration testée a été réalisée en triplicat.

A l'issue d'une période d'incubation de 24h à 24°C, les larves ont été fixées et les anomalies larvaires ont été dénombrées de manière aléatoire sur 100 individus par réplicat.

Le taux résiduel d'anomalies dans le témoin eau de référence (témoin négatif) est fortement dépendant de la qualité des individus reproducteurs (donc des gamètes obtenus) : il est généralement inférieur à 40%. Le test est donc considéré comme valable si plus de 60% des larves sont normales dans les récipients témoins négatifs (Environment Agency 2007). De même, à chaque essai et pour chaque ponte, l'embryotoxicité du sulfate de cuivre est parallèlement déterminée en tant que témoin positif pour valider les résultats obtenus.

Dans le cadre de cette étude, les larves d'huîtres ont été exposées à des concentrations de nanoparticules allant de 0 à 600 µg/mL. Le témoin positif ($CuSO_4$) a induit les réactions appropriées.

Partie 3 : Résultats et Discussion

Nous avons dans le cadre de cette thèse élaboré des formulations cosmétiques type crèmes solaire, contenant deux types de nanoparticules de TiO_2, différant par leur traitement de surface. Ces émulsions ont été développées selon un protocole réalisé à l'échelle du laboratoire, en s'inspirant des caractéristiques des crèmes solaires huile-dans-eau commerciales.

Nous présenterons donc le procédé de formulation suivi ainsi que chacune des émulsions étudiées au cours de ce travail, différant par le pourcentage d'incorporation des nanoparticules de TiO_2 ou par leur traitement de surface. Dans un deuxième point nous étudierons la microstructure des émulsions avec ou sans nanoparticules, à l'aide des techniques d'analyses variées telles que la rhéologie, la microscopie, la granulométrie et les mesures de potentiel zêta. Ensuite le vieillissement des émulsions dans des conditions classiques à température ambiante puis dans des conditions accélérées à 50°C sera décrit. L'évolution de la stabilité de l'émulsion et l'état d'agrégation des nanoparticules seront ainsi suivis dans le temps et les phénomènes de déstabilisation seront identifiés. Nous nous intéresserons aux nanoparticules extraites et aux modifications de surface apparues à la suite de vieillissement.

Dans une problématique d'évaluation des risques pour la santé et l'environnement, nous procéderons à l'analyse des propriétés toxicologiques des différents systèmes caractérisés, i.e. les formulations fraîches et vieillies pendant 40 jours à 50°C ainsi que les nanoparticules brutes, et extraites de formulations fraîches ou vieillies. Des lignées cellulaires humaines et de poisson seront exposées *in vitro.* Des éventuels effets de ces systèmes seront recherchés au niveau de l'induction de dommages à l'ADN par des tests de génotoxicité et mutagénicité ainsi que des effets embryotoxiques par la détection de potentielles anomalies de développement larvaire.

Chapitre 1 *Caractérisation physico-chimique des formulations et des nanoparticules*

1.1 Procédé de formulation

1.1.1 Exigences de la formulation cosmétique

La première contrainte de formulation a été dans notre contexte, de travailler avec des matières premières et des procédés proches de ceux utilisés pour la préparation des formulations mises sur le marché par les industriels de la cosmétique. Une seconde exigence était d'obtenir une émulsion relativement stable pour être représentative du cas industriel, mais qui devait néanmoins se déstabiliser dans un temps approprié à notre étude, de manière à pouvoir étudier le rôle des nanoparticules dans les phénomènes de déstabilisation. Enfin, ces formulations devaient être relativement simplifiées et contenant un minimum de composants cosmétiques, afin de pouvoir être compatibles avec les conditions de culture cellulaire, auxquelles elles seront soumises dans la suite de l'étude.

1.1.2 Nanoparticules dans la phase grasse

a) Protocole original

Jusqu'à présent, toutes les études s'étant intéressées aux caractéristiques physico-chimiques des écrans solaires contenant des nanoparticules d'oxyde métallique, ont été réalisées sur des produits commerciaux (Dussert, Gooris & Hemmerle 1997; Lewicka *et al.* 2011). Nous avons choisi une approche différente qui consistait à développer des formulations à l'échelle du laboratoire, avec ou sans nanoparticules, selon un protocole spécifique détaillé dans la section matériel et méthodes. Cela nous permettait ainsi de connaître exactement les caractéristiques spécifiques des nanoparticules introduites et de pouvoir plus facilement appréhender leur rôle. Le procédé visant à produire de telles formulations similaires à des produits commerciaux est décrit dans la Figure 31. Le protocole détaillé est décrit au 1.1.2 p.100. Une dispersion pâteuse de nanoparticules de TiO_2 est préparée dans le cetearylethylhexanoate, composant principal de la phase grasse (étape 1). Cette pâte est ensuite broyée à l'aide d'un broyeur tricylindre, jusqu'à ce qu'une fine dispersion soit obtenue (étape 2), et vérifiée par microscopie optique. Lorsque les deux phases de l'émulsion sont à 80°C, la phase B est ajoutée à la phase aqueuse sous agitation (étape 3) et la dispersion de nanoparticules est immédiatement incorporée toujours sous agitation (étape 4). L'émulsion avec nanoparticules est ensuite obtenue (étape 5).

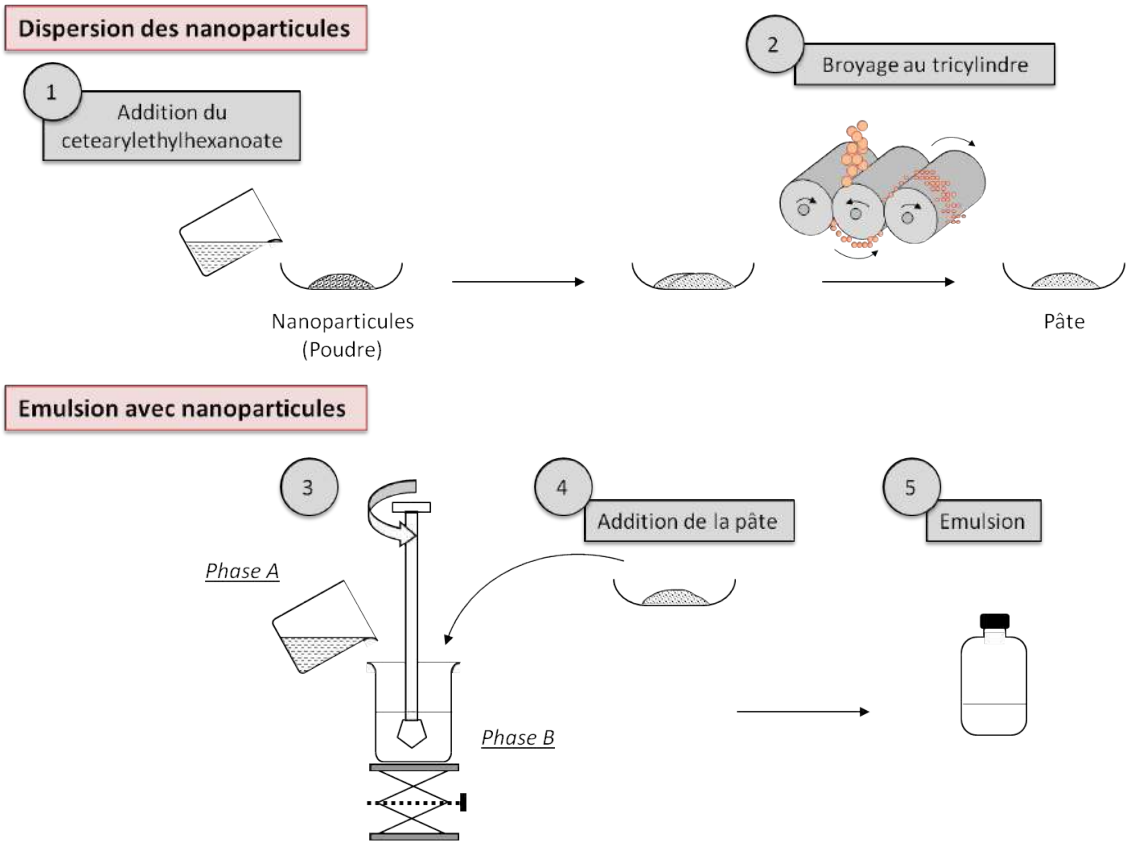


Figure 31 – Les différentes étapes du procédé de formulation pour des émulsions contenant des nanoparticules.

Selon ce procédé, plusieurs émulsions au procédé de formulation identique ont été obtenues, incluant ou non des nanoparticules. En conséquence, nous avons réussi à obtenir une émulsion sans nanoparticules (F-0) et des émulsions avec des nanoparticules au coating 1 *(alumina and triethoxycaprylylsilane)*, notée F-N1 et au coating 2 (*alumina, isopropyl titanium triisostearate and triethoxycaprylylsilane crosspolymer)* notée F-N2.

b) Pâte de nanoparticules

L'étape de broyage (étape n°2, Figure 31) de la pâte des nanoparticules permet une dispersion optimale des nanoparticules dans la formulation finale. Cette pré-dispersion permet, on l'a vu au paragraphe 2.3.3b) p.56, une meilleure qualité de la dispersion des nanoparticules au sein de l'émulsion (Nearn, Redshaw & Burgess 1996). En effet, cette dispersion, constituée de 40% en nanoparticules et 60% en cetearylethylhexanoate, a été préparée et broyée trois fois au tricylindre pour le coating 2. Comme on peut l'observer sur les micrographes de la Figure 32, représentant l'état de la dispersion avant et après broyage, celle-ci est beaucoup plus fine après broyage. Le nombre d'agrégats est réduit, la dispersion est désormais homogène et constituée de particules de tailles suffisamment fines pour être ajoutée à la formulation cosmétique. Le broyage est un procédé couramment utilisé dans l'industrie cosmétique utilisant des pigments. Si l'enrobage des nanoparticules est fragile et que le broyage utilisé est très puissant, il peut arriver que le traitement de surface soit endommagé. Néanmoins, compte tenu

du greffage chimique à la surface de nos particules, et du tricylindre utilisé, il est peu probable que le coating ait été altéré.

(a) **Dispersion avant broyage** (b) **Dispersion après broyage**

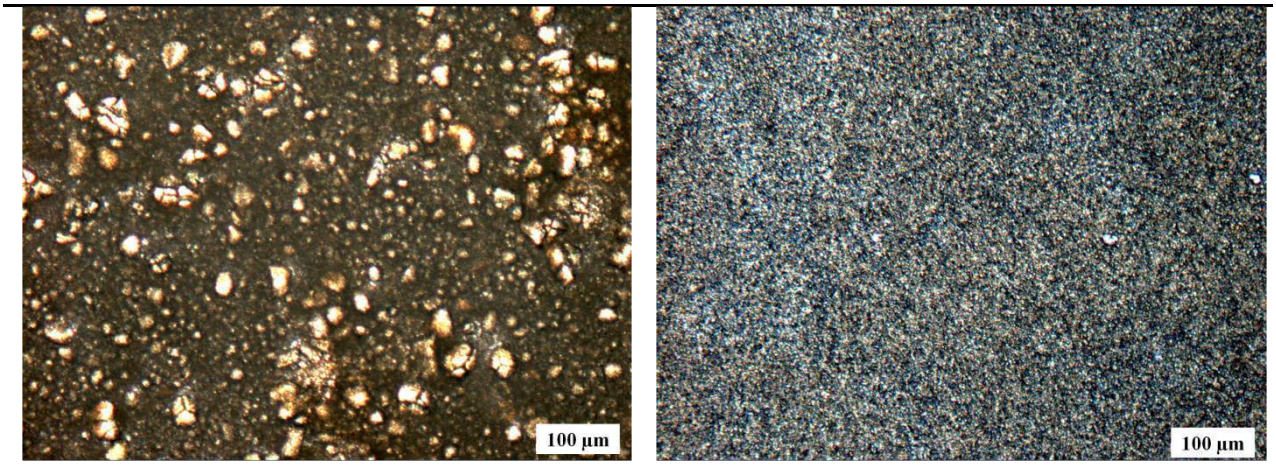


Figure 32 - Clichés microscopiques (x200) de la dispersion de nanoparticules dans l'ester cetearylethylhexanoate, avant (a) et après broyage (b) au tricylindre

On peut également constater par granulométrie l'influence du broyage sur la dispersion de nanoparticules. Pour ce faire, une dispersion des mêmes nanoparticules a été préparée dans le DMSO dans les mêmes proportions que pour la pâte de nanoparticules utilisée dans la formulation. La courbe de distribution de taille de la dispersion broyée trois fois de suite est représentée sur la Figure 33 .

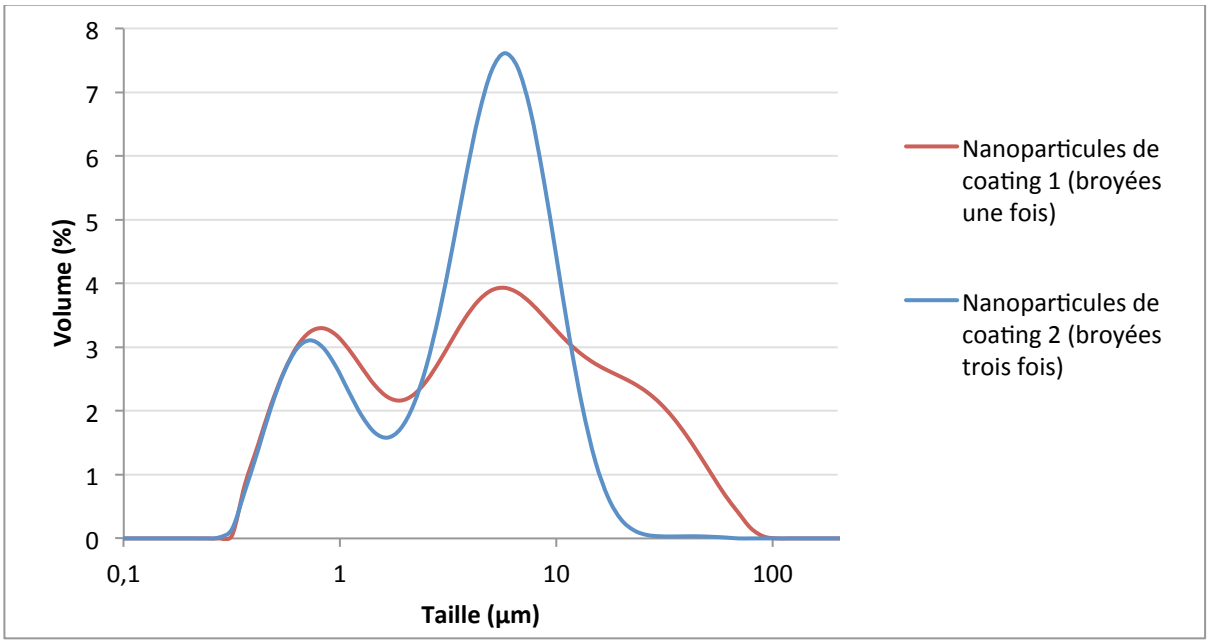


Figure 33 - Distribution de taille en pourcentage volumique des nanoparticules de TiO_2 (coating 1 et 2) dans le DMSO

Les courbes cumulatives (Figure 34) nous permettent de relever que lorsque les nanoparticules de TiO_2 de coating 2 ne sont pas broyées, environ 40% des particules sont supérieures à 10

µm. Le premier broyage permet de réduire ces agglomérats à 15%, et au troisième broyage il reste seulement 8% en volume d'agrégats supérieurs à 10 µm. Cela nous confirme bien que nous avons affiné la dispersion de particules afin de minimiser la présence d'agrégats au sein de la formulation. Le diamètre de Sauter D[3,2] vaut 2,6 µm pour la dispersion non broyée et prend la valeur de 1,6 µm pour les dispersions broyées une et trois fois. Pour les nanoparticules de coating 1, le diamètre de Sauter D[3,2] vaut 1,9 µm pour la dispersion broyée une fois.

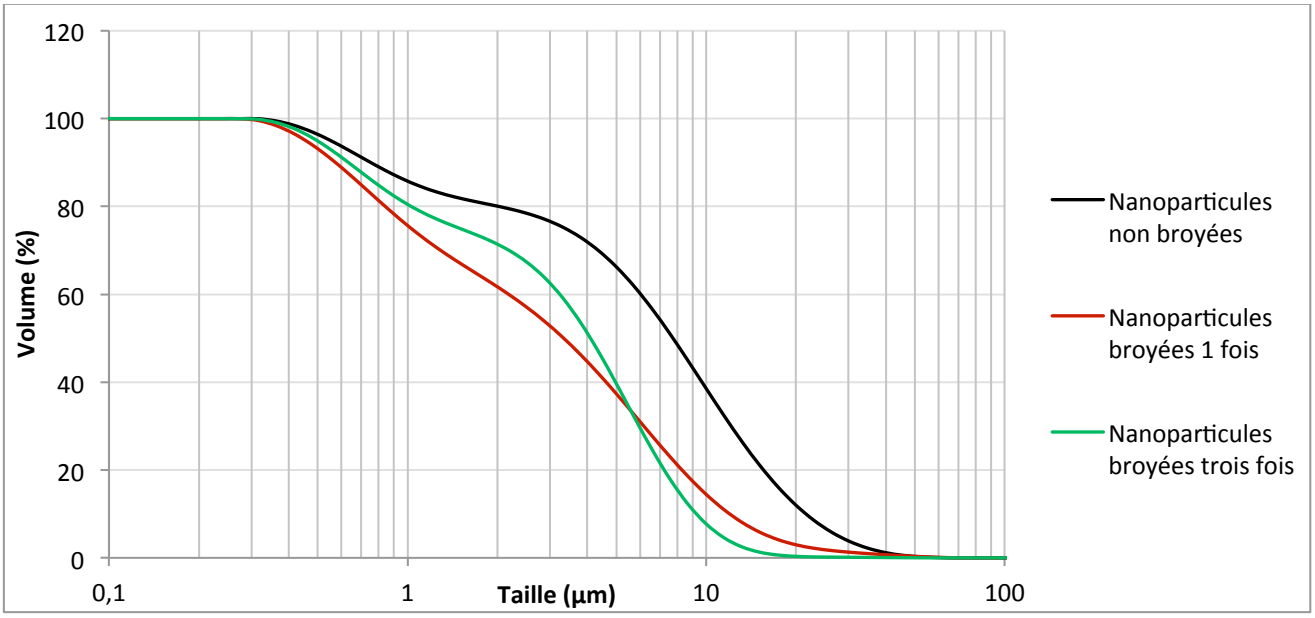


Figure 34 - Courbes cumulatives des nanoparticules de coating 2 dispersées dans le DMSO : non broyées (noir), broyées une fois (rouge) et broyées trois fois (vert)

1.1.3 Optimisation de différents paramètres

a) Formulation sans nanoparticules

La réalisation d'une formulation correspondant au cahier des charges a été relativement longue à mettre en place. En effet, la dispersion des gouttelettes observée au microscope pour la formulation initiale était très inhomogène comme le montre le cliché (a) de la Figure 35. La répartition des tailles de globules était polydisperse, avec des tailles pouvant atteindre 10 µm. L'émulsion présentait une importante floculation dès l'état initial et s'est avérée instable très rapidement avec une coalescence des gouttelettes. Afin de retarder cette instabilité, nous avons donc modifié le protocole en jouant sur différents paramètres. Nous avons augmenté les vitesses d'agitation pendant l'émulsification, puis travaillé sur les proportions d'émulsifiants. Nous avons choisi un rapport de 2,75/1,75 w/w% en Steareth 2/Steareth 21 plutôt que le rapport initial de 1,5/0,5 w/w%.

(a) Formulation initiale | **(b) Formulation optimisée**

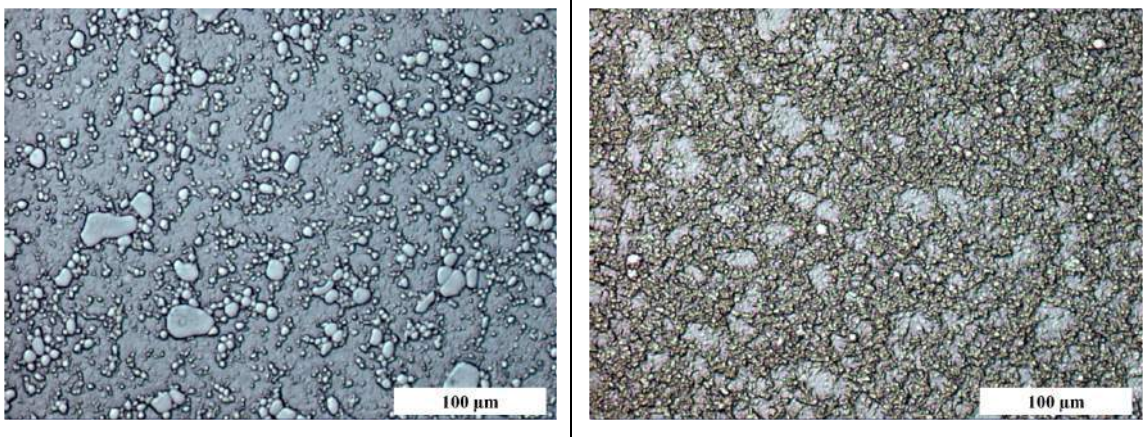


Figure 35 - Images microscopiques des formulations F-0 initiale (a) et optimisée (b)

Afin de réduire la consistance des crèmes, nous avons diminué de 0,3 à 0,1 % la quantité de polymère gélifiant. Les clichés microscopiques Figure 35 (b) montrent une nette amélioration de la dispersion pour la formulation finale F-0, en comparaison avec notre protocole initial : l'émulsion finale est beaucoup plus fine, les tailles de gouttelettes sont homogènes et ne dépassent pas les 3 µm.

b) Formulation avec nanoparticules : F-N1 et F-N2

Lors des premiers essais d'incorporation des nanoparticules au sein des formulations, celles-ci ont été intégrées à 5% en masse directement dans la phase grasse, pour être ensuite chauffées, et enfin émulsionnées avec la phase aqueuse. Nous avons testé le paramètre d'addition de la pâte de nanoparticules à la formulation avant ou après l'émulsification. Il apparaît que la dispersion est légèrement moins polydisperse lorsqu'on introduit la pâte après l'émulsion. De plus, de nombreux globules de grande taille sont présents lorsque l'émulsification se fait en présence des nanoparticules. Le protocole a donc été choisi en introduisant les nanoparticules après émulsion.

La répartition des gouttelettes est fine et homogène dans la formulation finale, avec une dispersion des nanoparticules régulière, comme le suggère la Figure 36.

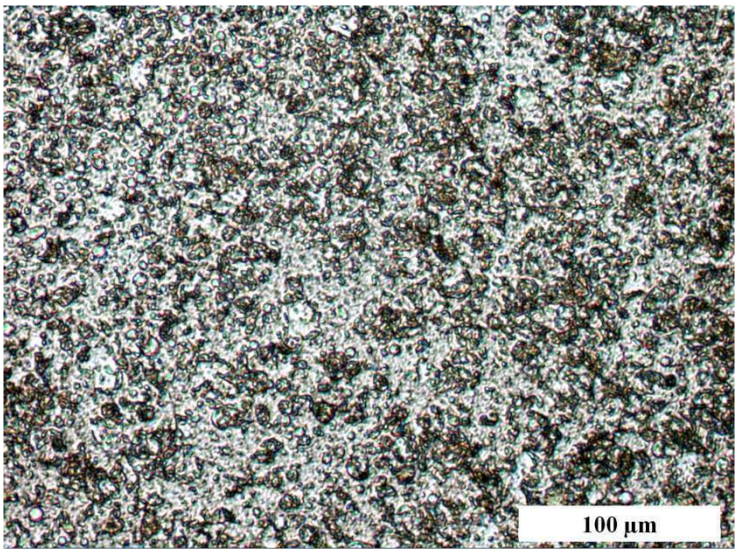


Figure 36 - Images microscopiques de l'émulsion F-N1 finale à 5% en nanoparticules à l'état initial

c) Formulation avec un pourcentage variable en nanoparticules : F'-N

Nous avons cherché à augmenter le pourcentage de nanoparticules au sein de la formulation afin de voir d'éventuels effets de la fraction volumique de particules, notamment dans l'analyse toxicologique. Avec les ingrédients de la formulation F-N (Tableau 5 p.101), il nous a été impossible d'augmenter les pourcentages massiques de nanoparticules. En remplaçant la paraffine par l'alcool gras, le cetearyl alcohol, nous avons réussi à incorporer jusqu'à 10% en nanoparticules de coating 2. Il faut alors s'attendre à des conséquences de l'ajout de cet ingrédient à la place de la paraffine sur les propriétés physico-chimiques de la formulation. En effet, l'ajout de cet alcool gras, couramment associé aux tensioactifs dans une émulsion cosmétique apporte une consistance et une viscosité de la crème plus importante. On peut s'attendre à des valeurs rhéologiques de modules élastiques plus élevés ; ce phénomène est en lien avec la formation de phases lamellaires résultant de cette association.

1.1.4 Comparaison avec des crèmes commerciales

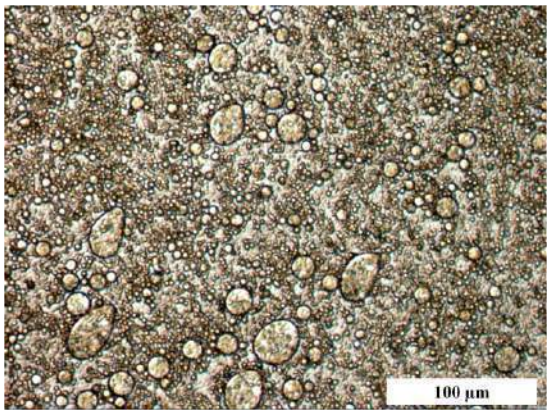
Nous avons comparé nos clichés microscopiques à ceux de crèmes commerciales faisant mention de la présence de dioxyde de titane sur l'étiquette du produit : les images sont représentées sur la Figure 37. Il est nécessaire de garder à l'esprit qu'au moment de ces recherches aucune législation contraignante n'imposait de mentionner la nature nanométrique ou non du dioxyde de titane introduit dans les formulations commerciales. On peut constater que ces clichés sont similaires à nos préparations, avec la présence de grosses vésicules (a), parfois des cristaux foncés de tailles relativement importantes (b) ou encore de particules fines et de coloration foncée (c). Cependant, nous ne disposons d'aucune information sur les types de particules utilisées (taille nanométrique ou non, traitement de surface), sur le type de protocole mis en œuvre pour leur dispersion dans l'émulsion ou encore sur leur proportion volumique par exemple.

(a) *Eau thermale*, Avène SPF 50

Principes actifs

Titanium dioxide : 10.78%

Zinc oxide : 2.40%

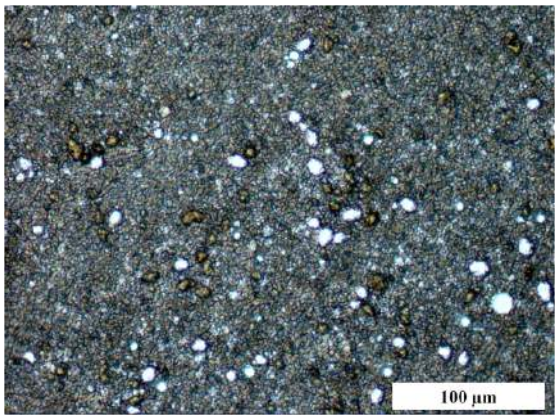


(b) *Anthelios XL*, La Roche Posay, SPF 50

Principes actifs

Titanium dioxide : 6%

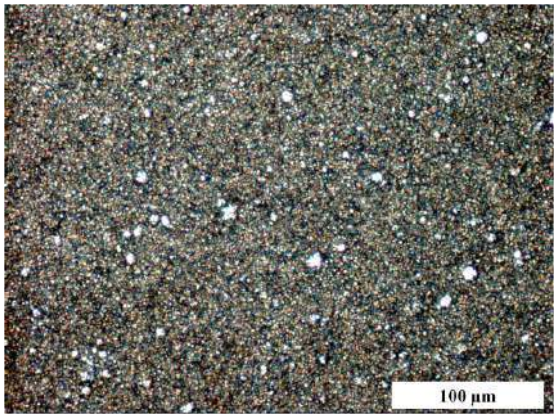
Zinc oxide : 5%



(c) *Solar expertise*, L'Oréal Paris, SPF 30

Principes actifs

Titanium dioxide



***(d) Nuxe Bio* SPF 50**

Principes actifs

Titanium dioxide

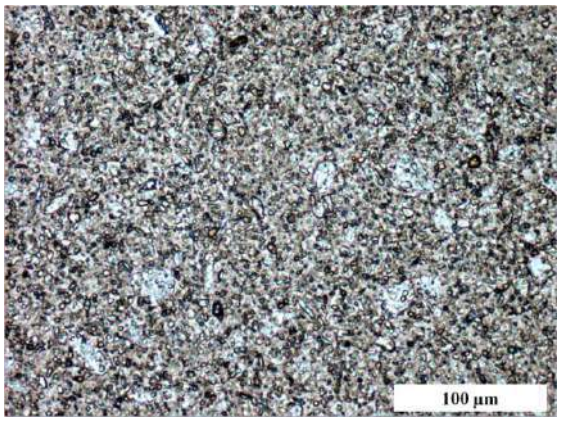


Figure 37 - Images microscopiques de crèmes solaires commerciales contenant du dioxyde de titane

Nous avons juste accès à la liste des ingrédients utilisés, et dans le cas des crèmes (a) et (b) à la quantité de leurs principes actifs. Les listes des ingrédients pour ces formulations sont denses et complexes. Les filtres UV utilisés sont exclusivement des filtres minéraux : le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc. Ces crèmes sont probablement formulées dans le but d'être transparentes pour des finis esthétiques. On peut donc supposer que les filtres minéraux utilisés sont probablement en partie des nanoparticules.

1.2 Microstructure des émulsions

Dans cette partie, nous décrirons la microstructure des émulsions, d'un point de vue granulométrique, rhéologique et électrostatique. L'étude est faite 72h après la préparation des crèmes, celles-ci ayant été conservées à température ambiante.

1.2.1 Emulsions sans nanoparticules

a) Granulométrie

Précautions de départ

Tout d'abord, il apparait nécessaire de prendre des précautions lors de l'interprétation des résultats de la distribution de taille des particules colloïdales. En effet, l'analyse granulométrique utilisée nécessite une dilution importante de l'émulsion dans l'eau suivie d'un traitement par ultrasons, ceci pour éviter les phénomènes de diffusion multiple et ne pas avoir à prendre en compte les interactions entre les gouttes. Or, lorsqu'on on augmente le volume de phase continue par dilution, la concentration des émulsifiants dans cette phase diminue. Les gouttes risquent de ne plus être stabilisées par les émulsifiants, et donc la répartition obtenue peut ne pas être représentative de la population effectivement présente dans l'échantillon. Un tel procédé de préparation peut être non représentatif de la distribution de la taille des gouttelettes dans l'émulsion initiale en vrac, et les résultats obtenus correspondent alors davantage à la capacité de dispersion de l'émulsion dans un milieu dilué (Brochette 1999).

De plus un paramètre important de la mesure granulométrique par diffusion statique de la lumière est la connaissance des indices optiques complexes de la phase dispersée et continue (cf 2.1.2 p.108). La partie imaginaire de l'indice optique complexe est le coefficient d'absorption, et la partie réelle est l'indice de réfraction (Kippax 2005). Cependant, il n'est pas toujours aisé de déterminer avec précisions ces grandeurs.

L'absorption d'un matériau dépend de sa composition moléculaire, et de la présence de chromophores au sein de la structure moléculaire : ce sont eux qui vont provoquer l'absorption de la lumière à la longueur d'onde utilisée dans la mesure de diffraction laser. Bien que les propriétés moléculaires de la matière soient importantes dans la définition de l'absorption utilisée dans l'analyse de diffraction de laser, la nature physique des particules doit également être prise en considération. En particulier, si les particules ont une structure de surface rugueuse, ou avec une structure interne complexe, l'absorption sera plus élevée que celle prédite sur la base de l'analyse spectroscopique de la matière. Pour cette raison, la mesure spectroscopique de l'absorption de la matière ne donne pas toujours la valeur d'absorption correcte pour une utilisation dans l'analyse de la diffraction laser.

Dans le cadre d'une mesure de diffraction de laser, l'absorption d'un matériau doit généralement être spécifiée. S'il est possible de voir les particules sous un microscope alors leur apparence peut souvent être utilisée pour estimer cette valeur de l'absorption : des latex auront une absorption de 0, les émulsions de 0,001, les poudres cristallines de 0,01, les poudres légèrement colorées de 0,1 et les poudres très colorées de 1. Dans notre cas pour les émulsions avec ou sans nanoparticules, nous avons mesuré l'indice de réfraction mais avons

choisi arbitrairement le coefficient d'absorption de 0,1 qui correspond à la valeur pour des émulsions opaques compte tenu de leurs compositions et de la présence de particules opacifiantes. En effet, lorsqu'on observe au microscope les émulsions avec nanoparticules, de nombreuses particules foncées sont visibles.

Résultats

Le premier critère de caractérisation de la qualité de l'émulsion est, comme on l'a vu précédemment, la distribution de taille des gouttelettes (cf 1.3.1. p. 39). La Figure 38 présente la distribution granulométrique pour l'émulsion sans nanoparticules F-0, 72h après préparation : la courbe résultante apparaît comme une distribution bimodale avec deux gammes de taille principales : 0,2 et 2,5 µm. Les courbes cumulatives donnent qu'environ 58% des gouttelettes sont plus petites que 2,5 microns et seulement 0,4% des gouttelettes ont une taille supérieure à 10 µm. Le diamètre moyen en surface D [3,2] est de 1,33 µm, et constitue une preuve supplémentaire que cette émulsion est principalement constituée de petites gouttelettes. Les micrographes optiques correspondants, présentés précédemment sur la Figure 35 (b) p.135, confirment clairement la présence importante de fines gouttelettes.

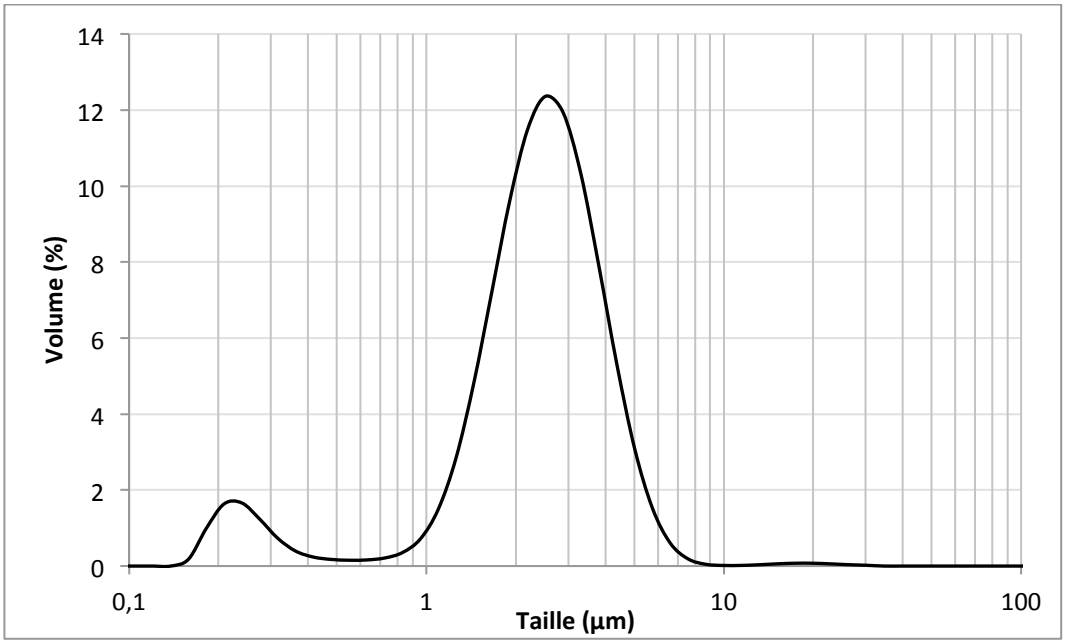


Figure 38 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-0 à l'état initial

b) Visco-élasticité

Cette émulsion est également caractérisée par l'analyse viscoélastique dynamique. Les Figure 39 et Figure 40 montrent les résultats du test de balayage en déformation de F-0 avec l'évolution de G', G'' et tan(δ) en fonction de la déformation. Ces valeurs restent constantes, tant que l'amplitude de déformation maximale reste inférieure à une valeur critique γ_c correspondant à la limite de la région viscoélastique linéaire, caractéristique d'une structure

inchangée et non modifiée par le cisaillement. La déformation critique a une valeur de 2,16 % dans cet exemple. Dans cette région linéaire, les seules mesures de G', G'' et γ_c sont suffisamment discriminantes pour fournir des informations caractéristiques de l'échantillon.

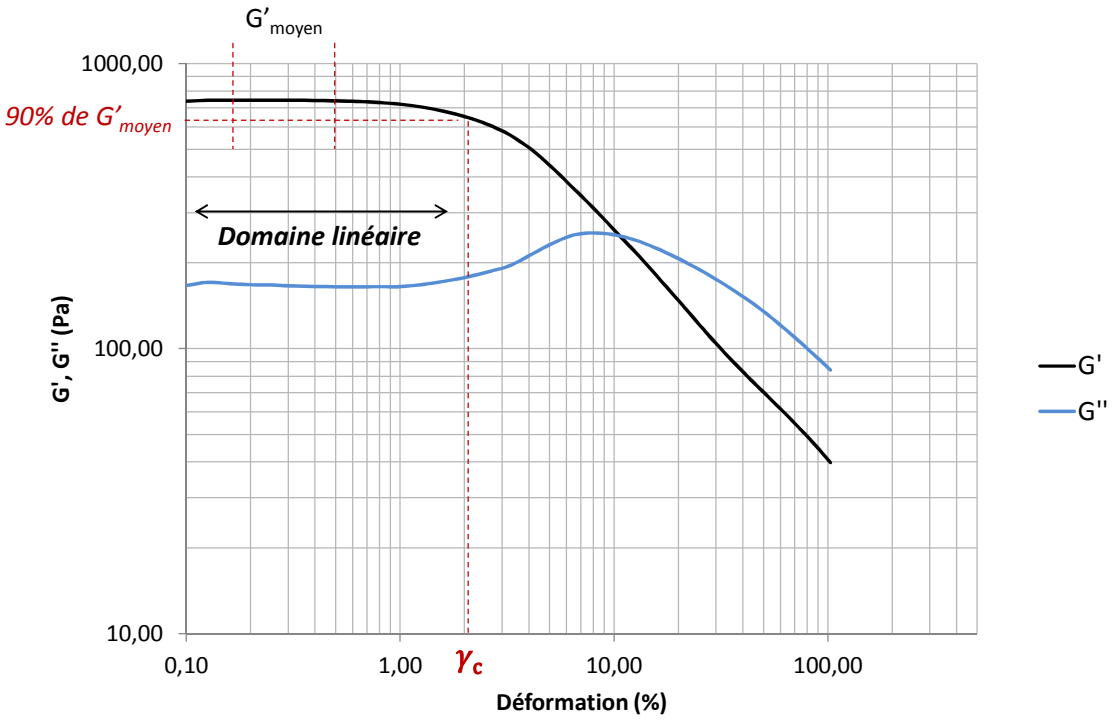


Figure 39 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de G' et G'' à l'état initial

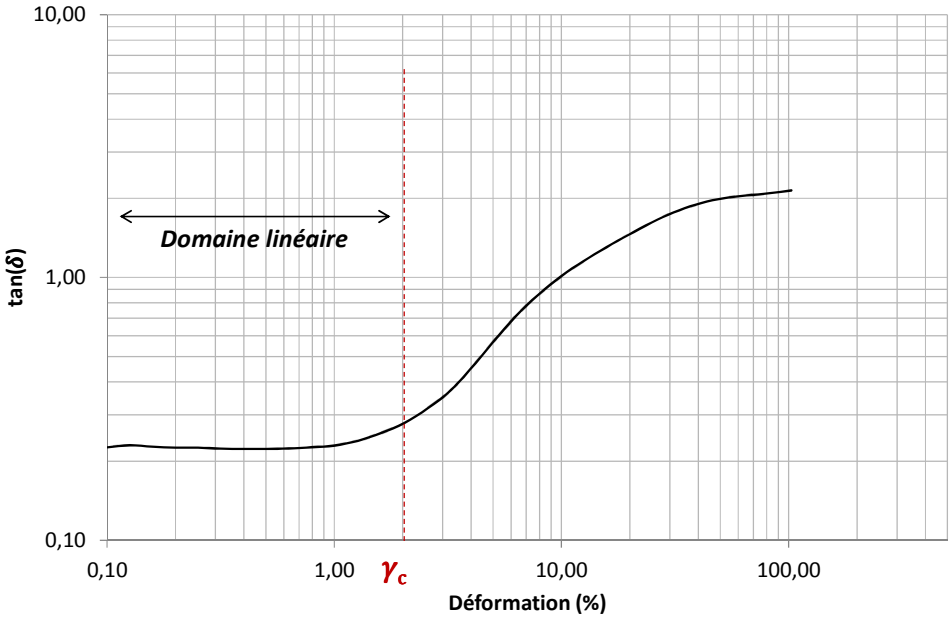


Figure 40 - Balayage en déformation de F-0 : représentation de tan(δ) à l'état initial

Pour F-0, le module élastique G' est beaucoup plus grand que le module visqueux G'' et tan(δ) reste inférieur à 1, ce qui illustre un comportement prédominant élastique (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas 2005). Lorsqu'elle est soumise à une déformation croissante, la structure de

l'émulsion résiste à la déformation jusqu'à la déformation critique γ_c, où G' commence à décroître, et G'' augmente simultanément. Des réarrangements entre gouttes sont induits par le cisaillement. Au-delà de ce domaine, les modules changent fortement, la structure de l'émulsion se fragilise progressivement et se comporte de plus en plus comme un liquide. Ce comportement illustre clairement l'affaiblissement de la structure de l'émulsion. Au point de croisement G' - G'' (γ = 10%), le module de perte est égal au module de conservation, et tan(δ) est égal à 1. Au-delà de ce point de croisement, le matériau a un comportement liquide de plus en plus marqué. Ce sont des plans entiers de gouttes qui glissent les uns sur les autres, diminuant ainsi les frottements visqueux. Ce comportement viscoélastique observé pour F-0 est appelé « weak strain overshoot » (Hyun *et al.* 2002), démontrant ainsi une structure gel, probablement dû à l'agent gélifiant utilisé en phase aqueuse de l'émulsion.

c) Potentiel Zêta

Le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité des colloïdes tels que les émulsions.

Nous avons cherché à évaluer la stabilité électrostatique de l'émulsion, en mesurant son potentiel zêta à différents pH. On obtient la Figure 41 pour l'émulsion F-0.

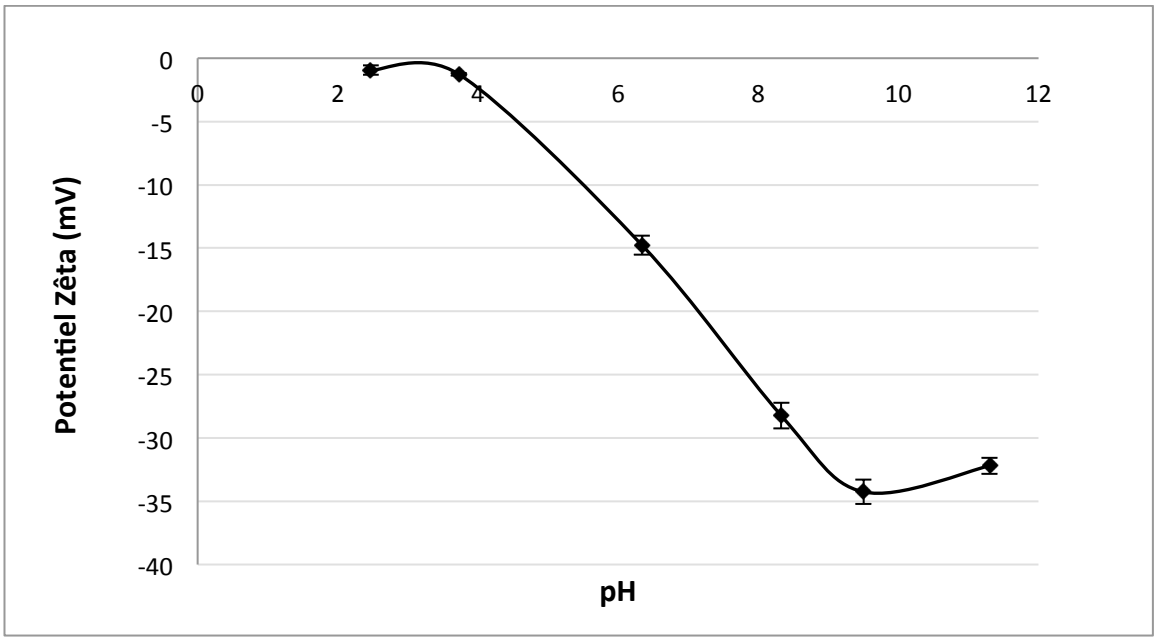


Figure 41 - Evolution du potentiel zêta avec le pH pour l'émulsion F-0 à l'état initial

On constate que pour un pH supérieur à 4, l'émulsion a un potentiel zêta négatif sur tout le reste de la gamme de pH étudiée et augmente, en valeur absolue, avec le pH. Cela signifie que les gouttelettes d'huile sont chargées négativement dans l'eau. Entre pH 2 et 4, le potentiel zêta est nul et correspond au point isoélectrique : la densité d'adsorption d'ion H^+ à la surface de la gouttelette est égale à celle d'ions OH^-. Cela correspond à la zone la plus instable où les gouttelettes sont probablement agrégées les unes avec les autres. La technique et les modèles

utilisés pour interpréter les résultats sont adaptés à des objets dont les charges se situent exclusivement à l'interface.

Afin de comprendre à quel ingrédient de l'émulsion étaient dues ces valeurs négatives et cette évolution, nous avons procédé à la mesure du potentiel zêta de la phase grasse seule émulsionnée sans tensioactifs dans l'eau (Figure 42). On remarque que sur toute la gamme de pH étudié, les valeurs du potentiel zêta sont négatives, et le sont d'autant plus que le pH augmente.

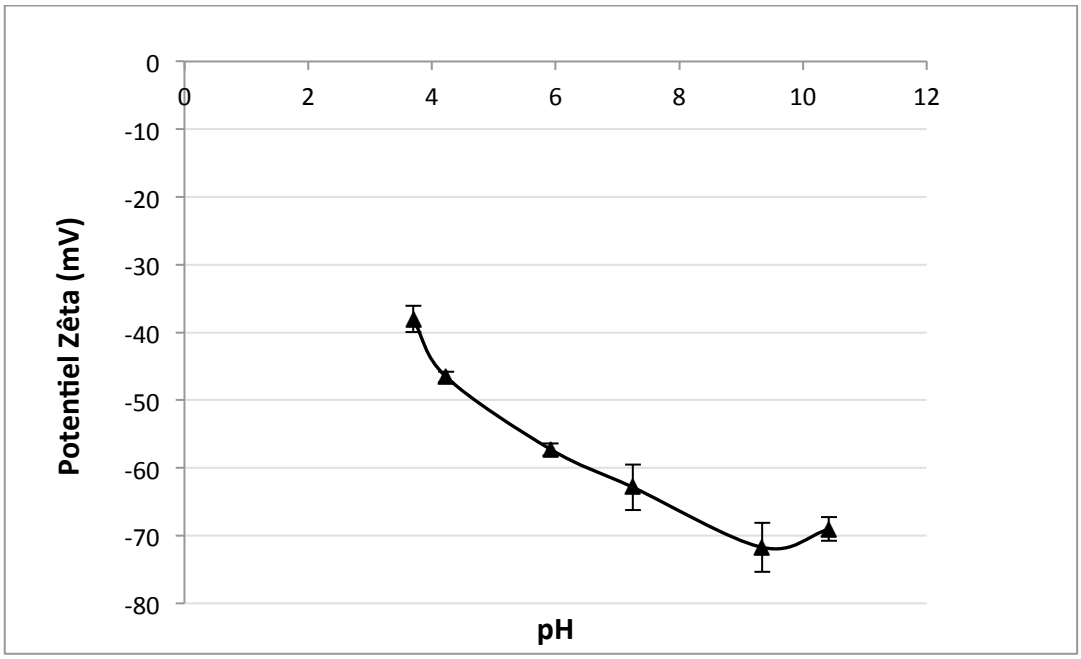


Figure 42 - Evolution du potentiel zêta de la phase grasse dans l'eau à l'état initial

La raison de cette valeur négative est liée au fait que les ions hydroxyle libérés par l'équilibre de dissociation-association des molécules d'eau, sont adsorbés à l'interface huile-eau (Marinova *et al.* 1996) et sont ainsi responsables de la charge négative de la gouttelette d'huile.

L'addition des conservateurs ne modifie pas les valeurs de potentiels. En revanche, lorsqu'on rajoute successivement le tensioactif Steareth 21 puis l'agent gélifiant ainsi que la base neutralisante, l'allure de la courbe n'est pas modifiée, mais les valeurs du potentiel zêta, en valeur absolue, sont diminuées (Figure 43).

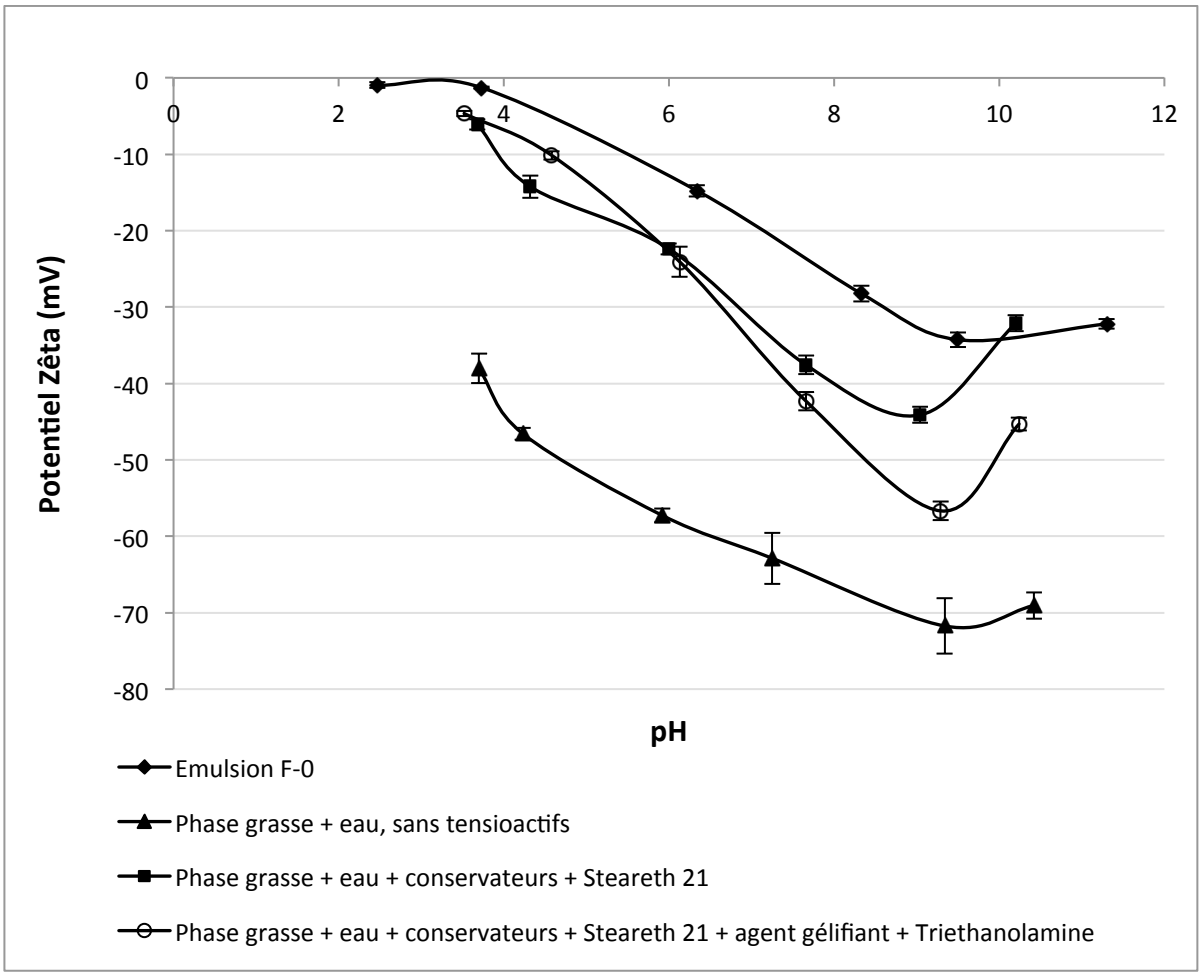


Figure 43 - Evolution du potentiel Zêta avec le pH en fonction des ingrédients de la formulation

En effet, lorsque des chaines de tensioactif non ionique sont adsorbées à l'interface, il a été montré que le potentiel zêta diminue (Marinova *et al.* 1996). En s'adsorbant à l'interface, ils diminuent la surface disponible pour que les ions HO^- s'adsorbent et font donc chuter la valeur du potentiel zêta. De plus, la présence de tensioactifs non ioniques est également liée au signe négatif du potentiel zêta, ce qui s'explique par l'existence des groupements oxyde d'éthylène capables de créer des liaisons hydrogène avec les groupements HO^- (de Morais *et al.* 2006). L'ajout de l'agent gélifiant semble légèrement modifier les valeurs des potentiels zêta correspondant à un haut pH, en les diminuant. On peut supposer que ce phénomène résulte d'un phénomène d'écrantage c'est à dire une saturation de l'interface. Aux pH fortement basiques les ions OH^- s'adsorbent de plus en plus à la surface des gouttelettes et l'interface devient plus rigide. Il n'existe alors plus d'interactions entre le film interfacial et le reste des ions en suspension, et ainsi le potentiel zêta diminue. On rappelle que le polymère acrylate de l'agent gélifiant s'ionise à pH > 6, ce qui entraine une augmentation de la valeur absolue du potentiel zêta. Enfin, on peut aussi se poser la question de l'effet de la viscosité due à l'agent gélifiant, qui, via une diminution de la mobilité électrophorétique, pourrait diminuer la valeur apparente du potentiel zêta. A l'échelle de dilution de la mesure, cet effet n'est pas observé.

Le caractère négatif du potentiel zêta est donc régi par la présence de l'ester cetearyl ethylhexanoate de la phase grasse et des tensioactifs ethoxylés, qui interagissent avec les ions hydroxyle.

Cette évolution du potentiel zêta avec le pH permet donc de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la stabilisation des gouttelettes d'huile dans l'émulsion.

Plus le potentiel est grand en valeur absolu et plus la répulsion électrostatique est importante : on admet généralement que lorsque le potentiel zêta est supérieur en valeur absolue à 30 mV, la suspension colloïdale est stable électrostatiquement. Au pH de notre émulsion, qui est de 6,5 après fabrication, la valeur du potentiel zêta correspondant est d'environ -15 mV. On peut donc supposer en termes de répulsions électrostatiques, que les gouttelettes de notre émulsion ne sont pas entièrement stabilisées, et peuvent être ainsi sujettes à des phénomènes de floculation ou d'agrégation au cours de leur vieillissement. C'était l'une des exigences de la formulation.

1.2.2 Emulsions avec nanoparticules

Nous nous intéressons ici aux émulsions contenant des nanoparticules avec deux types de traitements de surface hydrophobes F-N1 et F-N2, afin de déterminer l'impact de ces particules sur la microstructure de l'émulsion.

a) Emulsions avec les nanoparticules de coating 1 : F-N1

Granulométrie

Pour la formulation F-N1, la Figure 44 p.147 indique que le produit présente une distribution de taille plus large et polydisperse que pour F-0 (Figure 38 p.141), avec une répartition de taille allant de 0,1 à plus de 30 µm. Une nouvelle population de particules de plus grande taille apparaît : 43% des particules colloïdales sont plus petites que 2,5 µm, tandis que 24% d'entre elles sont plus grandes que 10 microns. Cependant, le diamètre de Sauter est de 0,83 µm, ce qui est bien inférieur à celui de la formulation sans nanoparticules. Cela signifie que les grosses particules apparaissent majoritaires en pourcentage volumique, car elles occupent un volume plus important, mais l'émulsion est malgré tout principalement constituée de fines particules colloïdales. La courbe granulométrique correspond à la répartition à la fois des gouttelettes de l'émulsion et des nanoparticules elles-mêmes au sein de l'émulsion. La mesure ne nous permet pas en effet de faire la distinction entre les deux types de particules colloïdales (Figure 44).

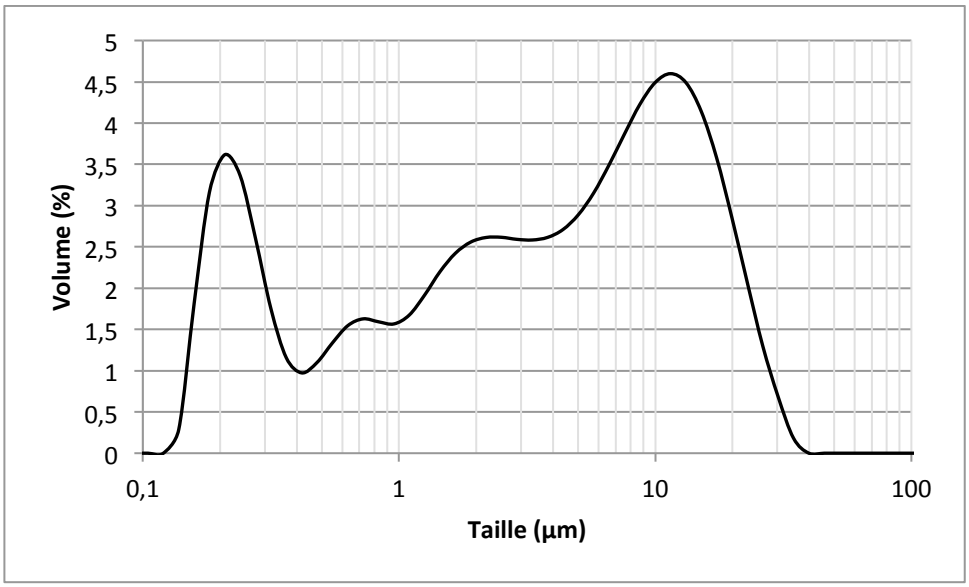


Figure 44 - Distribution de taille des particules colloïdales en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N1 à l'état initial

Des essais ont été menés afin de surpasser ce problème, avec l'idée de casser l'émulsion par une forte dilution suivie d'une sonication dans l'éthanol, bon solvant de la phase grasse et miscible également dans la phase aqueuse, pour ne visualiser que les particules de TiO_2. Cependant il n'en est pas sorti de résultats probants. D'autres techniques d'analyse pourraient être envisagées afin de distinguer les distributions de taille des particules solides de celles des gouttelettes liquides. Une étude a notamment évalué des systèmes de gouttelettes contenant des particules (Pellegrino, Videen & Pinnick 1997). Les analyses ont été réalisées sur les fluctuations de l'intensité de lumière diffusée des gouttelettes de glycérol de taille micrométrique contenant des inclusions de latex sphériques. En effectuant deux analyses de corrélation de photons distinctes : une autocorrélation et une corrélation croisée sur les intensités diffusées, ils se sont intéressés à obtenir des informations sur le système de particules, à savoir déterminer les dimensions des inclusions présentes dans la gouttelette et la nature de la contamination particulaire (un agrégat externe ou une inclusion interne). Cependant, la quantification d'un système contenant une inclusion est généralement difficile, car les effets de dispersion de ces petites inclusions dans une plus grosse gouttelette sont relativement faibles. De plus, les résultats donnent des valeurs de taille d'inclusion bien inférieures aux tailles réelles, ce qui démontre l'échec de cette approche.

D'autre part il serait également intéressant de s'affranchir de la préparation d'échantillon qui nécessite une dilution. Dans le cas de la technique de la diffusion restreinte à l'aide des gradients de champ pulsés (PFG-RMN, « Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance »), aucune préparation de l'échantillon et donc de dilution n'est nécessaire et les mesures peuvent être relativement rapides (van der Tuuk Opedal, Sorland & Sjöblom 2009, Lingwood *et al.* 2012). Autrement, des techniques de spectroscopie d'atténuation acoustique consistent à propager des ondes ultrasonores dans l'émulsion et à mesurer l'atténuation à

chaque fréquence. Ce spectre d'atténuation peut être converti en une distribution de taille de particules et une mesure de la concentration de la phase dispersée. Cette méthode permettrait également de s'affranchir de la préparation d'échantillons (Alba *et al.* 1999).

Les résultats granulométriques de la dispersion de nanoparticules dans le DMSO, détaillés plus haut (Figure 33 p.135), nous permettent de supposer que les plus grandes tailles observées dans l'émulsion F-N1 sont principalement dues à des agrégats de nanoparticules. Les micrographes de la Figure 36 pour la formulation F-N1 confirment clairement la présence d'objets sombres dans l'émulsion, correspondant à des agrégats de taille supérieure à 10 µm, dispersés de façon homogène en présence d'un grand nombre de petites gouttelettes et d'autres particules de tailles probablement inférieures au micron. Cependant, les micrographes montrent qu'il y a une nouvelle population de gouttelettes d'huile de tailles supérieures à 2,5 µm, ce qui n'apparaissait pas pour la formulation F-0. Cela permet de supposer que l'ajout de nanoparticules influe nettement sur la taille des gouttelettes d'huile. En effet, la taille des gouttelettes, en présence de particules dépend fortement de la concentration à la fois des tensioactifs et des particules. Au cours de l'émulsification, un mélange de particules de différentes tailles et d'agents tensio-actifs peut conduire à un phénomène d'adsorption compétitive au niveau des surfaces des gouttelettes d'huile. En effet, si les molécules de tensioactifs sont adsorbées à la surface des particules, la mouillabilité des particules peut être modifiée et, par conséquent, l'efficacité des émulsifiants seraient également impactée (Binks, Desforges & Duff 2007). Le travail de Pichot, Spyropoulos, & Norton 2010 montre que lorsque la concentration en tensioactif est élevée, les nanoparticules hydrophiles de silice sont complètement déplacées de l'interface vers le milieu continu hydrophile et la stabilité est obtenue uniquement grâce à la présence d'une quantité minimale d'agents tensioactifs. Dans notre travail, une concentration élevée en tensioactif a été utilisée, et l'introduction de particules a été effectuée après l'émulsification. Par conséquent, l'ensemble du processus a permis d'obtenir que les espèces tensioactives se placent à l'interface eau-huile avant que particules ne puissent le faire. On pourrait également envisager que des particules hydrophobes aient migré au sein des gouttelettes d'huile. La gouttelette apparaît alors de taille plus grande à cause de cette inclusion de particules. Certaines techniques spécifiques pourraient être utilisées pour estimer la concentration ainsi que la taille de ces inclusions (Riefler, Schuh & Wriedt 2007). Néanmoins et comme indiqué précédemment, ces techniques ne sont pas tout à fait abouties et restent compliquées.

Visco-élasticité

Les nanoparticules, en plus d'avoir affecté la distribution de taille de l'émulsion, ont également significativement affecté le comportement rhéologique de l'émulsion même si la Figure 45 illustre le fait que F-N1 présente, comme F-0, un comportement élastique prédominant.

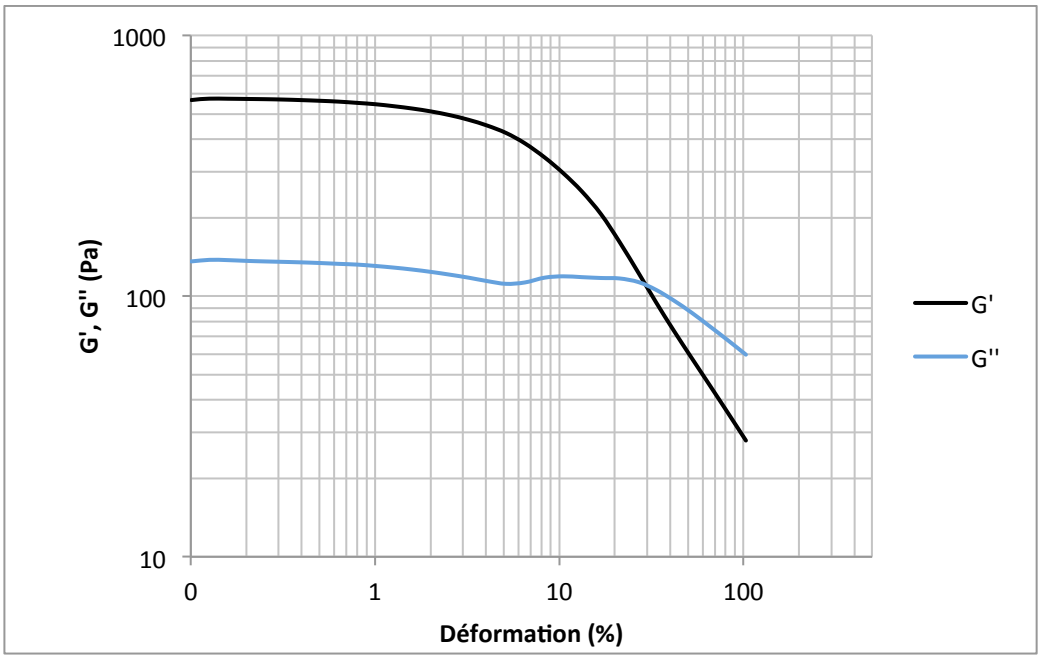


Figure 45 - Balayage en déformation de F-N1 à l'état initial

On observe en effet, comme cela est résumé dans le Tableau 7, une légère augmentation de tan(δ) pour F-N1 correspondant à une diminution de G' avec un G'' constant et caractéristique d'un comportement plus visqueux que celui de F-0.

Tableau 7 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0 et F-N1

	F-0	F-N1
G' (Pa)	**742** $\pm$ 3	**567** $\pm$ 4
Tan(δ)	**0,23** $\pm$ 0,01	**0,24** $\pm$ 0,01
γ_c (%)	**2,16** $\pm$ 0,66	**2,01** $\pm$ 0,01

Il est possible de relier la distribution de taille des particules avec les propriétés rhéologiques car la taille moyenne des gouttelettes joue un rôle majeur sur la valeur du G' (cf 1.3.2c) p.45). En effet, la mesure du module G' en fonction du temps est une méthode sensible pour prédire la coalescence. Le module G' représente une mesure au point de contact des gouttelettes de l'émulsion et la coalescence résulte en la diminution du nombre de points de contact. Lorsqu'il ne se produit pas de floculation, toute diminution du module G' indique donc la présence d'une coalescence : G' diminue quand la taille des gouttelettes augmente (Tadros 2010).

Le phénomène de l'augmentation de G'' après le plateau linéaire avant de diminuer, est plus faible pour F-N1 comparé à F-0. Ceci indique que la présence de nanoparticules affaiblit la structure du réseau de l'émulsion et empêche la structuration du réseau des gouttelettes.

Potentiel zêta

L'évolution du potentiel zêta en fonction du pH pour l'émulsion F-N1, représentée sur la Figure 46 est très similaire à celle de F-0 (Figure 41 p.143).

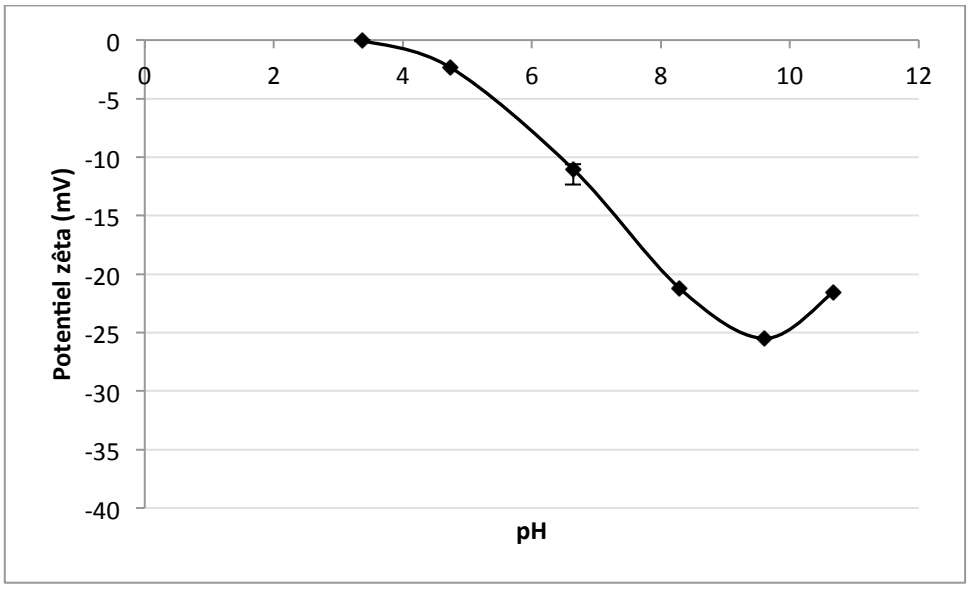
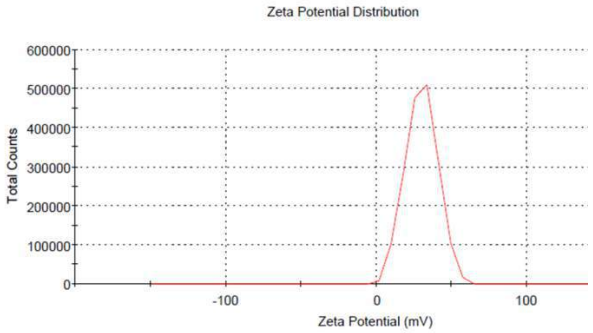


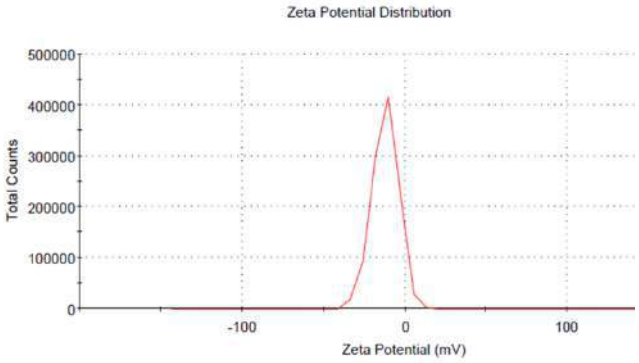
Figure 46 - Evolution du potentiel zêta avec le pH pour l'émulsion F-N1 à l'état initial

Les nanoparticules ne semblent donc pas modifier drastiquement les répulsions électrostatiques mises en jeu entre les gouttelettes. En revanche, on remarque que la gamme de potentiel zêta mesuré est inférieure, en valeur absolue, à celle de F-0 : on atteint au pH 8 un maximum de -25 mV qui était de -40 mV auparavant. On peut donc penser que l'interface des gouttelettes a été modifiée. En effet, les gouttelettes ne sont peut-être plus simplement stabilisées par des molécules tensioactives, mais également par des particules de TiO_2 hydrophobes, ce qui pourrait modifier la valeur du potentiel zêta. De plus, la valeur du potentiel zêta représentant la charge des particules colloïdales en solution peut être gouvernée à présent par la charge de surface des nanoparticules de TiO_2 présentes au sein de l'émulsion et non plus simplement par la charge de surface des gouttelettes. Dans ce cas, la technique utilisée ne nous permettrait pas de distinguer deux potentiels distincts. En effet, nous avons mené ce type de mesure pour deux particules distinctes : du dioxyde de titane de « grade technique » (*Carlo Erba Reagents*) et de l'alumine, oxyde d'aluminium 90 activé neutre (degré d'activité I) (*Merck*), ayant des potentiels zêta en solution dans l'eau, très différents. En effet, comme l'indique la Figure 47, la valeur du potentiel zêta moyen de l'alumine est de 30 mV (a) et celui du dioxyde de titane de -12 mV (b). Le potentiel zêta du mélange des deux types de particules est mesuré à 17,4 mV (c). En présence des deux particules simultanément, la mesure ne fournit pas de résultats permettant de distinguer les potentiels zêta correspondant à chacune des particules, mais fournit une valeur moyenne. Les particules de charges opposées vont en effet se coller ensemble.

(a)



(b)



(c)

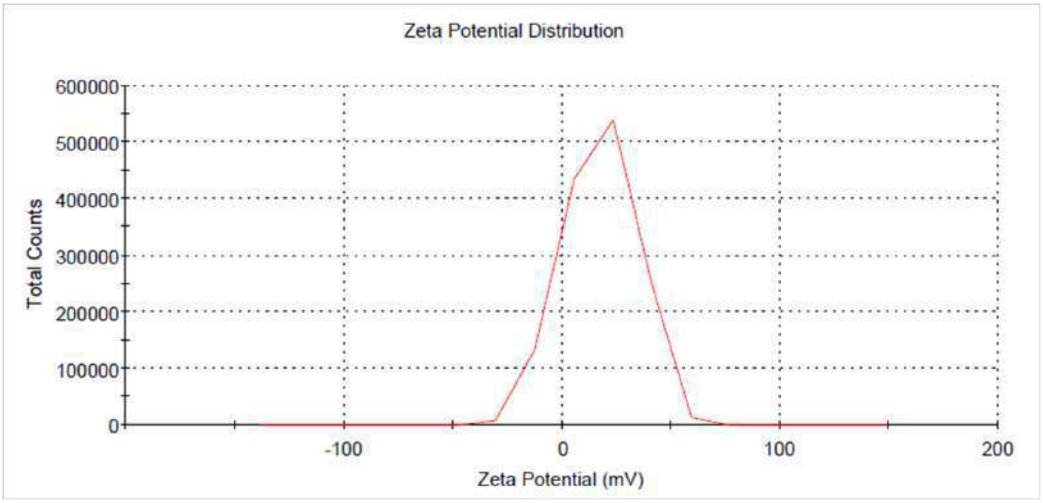


Figure 47 – Potentiel zêta de l'alumine, du dioxyde de titane et du mélange (50/50) des deux particules dans le DMSO

b) Emulsion avec les nanoparticules de coating 2 : F-N2

Granulométrie

Les émulsions préparées avec des nanoparticules de coating 2 montrent une répartition initiale similaire à celle de l'émulsion F-N1 comme le montre la Figure 48, avec une distribution grossière des particules colloïdales au sein de l'émulsion. Le diamètre D[3,2] a une valeur de 1,04 µm pour F-N2, ce qui est légèrement supérieur à celui de F-N1 (0,83 µm). Pour F-N2, 20% des particules ont une taille supérieure à 10 µm, ce qui est très similaire aux valeurs de F-N1 (24%).

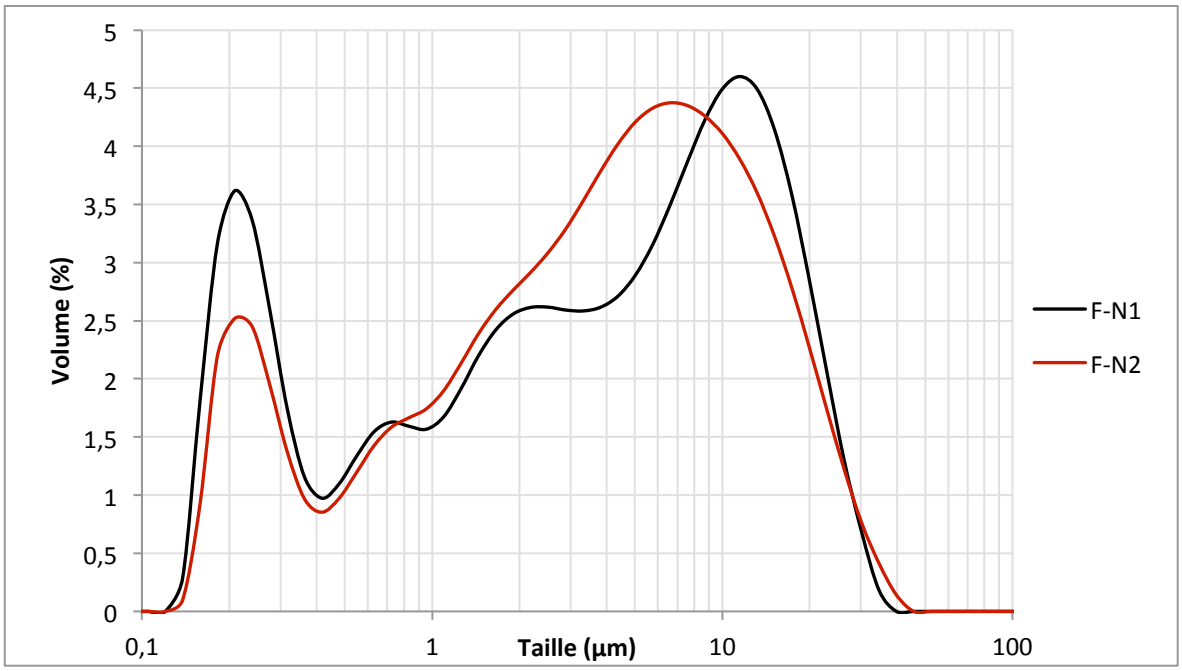


Figure 48 - Distribution de taille des particules colloïdales en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N2 à l'état initial

Le protocole adopté pour l'incorporation des nanoparticules lors de la préparation des émulsions permet donc d'obtenir des émulsions comparables en termes de valeurs de taille et de distribution des particules colloïdales, quel que soit le traitement de surface des nanoparticules utilisées.

Viscoélasticité

Comme en témoigne clairement la Figure 49, les nanoparticules affectent de la même manière la structure finale de l'émulsion, comme décrit plus haut pour F-N1 : le module G'' augmente plus faiblement que pour F-0, avant de diminuer, pour des déformations aux alentours des 10%.

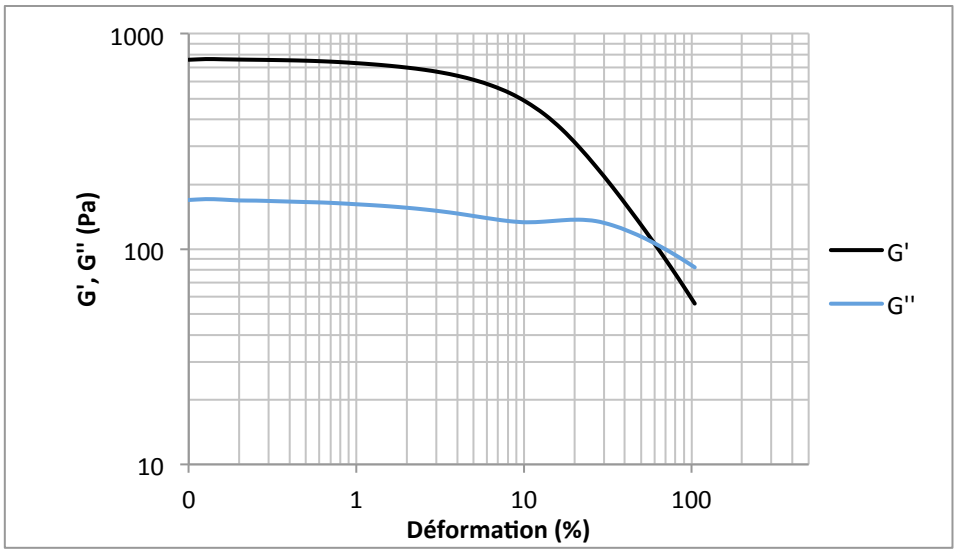


Figure 49 - Balayage en déformation de F-N2 à l'état initial

Cependant, la diminution des valeurs des paramètres rhéologiques par rapport à celles de F-0 n'est pas observée comme dans le cas de F-N1. Les modules sont très similaires à ceux de F-0 dans la région linéaire, comme indiqué dans le Tableau 8. Comme la distribution de taille est très similaire entre les deux émulsions F-N1 et F-N2, on peut supposer que la réduction du module de G' observée pour F-N1, n'est pas uniquement due à l'augmentation de la taille des gouttelettes, comme on a pu le préciser précédemment, mais peut résulter d'un changement dans les interactions particule-particule, ce qu'on détaillera plus loin p.155.

Tableau 8 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0, F-N1 et F-N2

	F-0	**F-N1**	**F-N2**
G' (Pa)	**742** $\pm$ 3	**567** $\pm$ 4	**756** $\pm$ 8
Tan(δ)	**0,23** $\pm$ 0,01	**0,24** $\pm$ 0,01	**0,22** $\pm$ 0,01
γ_c (%)	**2,16** $\pm$ 0,66	**2,01** $\pm$ 0,01	**2,56** $\pm$ 0,24

En outre, un changement quantitatif dans les valeurs de γ_c est observé comme l'indique le Tableau 8. L'étendue de la région linéaire est un moyen de caractériser les interactions responsables de la floculation des émulsions : dans le cas de fortes interactions, le réseau peut résister à des grandes déformations avant de subir des réarrangements importants. Les forces d'interactions entre gouttelettes correspondent à la distance de séparation moyenne entre les gouttelettes. Un système d'émulsion très dense et compact contient donc de plus grandes forces d'interaction inter-gouttelettes (Tan Hsiao 2009). Cette force d'interaction intergouttelettes permet donc de maintenir les gouttelettes compactes et ainsi de résister aux forces de déformations appliquées lors du balayage en déformation : ce type de système présentera ainsi une grande valeur de γ_c. En régime dilué, les gouttes floculées forment un « réseau ». Lorsque ce réseau de gouttes est relativement robuste, le domaine linéaire pour les émulsions diluées s'étend jusqu'à des déformations de l'ordre de quelques pourcents. L'étendue du domaine linéaire est donc un moyen de caractériser les interactions responsables de la floculation des émulsions : si ces interactions sont très fortes, le réseau pourra supporter des déformations importantes avant de subir des réarrangements notables et la déformation limite du domaine linéaire γ_c est importante. En revanche, la taille moyenne des gouttes a peu d'influence sur γ_c (Arditty 2004).

En comparant F-N1 et F-N2, qui ont la même fraction volumique de nanoparticules incorporées, les formulations F-N2 présentent un plateau viscoélastique linéaire décalé vers les grandes déformations par rapport à F-N1 (Tableau 8). Le système paraît donc plus déformable, sans modifier la structure. Selon Tadros 2004, la valeur de l'énergie de cohésion, $Ec = \frac{1}{2} G' \gamma_c^2$, peut être utilisée en tant que mesure de la floculation : plus la valeur de E_c est

importante, plus la floculation est grande. Les deux émulsions montrent une distribution de taille des gouttelettes très similaire de sorte que la comparaison quantitative entre les deux systèmes peut être faite. A titre d'illustration, les valeurs de E_c sont de 2292 Pa et 4955 Pa respectivement pour F-N1 et F-N2 ; par conséquent, la structure de l'émulsion F-N2 est beaucoup plus floculée 72 heures après la préparation que dans le cas de F-N1. La microscopie permet de vérifier cette microstructure : la Figure 50 compare les émulsions F-N1 et F-N2 à 72 heures après préparation. F-N2 laisse apparaître davantage d'espaces vides ce qui confirme une forte floculation pour cette émulsion.

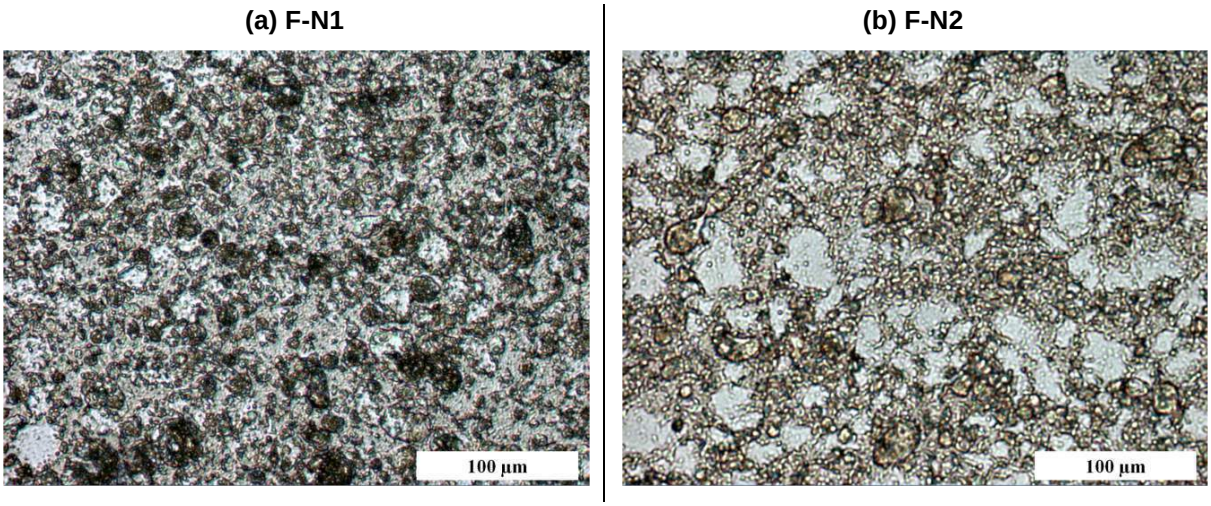


Figure 50 - Images microscopiques des formulations F-N1 (a) et F-N2 (b) à 72h après formulation

Potentiel zêta

L'évolution du potentiel zêta en fonction du pH pour l'émulsion F-N2 est représentée sur la Figure 51 et est similaire à celle de F-0 et F-N1. La différence entre les deux formulations avec nanoparticules est que le potentiel zêta de F-N2 est supérieur en valeur absolue à celui de F-N1, à partir des valeurs de pH aux alentours de 6,5 et ce jusqu'à pH 12. A partir du pH 8, on atteint des valeurs considérées comme appartenant au domaine stabilisé.

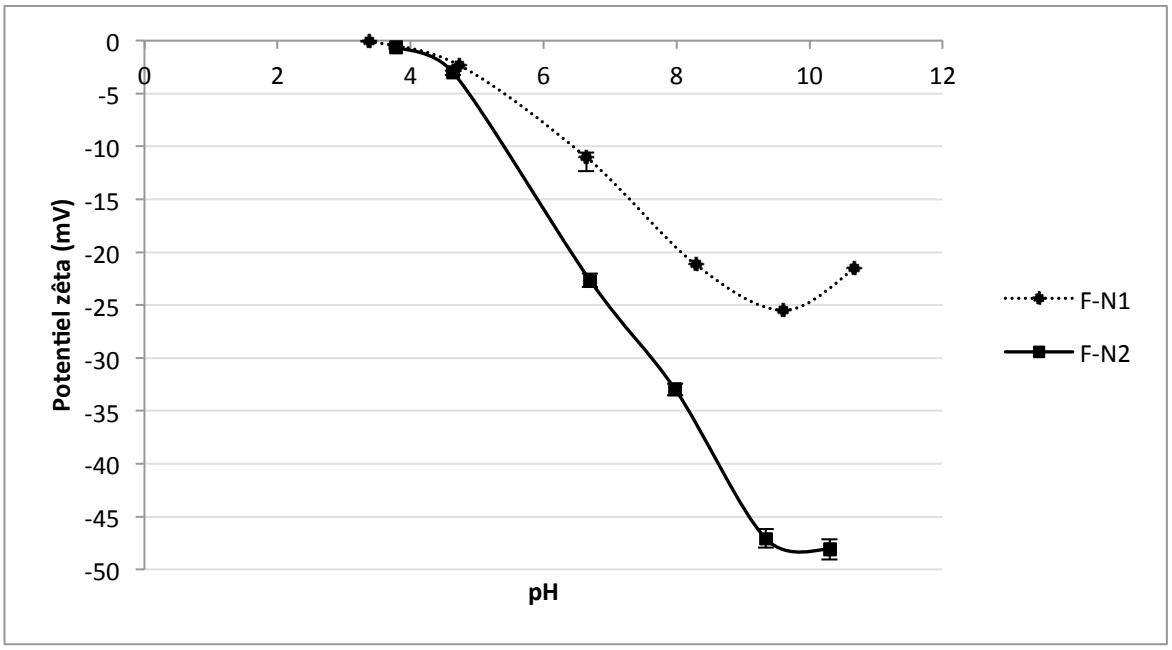


Figure 51 - Evolution du potentiel zêta avec le pH pour l'émulsion F-N1 et F-N2 à l'état initial

c) Impact de l'incorporation des nanoparticules

Importance des traitements de surface

On observe dans plusieurs cas, des résultats dépendant des traitements de surface. Par exemple, en viscoélasticité, on peut supposer que la réduction du module de G' observée pour F-N1 et non pour F-N2, n'est pas uniquement due à l'augmentation de la taille des gouttelettes comme la distribution de taille est très similaire entre les deux émulsions F-N1 et F-N2, mais peut résulter d'un changement dans les interactions particule-particule. Cela signifie que les différences observées peuvent être dues au traitement de surface utilisé plutôt qu'à la présence de nanoparticules elles-mêmes. En effet, comme le coating 1 est constitué de chaînes alkyles courtes (C8) greffées sur une surface d'alumine, on peut s'attendre à un faible effet stérique en comparaison au coating 2 qui est un revêtement hybride, et qui associe les avantages des deux traitements de surface du triethoxycaprylylsilane et du titanium triisostearate dans un seul. Il est donc beaucoup plus encombré stériquement, avec une surface plus difficile à atteindre. En conséquence, des effets stériques nettement plus importants peuvent être attendus. Pour F-N2 les particules se retrouvent dans un environnement plus structuré compte tenu du traitement de surface plus volumineux et encombrant, les volumes d'exclusion entre particules sont plus importants et les objets sont donc ainsi facilement maintenus à distance, ce qui crée un réseau plus rigide et donc des valeurs de G' plus importantes.

Au niveau du potentiel zêta, on observe pour F-N1 et F-N2 une diminution des valeurs en comparaison avec la formulation de référence F-0. Cela signifie que dans ces deux formulations, les interactions électrostatiques entre les longues chaines carbonées de l'ester

gras et les particules de TiO_2 dans l'émulsion sont importantes. C'est en particulier le cas avec le coating 2 qui possède à sa surface de nombreux atomes d'oxygène susceptibles de créer des liaisons hydrogène. Il y aura donc dans l'émulsion F-N2 plus de probabilité de création de charges, révélant ainsi un potentiel zêta plus important.

Influence du pourcentage croissant de nanoparticules

Dans le cas des formulations F', on rappelle qu'un ingrédient diffère de la formulation utilisée pour F-0, F-N1 et F-N2 : la paraffine a été remplacée par le cetearyl alcohol (Tableau 4 p.100).

Granulométrie

L'analyse granulométrique de l'émulsion, représentée sur la Figure 52, nous permet de mesurer la distribution de gouttelettes de cette émulsion, qui est moins fine que celle de F-0. En effet, même si la population majoritaire en volume est centrée sur la même taille de 2,5 µm, il apparaît une plus grande population au-delà de 10 µm. Les courbes cumulatives nous indiquent que 16% des gouttelettes ont une taille supérieur à 10 µm, contrairement à 0,4% pour la formulation précédente. Le diamètre de Sauter est également supérieur à celui de F-0 avec une valeur de 2,11 µm. Cette émulsion est donc clairement moins homogène et avec des tailles de gouttelettes bien plus importantes.

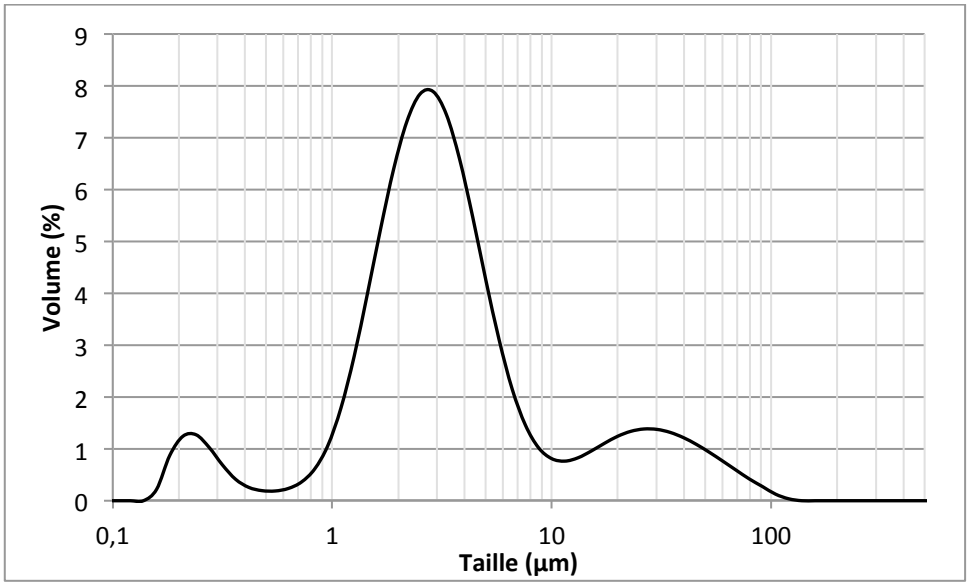


Figure 52 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F'-0 à l'état initial

Concernant les formulations contenant des nanoparticules, comme le montre la Figure 53, la répartition est dans tous les cas, très inhomogène et il est difficile de distinguer nettement des tailles de population bien définies. L'émulsion est donc constituée de très nombreuses tailles variables de particules colloïdales. L'ajout des particules de coating 2 dans la formulation F'-N(5%), ne conduit pas aux mêmes distributions de tailles que dans la formulation F-N2, pour des pourcentages en nanoparticules identiques. On peut donc penser que la formulation F'

favorise l'apparition d'agrégats de plus grosses tailles. Les formulations à 5, 7 et 10% semblent être très similaires avec des courbes de distribution proches, tandis que l'émulsion à 2,5% semble être centrée sur une population de taille plus proche de celles de la formulation sans nanoparticules. La répartition des particules est résumée dans le Tableau 9.

Tableau 9 - Pourcentage volumique des particules inférieures à 2,5 µm ou supérieures à 10 µm, ainsi que le diamètre D[3,2] pour les émulsions F' à l'état initial

	< 2,5 µm	> 10 µm	D[3,2]
F'-0	43,7	15,8	1,585
F'-N (2,5%)	52,5	15,9	0,912
F'-N (5%)	43,7	27,4	0,836
F'-N (7%)	51,8	13,0	0,647
F'-N (10%)	56,3	11,6	0,605

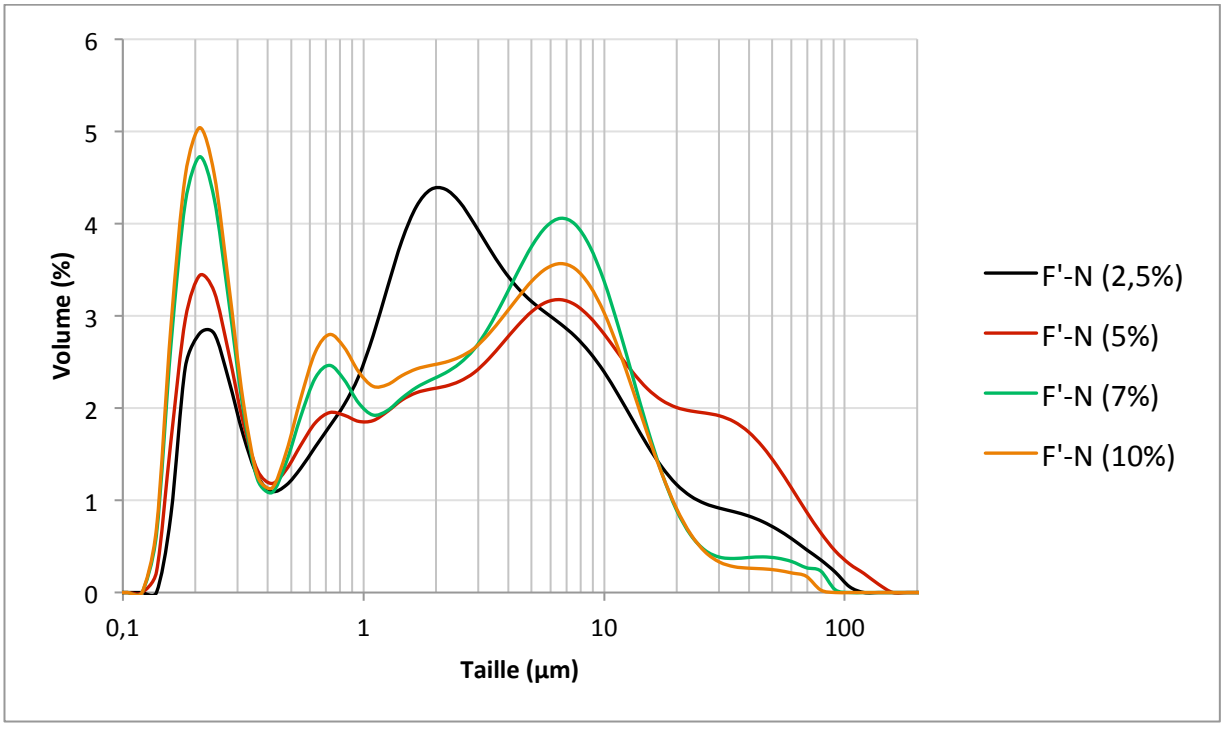


Figure 53 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F'-N aux différents pourcentages de nanoparticules à l'état initial

Analyse visco-élastique

A température ambiante, 72h après préparation, les analyses rhéologiques de F'-0 montrent que les modules G' et G'' sont beaucoup plus élevés que pour la précédente formulation F-0. Cela correspond en effet au fait que cette émulsion est beaucoup plus consistante que la première, du fait de la présence de l'alcool gras créant un réseau plus rigide. Cependant le caractère visco-élastique est identique puisque les valeurs de tan(δ) sont égales (Tableau 10).

Un autre paramètre apparaît bien différent également, c'est celui de la contrainte critique γ_c : elle est très nettement inférieure dans le cas de l'émulsion F'-0. Le domaine linéaire ne s'étend pas au-delà des 1% de déformation, ce qui signifie que le réseau de gouttelettes se détériore très rapidement à des valeurs de déformation très faibles. Cette émulsion présente donc des tailles de gouttes relativement élevées et un réseau de gouttelettes plus fragile que l'émulsion F-0.

Tableau 10 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0 et F'-0

	F-0	**F'-0**
G' (Pa)	**742** $\pm$ 3	**1611** $\pm$ 57
Tan(δ)	**0,23** $\pm$ 0,01	**0,23** $\pm$ 0,03
γ_c (%)	**2,16** $\pm$ 0,66	**0,90** $\pm$ 0,38

Pour les formulations avec nanoparticules, le module G' et l'angle de phase sont du même ordre de grandeur que pour la formulation sans nanoparticules correspondantes F'-0 (Tableau 11). L'incorporation de particules, qui une fois en émulsion peuvent atteindre des tailles de plusieurs micromètres, n'influence pas les valeurs de modules G' comme on a pu le voir en granulométrie. On s'est en effet assuré préalablement que les conditions dans lesquelles nous travaillons en rhéologie, nous permettent de faire des mesures sur des émulsions contenant des objets avec des tailles pouvant être bien supérieures au micron. Le choix de la géométrie de mesure dépend du rapport entre la dimension moyenne de l'entrefer (espace entre le plan et la troncature du cône) et le diamètre des plus grosses particules. En pratique l'entrefer doit être supérieur à, au moins, dix fois la taille des plus grosses particules en suspension (Azouz 2010). Cependant, au-delà d'une certaine gamme de taille, on observera une grande influence sur les paramètres car la présence de particules grossières peut conduire à un blocage de l'écoulement lorsque l'entrefer est très faible.

Tableau 11 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F'-N à 2,5 ; 5 ; 7 et 10 %

	F'-N (2,5%)	**F'-N (5%)**	**F'-N (7%)**	**F'-N (10%)**
G' (Pa)	**1721** $\pm$ 66	**1533** $\pm$ 9	**1120** $\pm$ 30	**1889** $\pm$ 61
Tan(δ)	**0,23** $\pm$ 0,01	**0,24** $\pm$ 0,01	**0,20** $\pm$ 0,01	**0,23** $\pm$ 0,01
γ_c (%)	**0,95** $\pm$ 0,33	**4,62** $\pm$ 0,55	**4,12** $\pm$ 0,01	**3,65** $\pm$ 0,41

En ce qui concerne la contrainte critique, l'émulsion contenant le moins de nanoparticules F'-N (2,5%) a des valeurs similaires à l'émulsion sans nanoparticules F'-0 avec des valeurs de γ_c inférieures à 1%, tandis qu'à partir de 5% de nanoparticules incorporées, les émulsions ont un domaine linéaire largement plus étendu d'une valeur supérieure à 3,5%. De la même manière

que pour les formulations F-N1 et F-N2, l'addition de nanoparticules contribue à une plus grande résistance à la déformation du réseau de l'émulsion, sans que sa structure soit pour autant altérée. Dans le cas de l'émulsion F', le domaine linéaire est encore plus important que dans les cas de F-N2 dont la valeur de γ_c était de 2,6%. La valeur la plus élevée est de 4,6%, obtenue pour des formulations à 5% en nanoparticules. Elle semble ensuite légèrement diminuer avec l'augmentation du pourcentage de nanoparticules incorporées. Les nanoparticules jouent donc un rôle fondamental dans la structuration du réseau de l'émulsion.

On observe au niveau granulométrique comme rhéologique des similitudes d'une part entre les formulations sans nanoparticules et celles à 2,5%, et d'autre part entre les formulations à 5, 7 et 10%. L'ajout d'une quantité relativement faible de nanoparticules ne modifie pas de manière conséquente la structure de l'émulsion, tandis qu'à partir de 5%, on remarque un changement structural important. On peut effectivement constater sur les images microscopiques de la Figure 54 que les formulations à 5, 7 et 10% sont très chargées en amas de particules alors que F'-N (2,5%) est effectivement la plus semblable d'un point de vue microscopique au niveau de la répartition des gouttelettes.

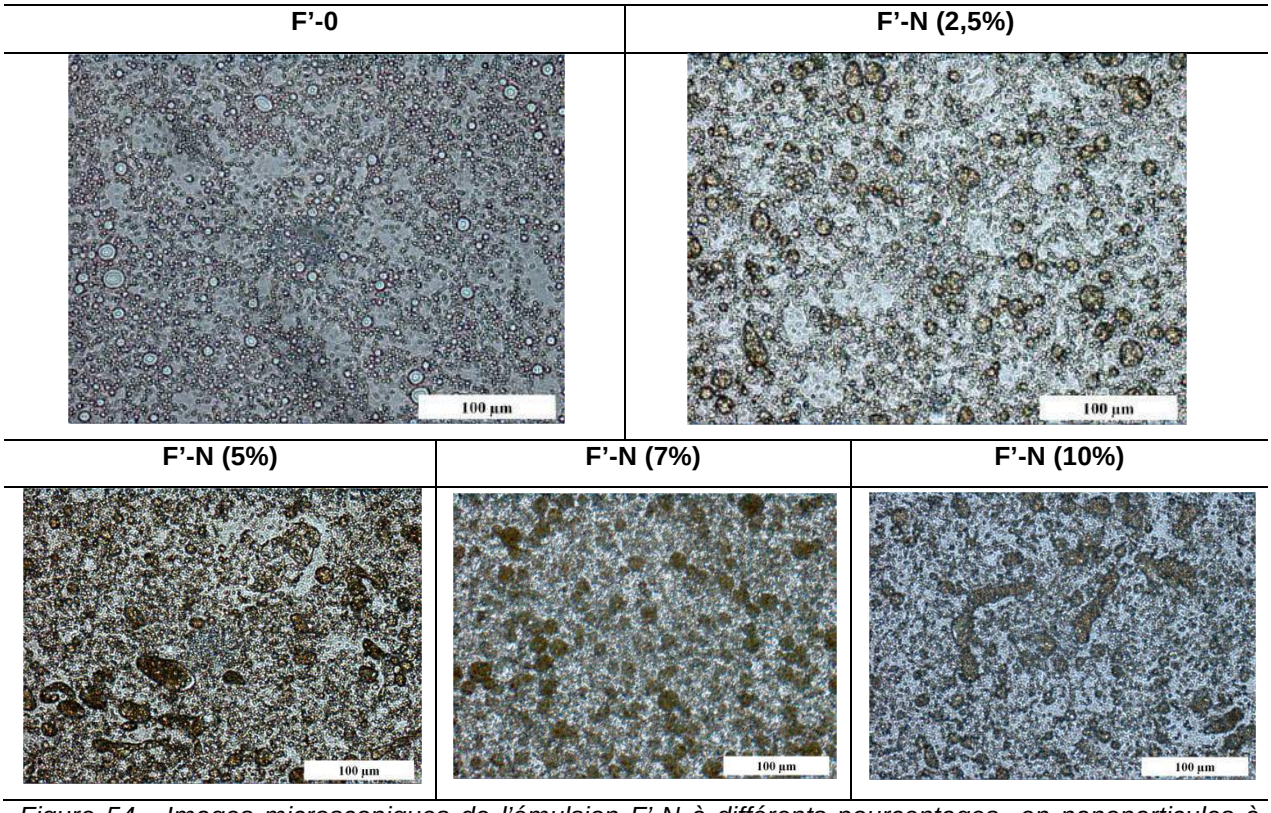


Figure 54 - Images microscopiques de l'émulsion F'-N à différents pourcentages en nanoparticules à l'état initial

Synthèse

On retiendra en premier point que les émulsions avec nanoparticules semblent avoir un comportement structural dépendant du traitement de surface du dioxyde de titane utilisé, lié à sa composition chimique.

De plus, les différentes techniques de caractérisation nous ont permis de mettre en évidence que l'addition de nanoparticules contribue à une plus grande résistance à la déformation du réseau de l'émulsion, sans que sa structure soit pour autant altérée.

Enfin, à partir d'un pourcentage élevé de particules au sein de l'émulsion il semble apparaître un changement structural important, avec des paramètres rhéologiques et granulométriques parfois bien différents.

1.2.3 Conclusion

	Formulation	Caractéristiques à retenir
Formulations F	F-0	Faible diamètre des gouttelettes et distribution bimodale centrée sur une valeur de taille.
	F-N1	Emulsion polydisperse, avec la présence d'objets colloïdaux de taille plus importante, mais diamètre de Sauter inférieur à celui de F-0. Caractère plus visqueux de la crème.
	F-N2	Granulométrie similaire à celle de F-N1. Caractère visco-élastique similaire à celui de F-0, émulsion plus floculée que F-N1. Plus de probabilité de création de charge électrostatique
Formulations F'	F'-0	Taille de gouttelettes plus élevées et émulsion moins déformable que F-0
	F'-N	A partir de 5% apparaît une plus grande résistance à la déformation liée aux interconnexions entre gouttelettes et particules. Des similitudes apparaissent entre F'-0 et F'-N (2,5%) d'une part et F'-N (5%), F'-N (7%), F'-N (10%) d'autre part.

1.3 Vieillissement des émulsions

Les émulsions sont connues comme des systèmes thermodynamiquement instables qui évoluent lentement mais inexorablement vers la séparation physique de la phase aqueuse et huileuse. Les composants de l'émulsion se séparent en deux phases distinctes, ce qui rend le produit inacceptable d'un point de vue cosmétique. Cette instabilité se produit plus ou moins rapidement à travers différents phénomènes de déstabilisation. Par conséquent, des expériences ont été menées sur les différentes émulsions (F-0, F-N1, F-N2, et F'-0, F'N(%)) afin d'identifier les changements de structure dans le système, causés par le vieillissement à la

température ambiante et sous conditions de vieillissement accéléré à 50°C. Le but était ainsi de comprendre la contribution des nanoparticules dans les processus de déstabilisation.

1.3.1 Stabilité au cours du temps à température ambiante

a) Emulsion sans nanoparticules F-0

Afin d'obtenir des informations sur la stabilité des émulsions à long terme, une méthode classique est de réaliser des mesures rhéologiques sur une période de temps de stockage (Yan, Gray & Masliyah 2001), à une ou plusieurs températures données. Dans ce but, une première série d'expériences de vieillissement ont été réalisées à température ambiante, dont les résultats sont résumés dans le Tableau 12. Le symbole Δ correspond à la variation des valeurs de chacun des paramètres entre les temps de 72h (3 jours) et 65 jours après fabrication : négatif il correspond à une diminution des valeurs au cours du temps, tandis que positif il sera représentatif d'une augmentation.

Tableau 12 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0, pour un vieillissement à température ambiante pour des durées de 1 à 65 jours

	F-0								Δ
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	726 ±7	742 ±2,73	715 ±5	677 ±7	662 ±9	669 ±35	675 ±11	718 ±20	-3%
tan(δ)	0,22 ±0,01	0,23 ±0,01	0,23 ±0,01	0,22 ±0,01	0,23 ±0,01	0,24 ±0,01	0,23 ±0,01	0,23 ±0,01	4%
γ_c (%)	1,91 0,45	2,16 0,66	2,32 0,19	2,08 0,20	2,02 0,27	2,37 0,37	2,62 0,06	3,13 0,35	45%

La variation négligeable de 3-4% des paramètres rhéologiques principaux (G', et tan δ) sur toute la période de temps démontre une très bonne stabilité de l'émulsion F-0 à température ambiante. La distribution granulométrique représentée sur la Figure 55 nous permet de constater que la taille des gouttelettes a très peu évolué dans le temps entre 72h et 65 jours de vieillissement à température ambiante. Après 65 jours de vieillissement 1,7% des gouttelettes sont supérieures à 10 µm comparativement à 0,4% après 72 heures. Les gouttelettes tendent donc à évoluer très lentement vers l'apparition de gouttelettes de plus grandes tailles.

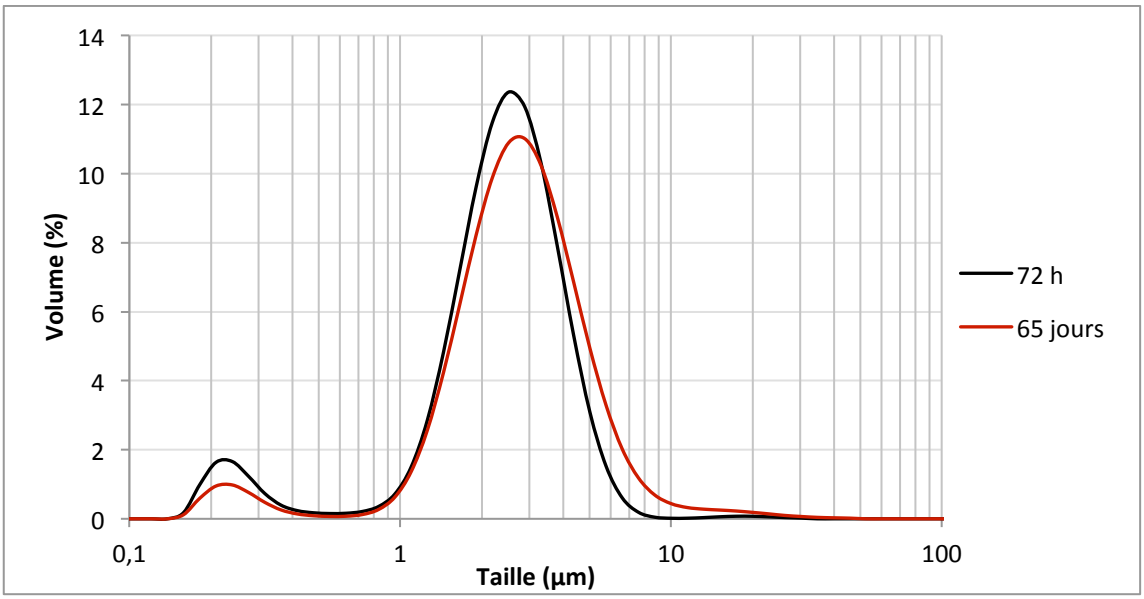


Figure 55 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-0 après un vieillissement à température ambiante de 72h et de 65 jours

De plus, F-0 montre une évolution de la valeur de γ_c qui est augmentée de 45% après 65 jours, qui s'explique à nouveau par l'augmentation des forces inter-gouttelettes et donc l'apparition d'un système floculé au cours du temps. La figure microscopique correspondante (Figure 56) montre en effet une légère floculation des gouttelettes avec des regroupements des gouttelettes laissant apparaître des espaces vides, mis en évidence par les flèches sur l'image de droite de la Figure 56. Les gouttelettes floculées sont cependant généralement re-disperséespar les ultrasons utilisés lors de la préparation d'échantillons pour la granulométrie, ce qui explique que cette floculation ne s'observe pas sur la Figure 55.

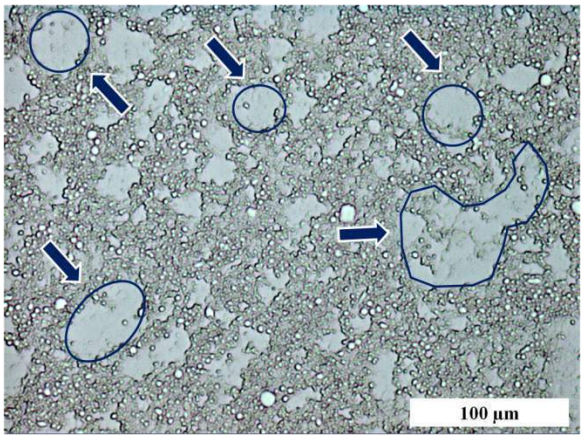


Figure 56- Image microscopique de la formulation F-0, 65 jours après un vieillissement à température ambiante

D'autre part, la stabilité de l'émulsion est également contrôlée par les propriétés des couches adsorbées formées à la surface des gouttelettes. Afin de suivre l'évolution de la stabilité électrostatique de l'émulsion, nous avons mesuré son potentiel zêta en fonction du pH et au cours du temps.

A un temps donné nous obtenons le type de courbe représentée sur la Figure 41 p.143. Il parait donc intéressant de comparer les valeurs du potentiel zêta de l'émulsion à différents temps de vieillissement. Cependant au cours du temps, le pH de l'émulsion évolue de plusieurs dixièmes d'unité autour de la valeur de 6,5, compte tenu de l'évolution de certains composants de l'émulsion (nanoparticules et ingrédients), et donc le potentiel zêta également. Il est donc difficile de déterminer l'évolution réelle du potentiel zêta au cours du temps compte tenu de ces modifications de pH, par une mesure standard du potentiel zêta à un temps donné. De plus, il n'était pas possible de fixer précisément le pH de l'émulsion à la valeur de 6,5 ; du fait de la présence des ingrédients de la formulation jouant probablement le rôle de tampon. Ainsi, afin de suivre et comparer les valeurs de potentiel zêta lié à l'évolution des ingrédients et tout en s'affranchissant du pH, nous avons donc choisi de modéliser la courbe d'évolution de la Figure 41 par une fonction polynôme du troisième degré d'équation $y = y_0 + ax + bx^2 + cx^3$, et d'extrapoler la valeur du potentiel zêta pour la valeur de pH de 6,5. A cette valeur de potentiel obtenu, correspond une valeur d'écart-type renseigné par le logiciel de traitement SigmaPlot. Nous obtenons ainsi, à chaque temps donné, la valeur du potentiel zêta extrapolée au pH de 6,5 et pouvons ainsi déterminer son évolution au cours de temps, représentée sur la Figure 58.
A titre d'exemple, pour la formulation F-0 à 72h à température ambiante, on obtient la courbe modélisée représentée sur la Figure 57. Le potentiel zêta extrapolé a donc une valeur de -14,5 mV pour un pH de 6,5, et le point le plus proche mesuré était de -11,2 mV, correspondant à un pH de 6,24.

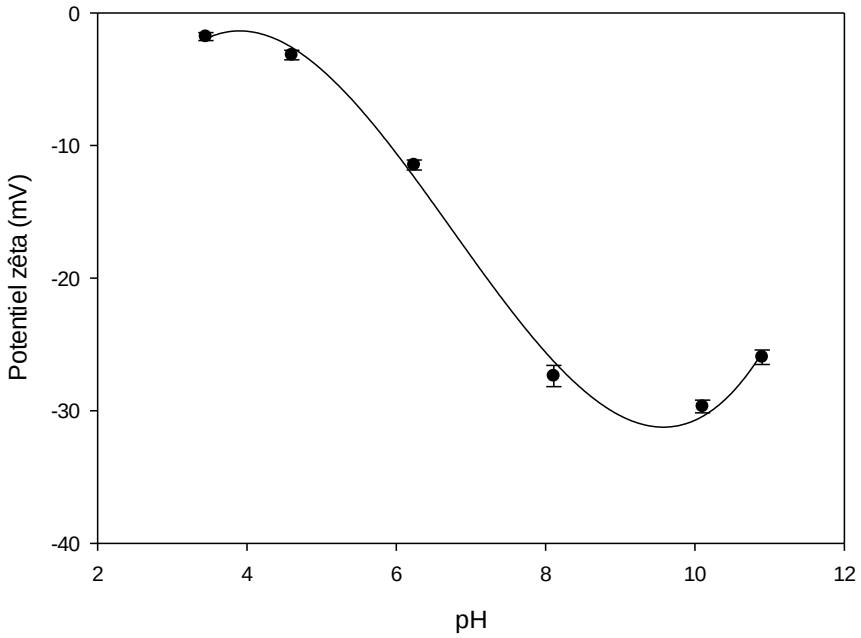


Figure 57 - Courbe modélisée du potentiel zêta en fonction du pH pour F-0 vieillie à 72h à température ambiante

On observe alors sur la Figure 58, que le potentiel tend à légèrement augmenter en valeur absolue dans le temps, ce qui montrerait que les gouttelettes exerceraient davantage de répulsions électrostatiques entre elles après plusieurs jours de vieillissement plutôt qu'après préparation. Par exemple à 65 jours, le potentiel zêta est de -26 mV, avec un écart-type significatif. Celui-ci est plus important en valeur absolue que le potentiel zêta de l'émulsion à 72h de -14 mV. Cependant dans tous les cas le potentiel évolue dans des gammes de valeur absolue inférieures à 30 mV, correspondant aux zones dites d'instabilité électrostatique de l'émulsion. La valeur du potentiel zêta est considérée stable, compte tenu des écart-types conséquent de ces valeurs. Il n'est pas possible de trouver un moyen simple de s'affranchir de ce biais.

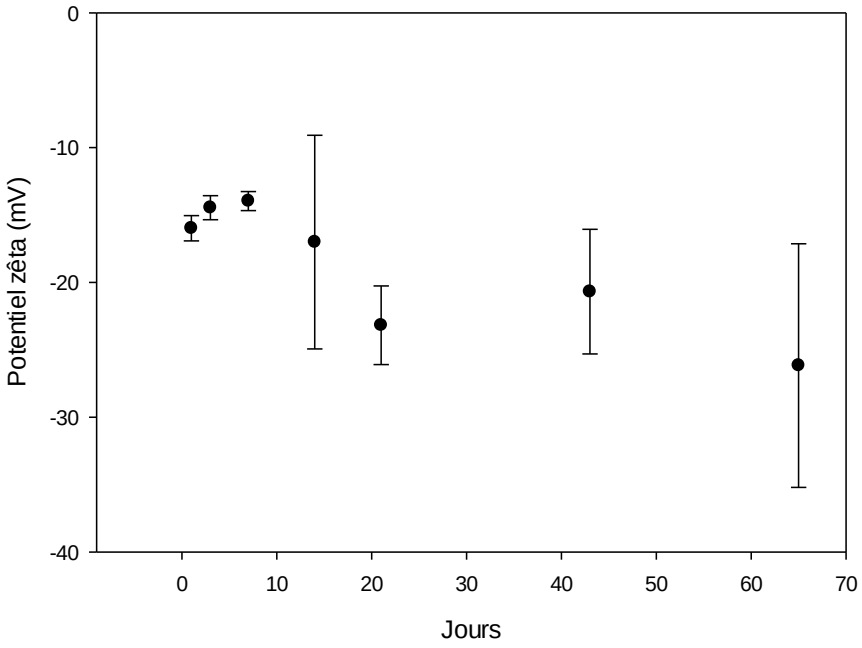


Figure 58 – Evolution du potentiel zêta de F-0 en fonction du temps lors d'un vieillissement à température ambiante, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5

Dans certaines études, la mesure du potentiel zêta ne donne aucune information pertinente sur la stabilité d'une émulsion (Roland 2003). En effet, aucune différence significative n'a été observée au niveau des valeurs de potentiel zêta, malgré une distinction évidente entre les stabilités globales des systèmes. En outre, les émulsions les plus visuellement stables présentent les valeurs absolues les plus faibles en potentiel zêta. Cela peut s'expliquer par le fait que la réduction de la taille des gouttelettes est importante. Ceci aurait pour effet d'entraîner une modification de la distribution de la charge en fonction de la surface spécifique (cf 1.3.3 p.47).

De plus, une étude a montré que la stabilité n'est pas due uniquement à la répulsion électrique de la double couche, mais d'autres mécanismes de stabilisation doivent être envisagés (de Morais *et al.* 2006). La répulsion électrostatique n'est plus le seul facteur mis en jeu dans les phénomènes de déstabilisation, et les mécanismes de stabilisation stérique à proximité des surfaces de gouttelettes, comme la présence de liaison hydrogène sont à prendre en compte.

Une diminution de la valeur absolue du potentiel zêta devrait normalement être corrélée à une plus forte tendance à la floculation. En règle générale, un faible potentiel zêta serait lié à des répulsions électrostatiques insuffisantes entre les gouttelettes et donc à une émulsion peu stabilisée. Des phénomènes tels que la floculation et la coalescence deviendraient alors possibles, ayant pour conséquence d'augmenter la taille des gouttelettes. Néanmoins, il a été montré que dans l'étude de de Morais *et al.* 2006, cela n'a pas été le cas : la diminution du

potentiel zêta n'est pas toujours liée à l'augmentation de la taille des gouttelettes, en particulier lorsque les mécanismes stériques sont peut-être prédominants.

b) Emulsions avec nanoparticules

Influence du traitement de surface

En ce qui concerne le vieillissement des formulations préparées avec nanoparticules, il y a une plus grande variation des paramètres rhéologiques avec notamment une diminution de G' de -29% et -39% pour respectivement F-N1 et F-N2, comme indiqué sur le Tableau 13.

Tableau 13 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-N1 et F-N2 pour un vieillissement à température ambiante pour des durées de 1 à 65 jours

	F-N1								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	526 ±5	567 ±4	552 ±8	440 ±2	414 ±6	424 ±9	411 ±3	402 ±7	**-29%**
tan(δ)	0,24 ±0,01	0,24 ±0,01	0,25 ±0,01	0,26 ±0,01	0,27 ±0,01	0,27 ±0,01	0,27 ±0,01	0,28 ±0,01	**16%**
γ_c (%)	1,76 ±0,19	2,01 ±0,01	2,08 ±0,08	2,03 ±0,01	2,02 ±0,01	2,14 ±0,09	1,88 ±0,10	1,77 ±0,05	**-12%**
	F-N2								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	792 ±39	756 ±8	792 ±5	679 ±3	639 ±9	529 ±19	460 ±47	300 ±4	**-39%**
tan(δ)	0,22 ±0,01	0,22 ±0,01	0,22 ±0,01	0,23 ±0,01	0,24 ±0,01	0,24 ±0,01	0,25 ±0,01	0,29 ±0,01	**8%**
γ_c (%)	2,09 ±0,47	2,56 ±0,24	2,76 ±0,31	2,65 ±0,16	2,76 ±0,16	2,29 ±0,34	2,39 ±0,36	1,83 ±0,04	**-11%**

Cette diminution de G’ peut être corrélée avec une légère augmentation de taille des particules colloïdales des émulsions : en effet les analyses granulométriques, représentées sur les Figure 59 montrent que 34% des particules en volume sont supérieurs à 10 µm au bout de 65 jours contre 23% après 72h pour F-N1 et 25% contre 20% pour F-N2. Les valeurs des diamètres de Sauter montrent nettement pour F-N1 une augmentation de la taille moyenne des particules puisqu’il évolue entre 0,83 µm à 72h jusqu’à 2,57 µm après 65 jours. Cette évolution n’est en revanche pas visible pour F-N2 où la valeur du diamètre de Sauter reste constante : malgré la présence des grosses particules en volume, il reste beaucoup de très petites particules dans l’émulsion (Figure 60). Cette augmentation de la taille des particules, cause de la diminution des valeurs de G’, peut être due à une coalescence des gouttelettes ou une inclusion des particules de TiO_2 à l’intérieur des gouttelettes. En revanche, il est peu probable que cette

évolution soit liée à une forte agrégation des particules, puisqu'on constaterait une augmentation des valeurs de modules. Le module traduit en effet la résistance de la crème à la déformation mécanique : plus il y a de particules solides, plus l'échantillon sera résistant à la déformation appliquée.

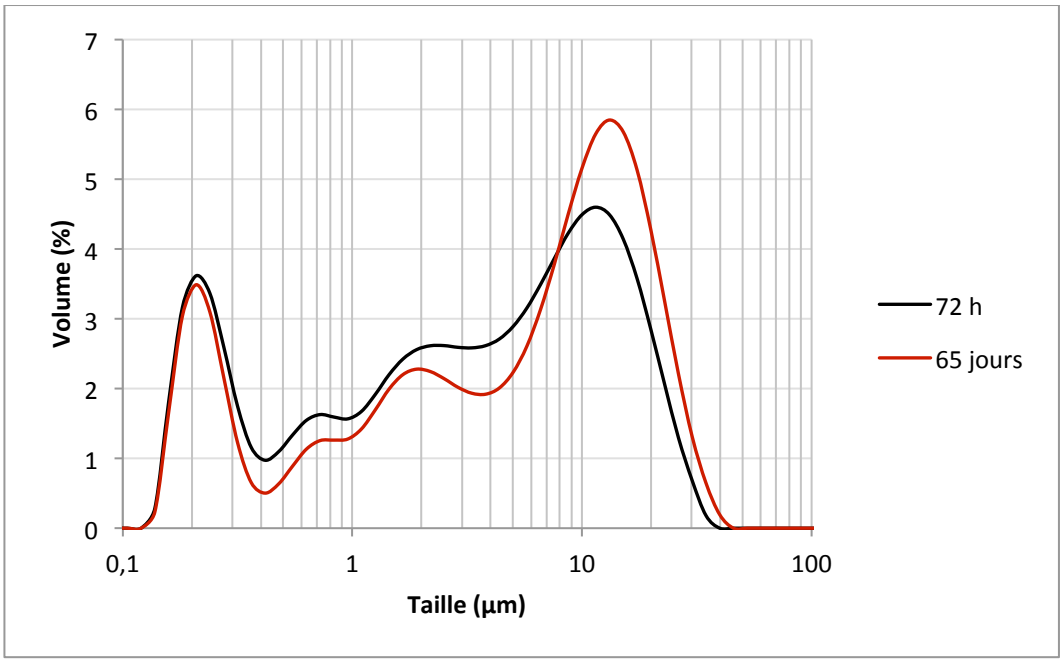


Figure 59 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N1 après un vieillissement à température ambiante de 72h et de 65 jours

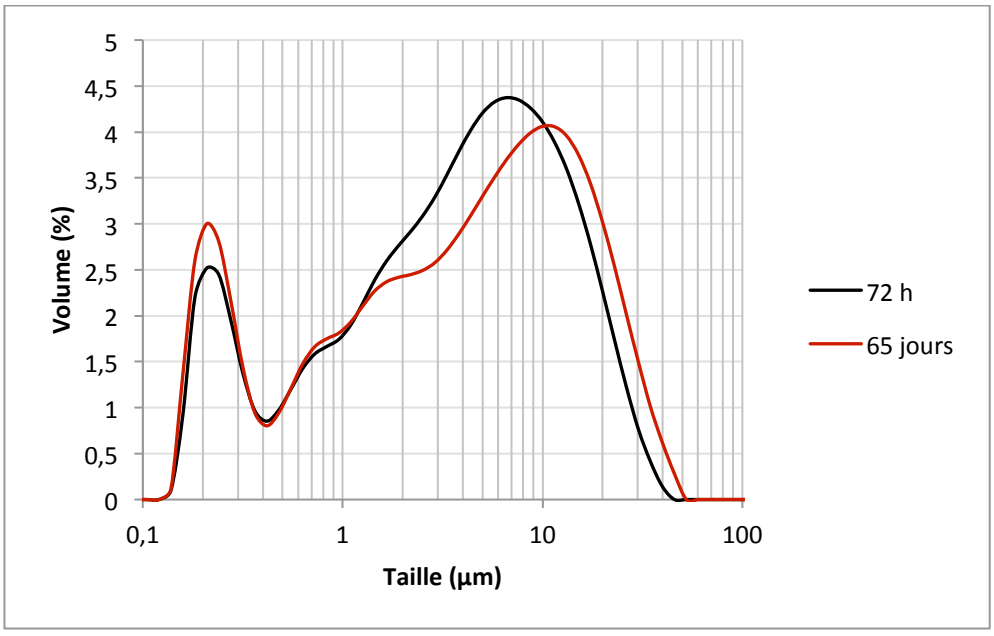


Figure 60 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-N2 après un vieillissement à température ambiante de 72h et de 65 jours

De plus, on observe une légère augmentation de tan(δ) (+16% pour F-N1 et +8% pour F-N2), ce qui indique que l'émulsion devient un peu moins élastique dans les deux cas avec le temps.

Enfin, la déformation critique γ_c diminue légèrement pour les deux émulsions (-12% et -11%), illustrant clairement que les émulsions deviennent moins déformables à mesure que les structures vieillissent. L'ajout de nanoparticules a donc fragilisé le réseau de l'émulsion au cours du temps, et ce quel que soit le traitement de surface utilisé puisqu'on observe les mêmes évolutions pour chacun des paramètres étudiés.

Le potentiel zêta extrapolé pour le pH de 6,5 des deux formulations F-N1 et F-N2 est représenté sur la Figure 61. On remarque que pour la majorité des temps donnés, le potentiel zêta de F-N1 est légèrement inférieur, en valeur absolue, à celui de F-N2, comme c'était le cas à l'état initial, mais pour les deux formulations, ces valeurs sont comprises dans le domaine de « non-stabilité électrostatique ». L'évolution pour F-N1, comme pour la formulation sans nanoparticules tend vers une légère augmentation du potentiel zêta, en valeur absolue. Quant à F-N2, les valeurs obtenues à 72h et au bout de 65 jours sont similaires, et on n'observe pas de diminution du potentiel zêta, ce qui semblerait attester que les répulsions électrostatique de la formulation F-N2 évoluent très peu.

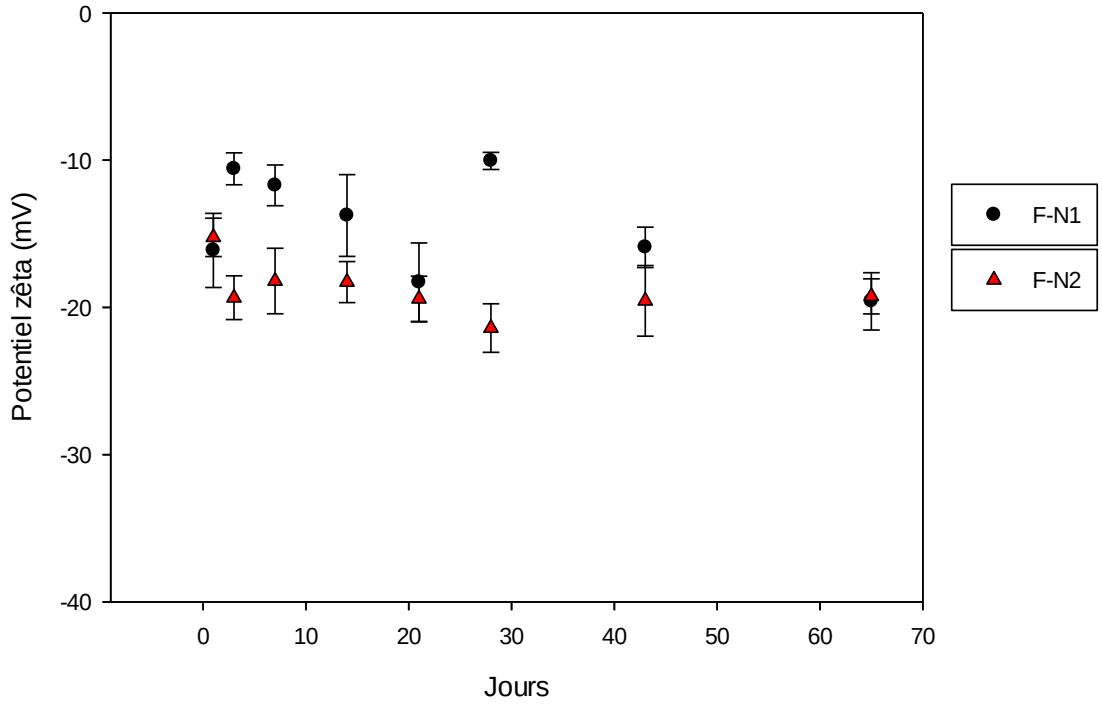


Figure 61 - Evolution du potentiel zêta de F-N1 et F-N2 en fonction du temps lors d'un vieillissement à température ambiante, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5

Pour résumer, concernant le vieillissement à température ambiante, on peut considérer que la formulation développée sans nanoparticules est restée remarquablement stable au cours des trois mois, avec une évolution de structure légèrement plus floculée au cours du temps, nous permettant ainsi de comparer notre émulsion à une formulation commerciale. En revanche, les

émulsions contenant des nanoparticules présentent davantage de signes d'instabilité, avec notamment une variation significative des paramètres rhéologiques et une augmentation de la taille des particules.

Influence du pourcentage de nanoparticules

Comme précédemment, les paramètre rhéologiques ont été mesurés pour chacune des émulsions F' contenant différents pourcentages de nanoparticules et sont résumés dans le Tableau 14. Il est difficile de comparer les évolutions des paramètres pour chacune des émulsions au cours de leur vieillissement, compte tenu de leurs différentes microstructures à l'état initial. En effet, on a vu qu'elles présentaient des caractéristiques rhéologiques, granulométriques distinctes, ce qui va donc probablement mener à des évolutions différentes pendant leur vieillissement. On pourra donc surtout discuter de l'évolution des paramètres, mais il sera très certainement impossible de les comparer aux émulsions type F. On constate cependant que pour la majorité des émulsions, le module G' augmente au cours du temps, excepté pour la formulation à 5% qui est plutôt stable, et celle à 10% qui voit son module G' diminuer.

Les émulsions avec nanoparticules ne subissent pas de grandes modifications des valeurs de tan(δ), excepté pour celle à 10% qui montre une forte diminution, signifiant un caractère plus élastique de l'émulsion.

L'étendue du domaine linéaire varie également en fonction des émulsions, elle augmente très fortement pour F'0, un peu moins pour la formulation à 10%, elle est relativement constante pour la formulation à 2,5%, et en forte diminution pour celles à 5 et 7%. On peut en déduire que pour l'émulsion sans nanoparticules, le phénomène de floculation s'intensifie avec le temps. L'ajout de nanoparticules en petite quantité permet de limiter cette floculation au cours du temps : les valeurs de γ_c sont similaires pour F'-0 et F'-N(2,5%) à 72h tandis qu'à 65 jours la valeur de γ_c pour F'-N(2,5%) est nettement moins élevée que celle de F'-0. En revanche l'ajout d'un pourcentage plus important de particules de 5 ou 7%, on l'a vu, augmente la valeur de γ_c à 72h par rapport à F'-0 mais modifie également l'évolution au cours du temps, le plateau linéaire n'augmente pas. Au contraire, l'émulsion devient plus fragile avec le temps et se détériore à des déformations plus faibles.

Tableau 14 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F' à différents % de nanoparticules, pour un vieillissement à température ambiante et pour des durées de 1 à 65 jours

F'-0									**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1534 ±54	1611 ±57	1719 ±8	1733 ±129	1858 ±5	1721 ±62	1832 ±11	1883 ±1	**17%**
tan(δ)	0,21 ±0,01	0,23 ±0,01	0,21 ±0,01	0,22 ±0,01	0,21 ±0,01	0,21 ±0,01	0,21 ±0,01	0,211 ±0,01	**-7%**
γ_c (%)	0,71 ±0,31	0,90 ±0,38	0,84 ±0,19	0,95 ±0,29	0,82 ±0,20	1,53 ±1,0	1,61 ±0,98	2,27 ±0,26	**152%**
F'-N (2,5%)									**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1844 ±3	1721 ±66	2052 ±25	2060 ±89	2054 ±8,5	1945 ±11	2230 ±100	2151 ±29	**25%**
tan(δ)	0,22 ±0,01	0,23 ±0,01	0,23 ±0,01	0,23 ±0,01	0,22 ±0,01	0,22 ±0,01	0,23 ±0,01	0,234 ±0,01	**1%**
γ_c (%)	0,82 ±0,18	0,95 ±0,33	1,05 ±0,25	1,05 ±0,25	1,04 ±0,24	1,21 ±0,42	1,15 ±0,14	1,04 ±0,23	**9%**
F'-N (5%)									**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1629 ±4,5	1533 ±9	1599 ±25	2162 ±246	1724 ±77	1491 ±68	1731 ±5	1484 ±223	**-3%**
tan(δ)	0,24 ±0,01	0,24 ±0,01	0,25 ±0,01	0,25 ±0,01	0,25 ±0,01	0,23 ±0,01	0,250 ±0,01	0,26 ±0,01	**5%**
γ_c (%)	4,10 ±0,03	4,62 ±0,55	3,32 ±0,79	3,33 ±0,77	4,10 ±0,01	3,69 ±0,40	2,93 ±0,32	2,91 ±0,33	**-37%**
F'-N (7%)									**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1390	1120 ±30	1301 ±71	1285 ±124	1241 ±131	1346 ±177	2285 ±341	1701 ±140	**52%**
tan(δ)	0,24 ±0,01	0,20 ±0,01	0,21 ±0,01	0,20 ±0,01	0,22 ±0,01	0,22 ±0,01	0,270 ±0,01	0,26 ±0,01	**29%**
γ_c (%)	1,22 ±0,42	4,12	3,23	4,07	3,24	2,91 ±0,33	1,94 ±0,64	2,68 ±0,66	**-35%**
F'-N (10%)									**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	4321 ±4	1889 ±61	1495 ±27	1261 ±37	1456 ±322	1241 ±206	1117 ±248	1246 ±374	**-34%**
tan(δ)	0,28 ±0,01	0,23 ±0,01	0,22 ±0,01	0,21 ±0,01	0,23 ±0,01	0,21 ±0,01	0,21 ±0,01	0,19 ±0,01	**-15%**

γ_c (%)	1,64	3,65 ±0,41	3,63 ±0,38	4,07	2,66 ±0,58	2,93 ±0,36	4,06	4,26 ±0,89	**17%**

Lorsque l'on s'intéresse aux valeurs granulométriques, il est également difficile de conclure sur une tendance régulière des variations de tailles de particules entre 72h et 65 jours. En effet les pourcentages volumique des particules avec une taille inférieure à 2,5 µm ou supérieure à 10 µm sont relativement stables dans le temps comme l'indique le Tableau 15. On peut également remarquer que le diamètre de Sauter pour les formulations avec nanoparticules est inférieur à celui de F-0 sans nanoparticules. Cela prouve que la majorité des particules présentes au sein de l'émulsion sont de tailles bien inférieures au diamètre des gouttelettes, et que même si on observe des agrégats de grande taille en fraction volumique importante, les particules inférieures au micron sont encore très présentes dans le milieu même après un temps de vieillissement de 65 jours. Le cas de F'-N(5%) montre une diminution du diamètre de Sauter au cours du temps, cependant, après un vieillissement de 7 jours, celui-ci était déjà à une valeur de 0,654 µm.

Tableau 15 – Pourcentage volumique des particules inférieures à 2,5 µm ou supérieures à 10 µm, ainsi que le diamètre D[3,2] pour les émulsions F' pour un vieillissement à 72h et 65 jours à température ambiante

	< 2,5 µm		**> 10 µm**		**D[3,2]**	
%	**72h**	**65 jours**	**72h**	**65 jours**	**72h**	**65 jours**
F'-0	43,7	47,8	15,8	2,9	1,585	1,710
F'-N (2,5%)	52,5	47,3	15,9	22,5	0,912	0,992
F'-N (5%)	43,7	52,5	27,4	16,7	0,836	0,691
F'-N (7%)	51,8	50,1	13,0	13,0	0,647	0,665
F'-N (10%)	56,3	52,6	11,6	17,5	0,605	0,641

c) Synthèse

	Formulation	**Caractéristiques à retenir**
Formulations F	F-0	Observation d'une légère floculation. Pas d'évolution du potentiel zêta
	F-N1	Augmentation de la taille des particules. Comportement de plus en plus visqueux. Baisse du potentiel zêta lié à l'agrégation des particules.
	F-N2	
Formulations F'	F'-0	Pas de coalescence observée, mais une légère floculation.
	F'-N	Pas d'évolution observée en fonction de la fraction volumique de nanoparticules

1.3.2 Vieillissement accéléré

Pour des conditions de vieillissement accéléré, la température à 50°C accélère les mécanismes de dégradation qui surviennent dans des conditions normales de stockage. A haute température les mouvements moléculaires responsables de la viscoélasticité sont favorisés par l'agitation thermique et les échelles de temps auxquelles ils se produisent sont modifiées. Dans ces conditions, un phénomène se produisant en un temps donné à une température donnée se produira nécessairement en un temps plus court à une température plus élevée (Carrot 1999). Les conditions de stress thermiques ne provoquent pas de modification chimique des composés de l'émulsion, mais impliquent des phénomènes de déstabilisation physique (Rieger 1991). Ainsi, les émulsions stockées à 50°C ont montré des processus de déstabilisation, comme en témoignent des changements importants pour les paramètres rhéologiques résumés dans les Tableau 16 et Tableau 17. Les mesures ont été réalisées jusqu'au phénomène de séparation de phase des émulsions : pour cette raison, F-N1 et F-0 ne sont suivies au cours du temps que pendant respectivement 21 et 28 jours.

a) Emulsion sans nanoparticules

Après stockage à haute température, la structure de l'émulsion sans nanoparticules devient moins élastique et tan(δ) augmente au cours du temps : la composante visqueuse de l'émulsion devient plus importante. Le module élastique G' diminue de 56% après 28 jours, illustrant ainsi une déstabilisation significative de l'émulsion, et qui est principalement expliquée comme une conséquence de la coalescence des gouttelettes.

Tableau 16- Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-0 pour un vieillissement à température de 50°C pour des durées de 1 à 65 jours

	F-0								Δ
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	548 ±5	482 ±4	474 ±8	312 ±2	259 ±6	276 ±9			**-56%**
tan(δ)	0,26 ±0,01	0,27 ±0,01	0,28 ±0,01	0,30 ±0,01	0,30 ±0,01	0,33 ±0,01			**27%**
γ_c (%)	1,95 ±0,60	2,20 ±0,12	2,33 ±0,43	2,70 ±0,13	3,07 ±0,41	2,35 ±0,33			**20%**

Comme on l'a déjà vu, il est possible de relier la distribution de taille des particules avec les propriétés rhéologiques. Une légère augmentation du diamètre des gouttelettes d'huile, précédemment constatée, peut être à l'origine de la diminution de la valeur du module G' (Tadros 2010). Ceci est cohérent avec l'observation microscopique qui atteste clairement l'apparition de larges gouttelettes au cours du temps, comme l'indique la Figure 62 (a) avec la

mise en évidence de ces gouttelettes de plus grandes tailles par les flèches, en comparaison avec les clichés microscopiques de l'émulsion après un vieillissement à température ambiante qui indiquait des signes de floculation avec la présence d'espaces vides plus nombreux (b).

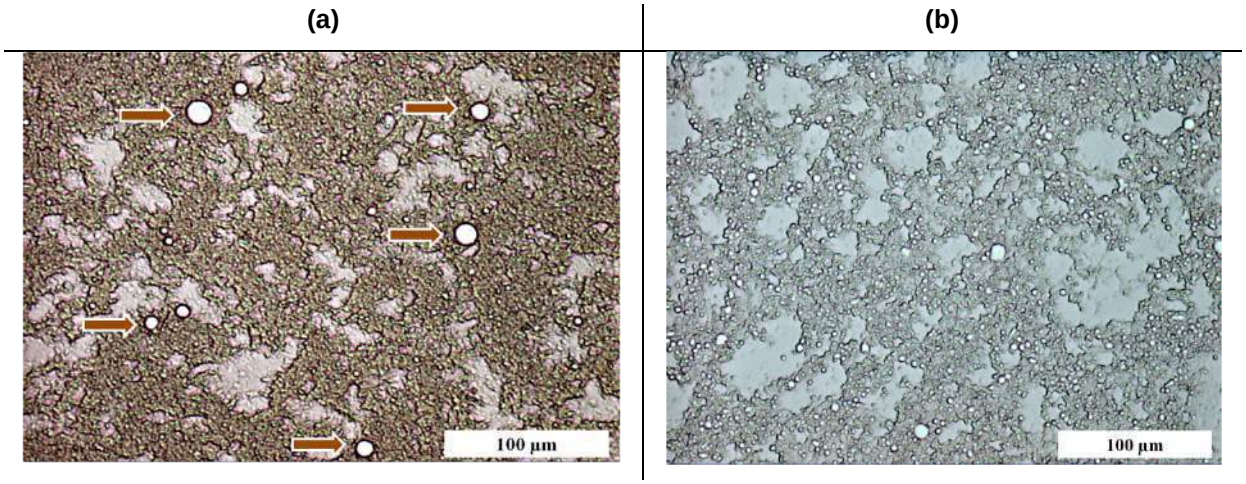


Figure 62 - Images microscopiques de la formulation F-0, (a) 28 jours après un vieillissement à 50°C et (b) 65 jours après un vieillissement à température ambiante

Après 28 jours, tan(δ) augmente de façon significative (+27%), ce qui atteste d'un comportement de plus en plus visqueux de l'émulsion. La formation de gouttelettes plus grosses augmente la capacité de crémage, et aboutit au phénomène de séparation de phases observé macroscopiquement.

Les mesures de taille des particules ont permis de confirmer l'hypothèse du phénomène de coalescence pour F-0 stockée à 50°C puisqu'une augmentation des plus grandes tailles de gouttelettes a été observée. En effet, 31% des gouttelettes sont plus grandes que 10 microns après 65 jours à 50°C par rapport à 17% après 72 heures à 50°C et 1,7% pour 65 jours à température ambiante. L'évolution de la répartition des gouttelettes est montrée sur la Figure 63 confirmant ainsi cette augmentation de taille des gouttelettes avec la température et le temps de vieillissement.

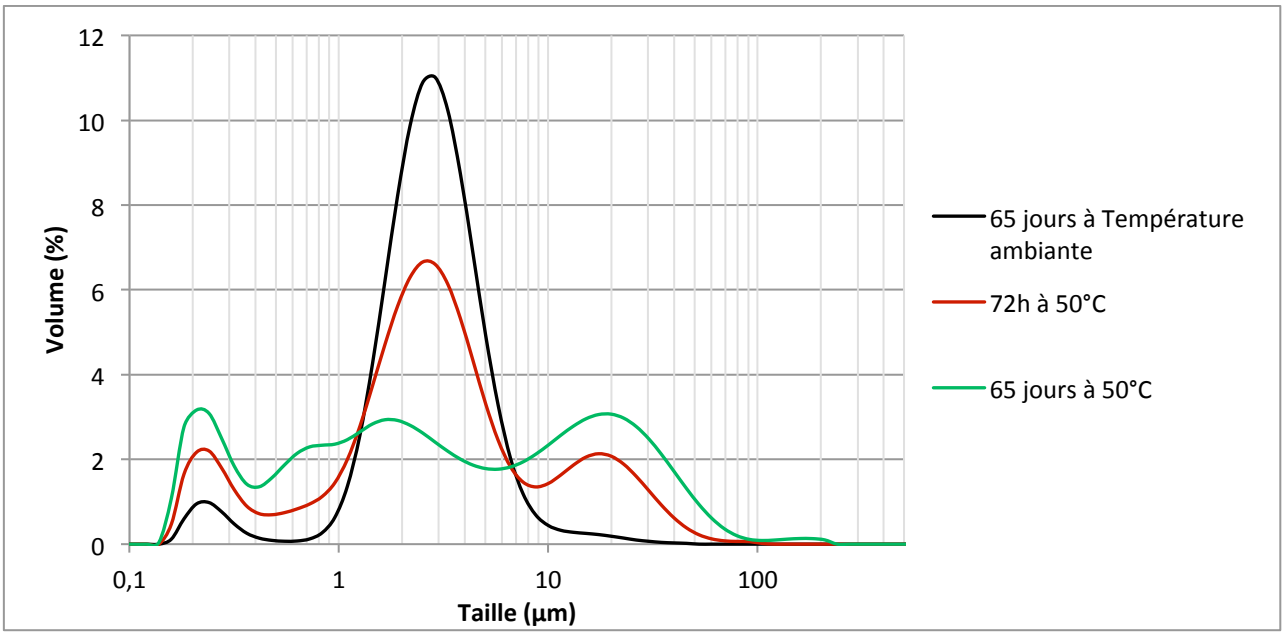


Figure 63 - Distribution de taille des gouttelettes en pourcentage volumique pour l'émulsion F-0 après un vieillissement à température ambiante de 65 jours et un vieillissement à 50°C de 72h et 65 jours

L'évolution du potentiel zêta extrapolé (Figure 64) montre, à 43 jours à 50°C, une légère augmentation du potentiel en valeur absolue, compte tenu de l'importance des écart-types, par rapport aux quatorze premiers jours où le potentiel zêta était relativement stable. Cela signifie que les gouttelettes, bien que coalescées comme on l'a expliqué précédemment, exercent des répulsions électrostatiques plus fortes après un certain temps de vieillissement à 50°C, se rapprochant alors du domaine considéré comme électrostatiquement stabilisé.

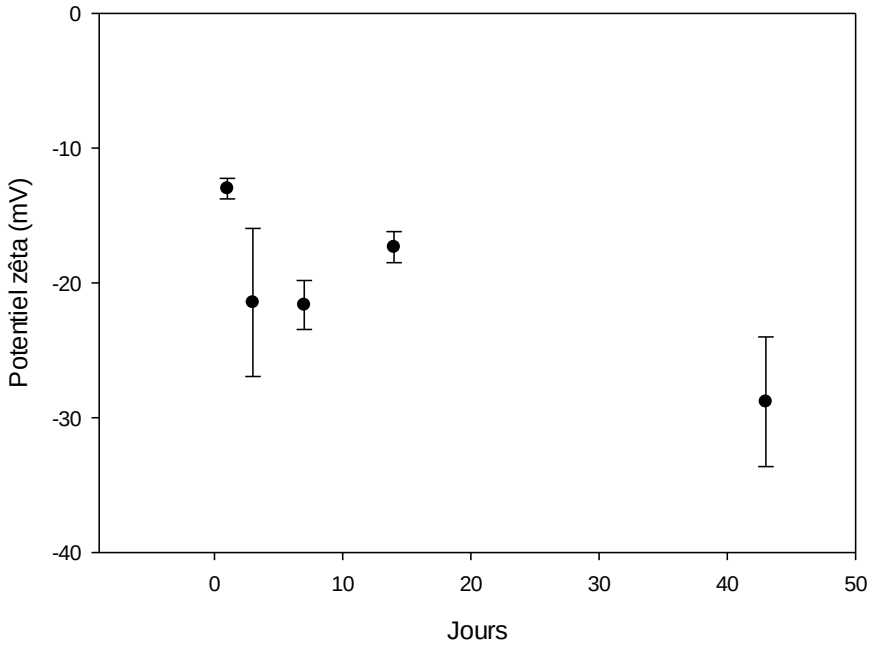


Figure 64 - Evolution du potentiel zêta de F-0 en fonction du temps lors d'un vieillissement à 50°C, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5

b) Emulsions avec nanoparticules

Influence des nanoparticules et de leur traitement de surface

Comme l'indique le Tableau 17, le stockage à 50°C induit tout d'abord une diminution significative de G' qui peut être interprétée par la coalescence des gouttelettes d'huile. Par la suite, une forte augmentation du module G' a été observée, plus rapide pour F-N1 que pour F-N2, et est interprétée comme le résultat d'une agrégation des particules. Le module traduit la résistance de la crème à la déformation mécanique : plus il y a de particules solides, plus l'échantillon est résistant à la déformation appliquée et plus le module est élevé. Le module G' atteint des valeurs très élevées après 21 jours à 50°C pour F-N1, tandis que des valeurs similaires ont été obtenues un mois plus tard pour F-N2.

Tableau 17 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F-N1 et F-N2 pour un vieillissement à température de 50°C pour des durées de 1 à 65 jours

	F-N1								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	424 ±47	289 ±14	448 ±31	1049 ±53	1103 ±651				**160%**
tan(δ)	0,33 ±0,01	0,36 ±0,01	0,35 ±0,01	0,33 ±0,01	0,24 ±0,01				**-27%**
γ_c (%)	1,68 ±0,18	1,51 ±0,07	1,25 ±0,04	0,87 ±0,04	0,57 ±0,06				**-66%**
	F-N2								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	605 ±30	585 ±80	711 ±87	636 ±69	574 ±102	991 ±172	852 ±27	1500 ±135	**41%**
tan(δ)	0,29 ±0,01	0,30 ±0,01	0,31 ±0,01	0,31 ±0,01	0,35 ±0,01	0,33 ±0,03	0,34 ±0,01	0,31 ±0,01	**13%**
γ_c (%)	1,94 ±0,08	1,85 ±0,44	1,49 ±0,31	1,15 ±0,31	0,79 ±0,05	1,08 ±0,06	0,51 ±0,06	0,40 ±0,16	**-80%**

Par ailleurs, une diminution de γ_c a été observée au cours du vieillissement accéléré, une fois de plus, plus rapidement pour F-N1 que pour F-N2. La combinaison de ces phénomènes pendant le vieillissement confirme l'agrégation des particules dans l'émulsion (Tadros 2004). Les mécanismes de déstabilisation ont été principalement contrôlés par le comportement des particules : l'agrégation pourrait résulter en effet des fortes interactions attractives entre les particules de TiO_2 où les forces de répulsion ne dominent plus. De plus, lorsque les solides sont beaucoup plus gros que les gouttelettes d'huile, l'émulsion agit comme une phase continue envers les solides, et l'interaction entre les solides et les gouttelettes d'huile devient négligeable (Yan, Gray & Masliyah 2001) (cf 2.5.2b) p.67). La granulométrie et la microscopie

ont chacune permis de confirmer, que pour les deux formulations, une augmentation de la taille moyenne des particules était liée à l'agrégation des particules. Par exemple, pour F-N1 après 65 jours à température ambiante ou 72 heures à 50°C, les micrographes (a) et (b) de la Figure 65 présentent une répartition inhomogène avec différentes tailles de particules. En revanche, au bout de 21 jours à 50°C, le phénomène d'agrégation est frappant (cliché (c)). On précise que ces clichés ont été réalisés sur des échantillons prélevés au sein de la crème, et non en surface où des phénomènes de crémage auraient pu mettre en doute l'interprétation des micrographes.

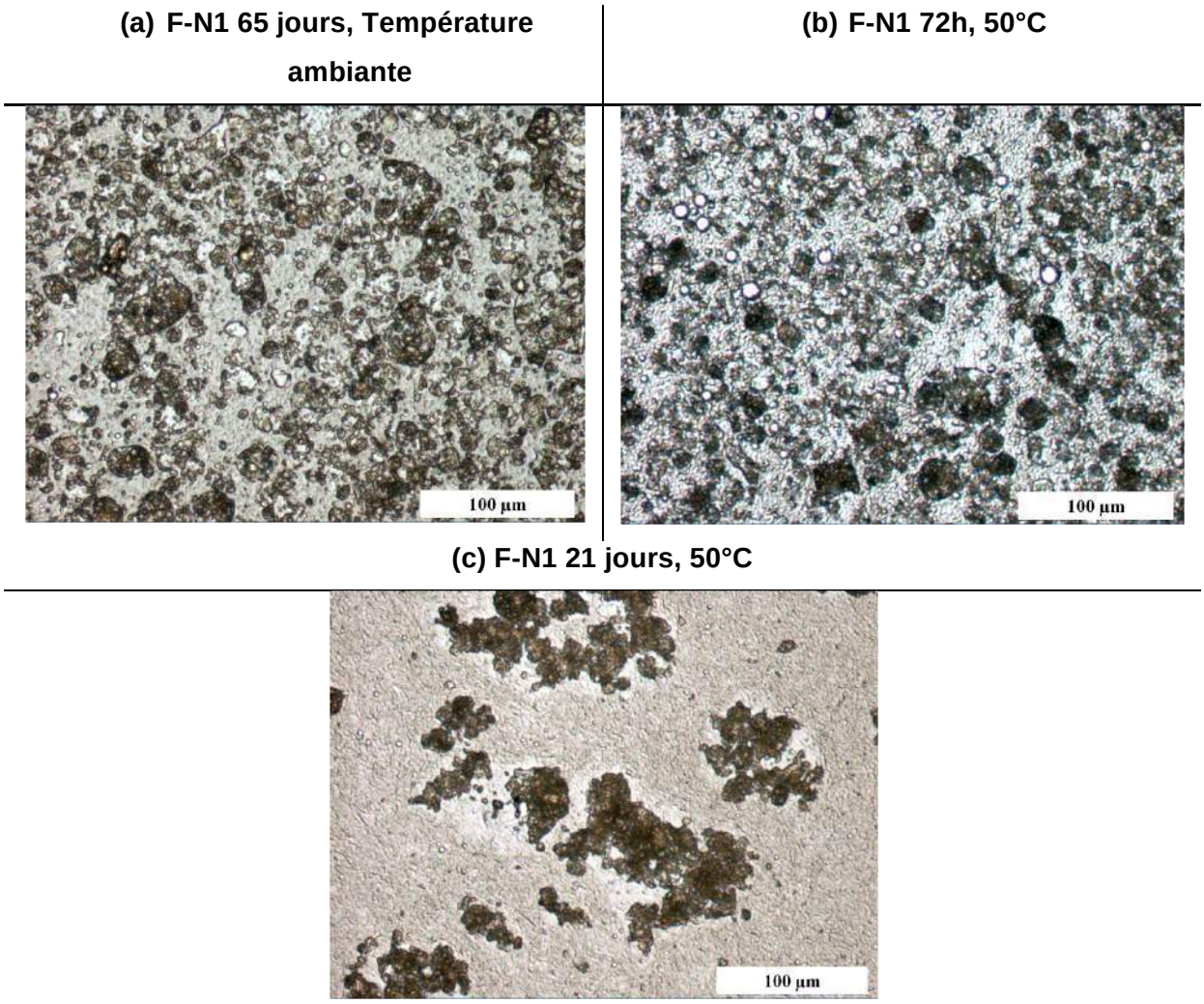


Figure 65 - Images microscopiques des formulations F-N1 à différents temps de vieillissement. Après 65 jours à température ambiante (a), 72h à 50°C (b) et 21 jours à 50°C (c)

Pour F-N2, on observe également deux différentes configurations du système: les particules solides fortement agrégées d'un côté (cliché (a) de la Figure 66), et les gouttelettes d'huile dans la phase aqueuse continue de l'autre (cliché (b)).

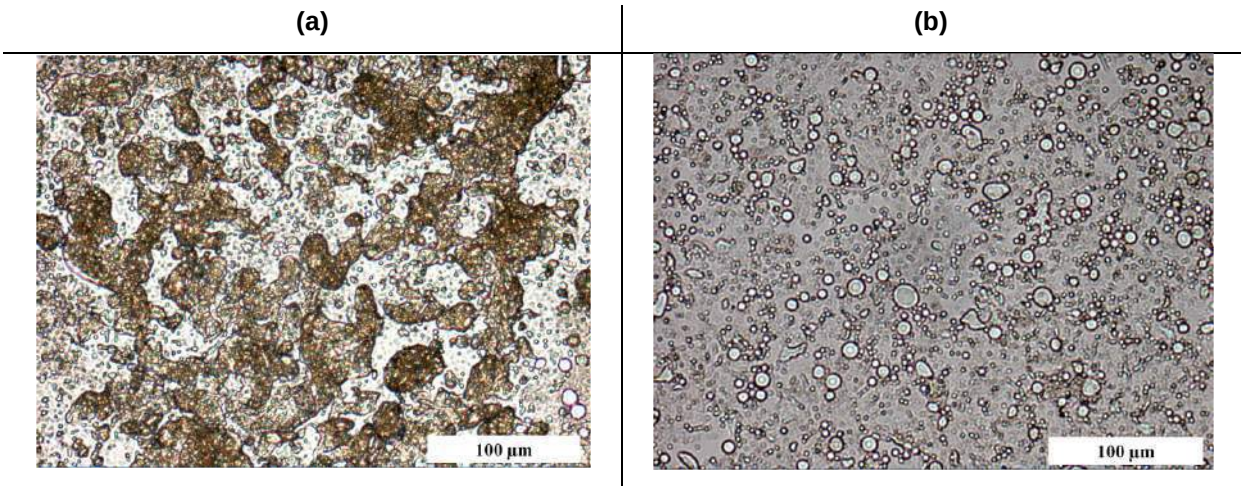


Figure 66 - Images microscopiques des formulations F-N2 à différents temps de vieillissement. Après 43 jours à 50°C : on observe l'agrégation des nanoparticules d'un côté (a), et les gouttelettes d'huile de l'autre (b)

On observe que le phénomène d'agrégation est plus tardif pour F-N2. Cela pourrait s'expliquer par le fait que F-N2 soit moins fluide que F-N1 et donc que la diffusion des nanoparticules dans l'émulsion soit moins rapide. Une seconde hypothèse, comme on l'a déjà précisé, est que le coating 2 est beaucoup plus encombré stériquement que le coating 1, avec une surface plus difficile à atteindre : en conséquence, des effets stériques plus importants sont attendus donc une répulsion stérique entre les particules plus importante que pour la formulation F-N1. C'est cette répulsion stérique plus importante qui pourrait retarder l'agrégation des particules au sein de F-N2 par rapport à F-N1, les répulsions électrostatiques étant faibles dans les deux formulations.

Concernant le potentiel zêta, en valeur absolue, les valeurs de potentiel de F-N1 sont toujours légèrement inférieures à celles de F-N2, mais dans les deux cas ces valeurs restent inférieures à 30 mV en valeur absolue. En comparaison avec la Figure 61 p.168, les valeurs de potentiel zêta pour les deux émulsions sont inférieures en valeur absolue, ce qui suppose que les émulsions conservées à 50°C sont moins stabilisées par répulsions électrostatiques. Le potentiel zêta, représentant de la charge globale des particules en émulsion pour F-N1 et F-N2 évolue dans la même gamme de valeurs, ce qui confirme que l'agrégation des particules, remarquée plus haut et apparaissant à des temps bien différents n'est pas gouvernée par la répulsion électrostatique des particules.

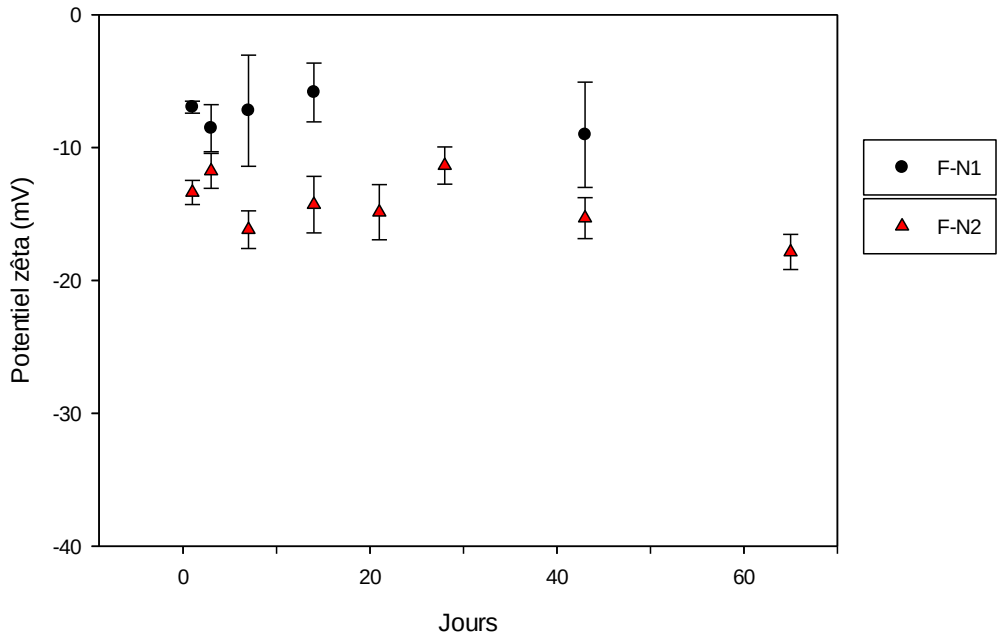


Figure 67 - Evolution du potentiel zêta de F-N1 et F-N2 en fonction du temps lors d'un vieillissement à 50°C, pour des valeurs extrapolées de pH de l'émulsion de 6,5

Influence du pourcentage de nanoparticules

Comme le montre le Tableau 18, pour F'-0 et F'-N (2,5%), les valeurs du module G' des émulsions conservées à 50°C sont très nettement inférieures à celles pour les émulsions conservées à température ambiante. Cet effet de la température est beaucoup moins visible pour les émulsions contenant 5, 7 et 10% de particules. On observe également pour chacune des émulsions, une augmentation de l'angle de phase tan(δ), qui correspond à un comportement plus visqueux de l'émulsion.

Au cours du temps, le module G' pour F'-0 tend à diminuer au cours du temps, excepté pour la valeur à 65 jours qui est légèrement supérieure à la valeur initiale. Pour les autres émulsions, une baisse de G' est observée. Pour F'-0 et F'-N (2,5%), la contrainte critique augmente très fortement, significatif d'un phénomène de floculation, alors que pour les formulations à 5, 7 et 10% cette même contrainte diminue nettement. Comme pour le cas des formulations F-N1 et F-N2, la présence de particules affaiblit le réseau de l'émulsion qui devient moins déformable au cours du temps à un vieillissement accéléré. Cependant, nous n'observons pas pour ces émulsions de fortes augmentation du module G' au cours du temps, interprétées précédemment par une très forte agrégation des particules. On peut supposer que les nanoparticules provoquent de plus faibles mécanismes de déstabilisation de l'émulsion. Elles sont possiblement davantage stabilisées dans le réseau de cette émulsion F' plutôt que dans la précédente. En effet, la formulation sans nanoparticules F'-0, semblent présenter une déstabilisation plus faible que F-0, en ne montrant pas de signe de coalescence par exemple. Cette différence est liée à la modification de l'agent de consistance le cetearyl alcohol à la

place de la paraffine. L'incorporation de nanoparticules a des effets différents sur la déstabilisation de cette émulsion F'-N par rapport à ceux observés pour l'émulsion F-N.

Tableau 18 - Valeurs des paramètres rhéologiques G', tan(δ) et γ_c pour F' à différents % de nanoparticules, pour un vieillissement à 50°C et pour des durées de 1 à 65 jours

	F'-0								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	978 ±36	1002 ±73	1165 ±5	954 ±49	986 ±13	736 ±100	666 ±46	1057 ±138	**6%**
tan(δ)	0,25 ±0,02	0,31 ±0,06	0,26 ±0,01	0,26 ±0,01	0,27 ±0,01	0,21 ±0,01	0,23 ±0,01	0,26 ±0,02	**-18%**
γ_c (%)	0,85 ±0,44	0,45 ±0,06	0,57 ±0,25	0,77 ±0,25	0,75 ±0,25	1,25 ±0,74	0,81 ±0,17	1,81 ±0,22	**300%**
	F'-N 2,5%								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1191 ±62	1248 ±3	1239 ±80	1091 ±58	1109 ±104	922,1 ±107	1245 ±83	1167 ±110	**-7%**
tan(δ)	0,29 ±0,01	0,30 ±0,01	0,30 ±0,01	0,32 ±0,01	0,32 ±0,01	0,34 ±0,02	0,42 ±0,01	0,33 ±0,01	**11%**
γ_c (%)	0,58 ±0,07	0,73 ±0,32	0,60 ±0,20	1,17 ±0,85	0,58 ±0,07	1,03 ±0,61	1,06 ±0,25	1,04 ±0,23	**43%**
	F'-N 5%								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1180 ±30	1576 ±135	1467	1352	1652	1045	968,7		**-39%**
tan(δ)	0,32 ±0,01	0,34 ±0,01	0,34	0,39	0,35	0,36	0,35		**4%**
γ_c (%)	3,29	2,56	1,30	1,28	1,02	1,63	1,30		**-49%**
	F'-N 7%								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1095 ±53	1247 ±35	1820	1475	1011	1195	1200	1202	**-4%**
tan(δ)	0,33 ±0,01	0,34 ±0,01	0,34	0,37	0,37	0,37	0,34	0,29	**-16%**
γ_c (%)	3,24	3,24	1,29	1,27	1,29	1,81	1,62	1,64	**-49%**
	F'-N 10%								**Δ**
Jours	**1**	**3**	**7**	**14**	**21**	**28**	**43**	**65**	
G' (Pa)	1524 ±69	1429 ±156	1321 ±80	981,3	1451	1338	1452	1352	**-5%**
tan(δ)	0,33 ±0,01	0,34 ±0,01	0,36 ±0,01	0,37	0,36	0,36	0,36	0,36	**4%**
γ_c (%)	2,12 ±0,49	2,60	1,29	1,27	2,06	1,29	1,62	1,64	**-37%**

Les analyses granulométriques renseignent sur les proportions volumiques des particules dans l'émulsion (Tableau 19) et montrent peu d'évolution pour les émulsions au cours du temps. Les émulsions contenant des nanoparticules ont un diamètre de Sauter plus faible que pour l'émulsion sans nanoparticules et celui-ci n'évolue pas durant une période de 65 jours à 50°C. En utilisant cet ingrédient, il n'y a donc pas de possibilité de déstabilisation de l'émulsion, cet ingrédient tend à stabiliser notre émulsion.

Tableau 19 - Pourcentage volumique des particules inférieures à 2,5 µm ou supérieures à 10 µm, ainsi que le diamètre D[3,2] pour les émulsions F' pour un vieillissement à 72h et 65 jours à 50°C

	< 2,5 µm		**> 10 µm**		**D[3,2]**	
	72h	***65 jours***	***72h***	***65 jours***	***72h***	***65 jours***
F'-0	42,9	44,1	16,0	23,6	1,646	1,220
F'-N (2,5%)	47,9	55,4	27,8	19,4	0,894	0,730
F'-N (5%)	48,2	49,1	26,2	27,2	0,720	0,711
F'-N (7%)	45,5	44,8	27,6	30,4	0,742	0,766
F'-N (10%)	56	53,5	15,4	21,5	0,604	0,628

c) Synthèse

	Formulation	**Caractéristiques à retenir**
Formulations F	F-0	Observation d'une coalescence. Objets plus gros davantage chargés et donc potentiel zêta plus élevé.
	F-N1 et F-N2	Agrégation des nanoparticules : augmentation de G' et potentiel zêta plus faible que pour un vieillissement à température ambiante car moins de répulsions électrostatiques. Phénomène identiques pour F-N1 et F-N2 mais apparaissant plus tard pour le coating 2.
Formulations F'	F'-0	Forte floculation, néanmoins, la déstabilisation observée est plus faible que pour F-0
	F'-N	Comportement plus visqueux. Les particules affaiblissent le réseau au cours du temps

1.4 Extraction du milieu de formulation des nanoparticules

Les émulsions subissent donc des déstabilisations physico-chimiques au cours du temps, et particulièrement en présence des nanoparticules. Il est donc très vraisemblable que ces nanoparticules elles-mêmes subissent des modifications de surface lors de leur incorporation au sein de l'émulsion, et tout au long des cycles de vieillissement. Afin de caractériser au mieux ces changements physico-chimiques et d'évaluer la stabilité du traitement de surface

des nanoparticules utilisé, nous avons donc décidé d'extraire les nanoparticules des formulations F-N1 et F-N2, immédiatement après fabrication ou après un vieillissement important de 40 jours à 50°C. En effet, il n'est pas possible au stade des connaissances et techniques actuellement connues, de caractériser une dispersion de nanoparticules au sein d'une émulsion complexe.

1.4.1 Nanoparticules brutes

Avant de procéder à l'extraction des particules, intéressons-nous aux caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules brutes de TiO_2, avant incorporation dans la formulation.

a) Analyses infrarouge

La spectroscopie infrarouge est un outil indispensable pour l'étude des surfaces des nanoparticules. C'est une méthode non destructive rapide pour l'identification des adsorbats de surface. Les changements de fréquences d'absorption infrarouge caractéristiques fournissent des informations sur la surface d'adsorption, en plus de l'identification qualitative des adsorbats. Par exemple, une fréquence d'absorption infrarouge décalée vers le rouge (c'est-à-dire décalé à valeur plus basse, correspondant à une longueur d'onde) est une indication de liaison affaiblie dans l'adsorbat (Burrows 2010).

Les analyses infrarouge des nanoparticules brutes de TiO_2 de coating 1 et 2 sont représentées sur la Figure 68. Le spectre est similaire à la Figure 25 p.115. Le signal est faible, ce qui est le cas lors de mesures en ATR du solide mais les spectres présentent certaines bandes caractéristiques comme la bande d'élongation des OH à 3375 cm^{-1}, qui correspond aux groupe hydroxyles présents à la surface du TiO_2 ainsi qu'à la présence éventuelle d'humidité dans l'échantillon. La bande d'adsorption à 1560 cm^{-1} est due à la présence d'humidité dans l'échantillon. La large bande intense au voisinage en dessous de 800 cm^{-1} est due aux vibrations Ti-O (Liufu, Xiao & Li 2005). La bande à 2926 cm^{-1} peut être due à la vibration d'élongation C-H du triethoxycaprylylsilane du traitement de surface, que l'on retrouve à 1460 cm^{-1} et la bande à 1150 cm^{-1} à la liaison Si-CH_2-CH_3 présente dans le coating 1 (Launer 1987). Les liaisons Si-O-Ti du coating 2 et ou Al-O du traitement de passivation ne sont pas visibles dans la gamme de nombre d'onde mesurée de même que les pics d'absorption attribués aux vibrations de valence des liaisons Ti-O (550-650 cm^{-1}) et Ti-O-Ti (435-535 cm^{-1}) du dioxyde de titane (Wang *et al.* 2007). Cependant il n'est pas possible de distinguer dans ces régions de spectre IR la présence du groupement stéarate présent dans le coating 2 par rapport au coating 1 : les deux spectres sont rigoureusement identiques, indiquant seulement la présence des chaines alkyles.



Figure 68 – Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules de coating 1 (en rouge) et 2 (en noir)

b) Potentiel Zêta

Comme on l'a vu les nanoparticules de TiO_2 ne sont pas hydrophiles et donc il n'est pas possible de les disperser dans l'eau. Leur potentiel zêta a donc été mesuré dans le DMSO, qui s'est avéré un solvant permettant une bonne solubilisation des nanoparticules.

La théorie de potentiel zêta pour les particules dispersées dans les solvants organiques a été très peu étudiée et il peut y avoir des complications qu'on ne rencontre pas dans le milieu aqueux. Une étude précise que la particule peut acquérir sa charge par transfert direct d'électrons d'une molécule non chargée, et non par adsorption d'un ion. Cela diffère des solutions aqueuses, dans lesquelles la charge a lieu par adsorption d'ions. Dans les deux cas, la contre-charge est portée par des ions mobiles dans le liquide environnant. Le comportement ultérieur de la particule chargée, y compris sa mobilité, ne devrait pas dépendre de la façon dont il a acquis sa charge (Labib & Williams 1984).

Comme le montre la Figure 69, ce potentiel est positif quel que soit le traitement de surface utilisé (coating 1 ou 2) sans différence significative entre ces deux traitements de surface. En revanche, ces valeurs sont très différentes de celle du potentiel zêta du dioxyde de titane non

nanométrique et non traité en surface : les nanoparticules utilisées dans notre étude ont un potentiel zêta centré autour des valeurs +16 mV, tandis que le TiO_2 brut a un potentiel zêta de -12 mV dans le DMSO. Ce solvant se comporte donc ici comme un solvant protique équivalent à l'eau à pH 7. Ce qui montre que la surface du dioxyde de titane des nanoparticules est totalement enrobée par le traitement de surface et n'intervient pas dans la valeur du potentiel de surface. Il aurait été également intéressant de mesurer le potentiel zêta du dioxyde de titane nanométrique non enrobé ou de dioxyde de titane non nanométrique et enrobé afin de comparer les valeurs selon un seul paramètre variable : la taille ou le traitement de surface. Cependant ce ne sont pas des produits commerciaux disponibles, et ces études n'ont pas été reportées dans la littérature.

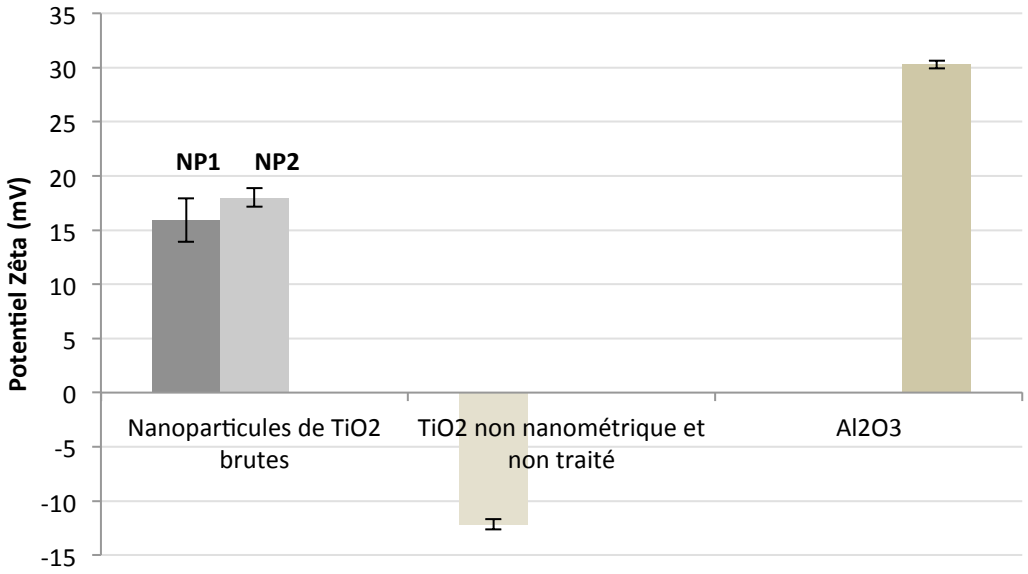


Figure 69 - Potentiel zêta des nanoparticules de TiO_2 brutes et du TiO_2 non nanométrique et non traité

En revanche, lorsqu'on mesure la valeur du potentiel zêta de l'alumine Al_2O_3 dans le DMSO, on constate que sa valeur est de 30,3 mV. La valeur positive du potentiel zêta des nanoparticules est donc probablement liée à l'alumine, le traitement de passivation de nos nanoparticules, en plus du traitement de surface organique. Néanmoins il ne nous est pas possible d'évaluer la contribution de chacun.

1.4.2 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules extraites : 1er protocole

Le premier protocole d'extraction a consisté à l'extraction des particules, décrite dans la partie Matériels et Méthodes, mais sans la dernière étape de lavage au DMSO (cf 1.3 p.105).

a) Potentiel Zêta

Lorsqu'on mesure le potentiel zêta des nanoparticules de TiO_2 extraites de formulations fraîches ou vieillies selon ce premier protocole, on constate une différence significative avec les

valeurs pour les particules brutes, comme le montre la Figure 70. Dans chacun des cas, les valeurs de potentiel zêta restent positives. Pour les nanoparticules extraites d'une formulation fraîche, on obtient une valeur moyenne pour les deux coatings de 23 mV. Et pour les nanoparticules extraites d'une formulation vieillie, le potentiel zêta pour les nanoparticules de coating 1 est très inférieur à celui des nanoparticules brutes, avec une valeur de 6 mV, tandis que le coating 2 montre une valeur bien différente de 28 mV. Ces modifications significatives du potentiel zêta illustrent des modifications de surface des nanoparticules après extraction de la formulation. On peut alors supposer qu'il s'est produit une dégradation du traitement de surface, comme cela a été déjà le cas dans certaines études (Auffan *et al.* 2010; Labille *et al.* 2010; Virkutyte, Al-Abed & Dionysiou 2012) et/ou une adsorption de composés organiques de l'émulsion cosmétique à la surface des particules.

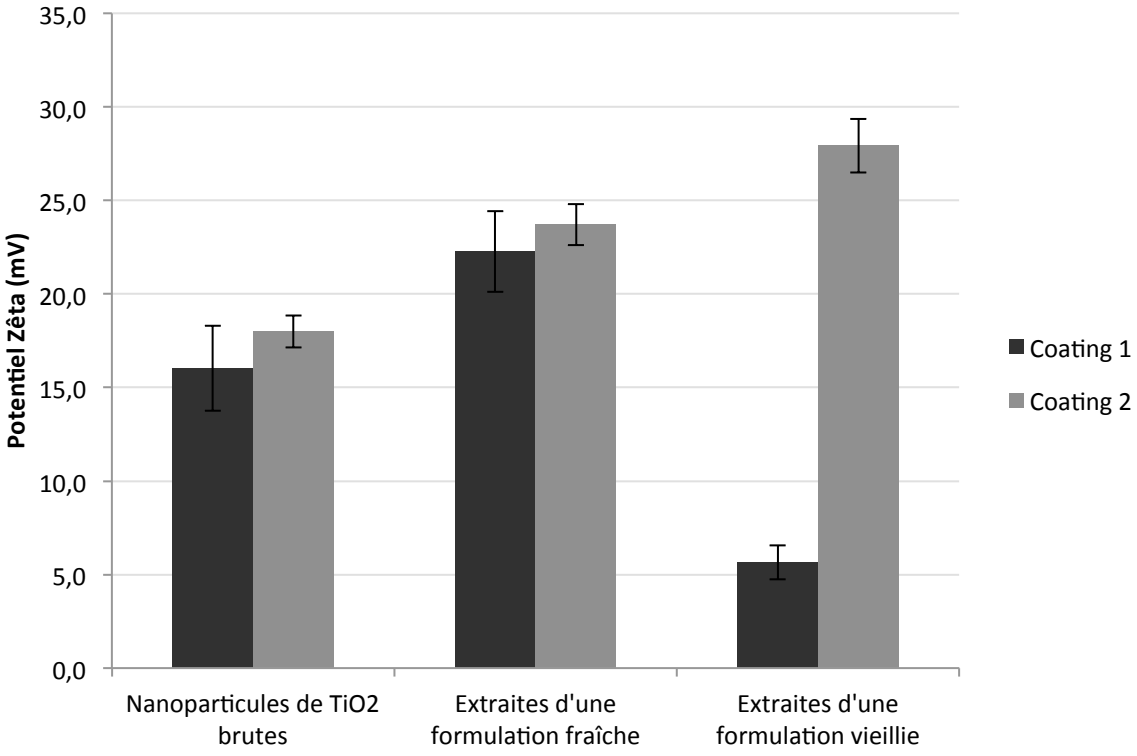


Figure 70 - Potentiel zêta des nanoparticules brutes et extraites selon le 1er protocole d'extraction des formulations fraîche et vieillie (40 jours), pour les deux traitements de surface utilisés

b) Infrarouge

Afin de tenter de comprendre ces modifications de surface, nous avons réalisé les analyses infrarouges sur ces particules extraites. Les spectres des nanoparticules extraites de formulations fraîches et vieillies selon le premier protocole d'extraction sans DMSO sont représentés respectivement sur les Figure 71 et Figure 72. On remarque que dans chacun des cas, indépendamment du coating, les spectres présentent exactement les mêmes bandes d'absorption. Elles sont d'intensités variables, du fait des conditions de préparation de l'échantillon. En normalisant un signal, nous nous sommes assurés que les bandes se superposaient et étaient donc de même intensités relatives, aux différences de trajet optique

près. On retrouve comme pour les spectres des nanoparticules brutes la bande d'élongation des OH ; les bandes à 2900 et 1460 cm^{-1} correspondent aux liaisons C-H de groupes alkyles. Elles peuvent être associées à certains composants de la formulation comme les tensioactifs ou l'ester cetearylethylhexanoate. En revanche on peut noter l'apparition d'une bande vers les 1734 cm^{-1}, correspondant probablement à la bande d'élongation de la liaison C=O d'un ester aliphatique comme le cetearylethylhexanoate. La liaison C-O de ce même ester pourrait apparaître sur les bandes d'élongation de 1343 et 1110 cm^{-1}. Compte tenu de ces résultats, il est manifeste que certains composants organiques de la formulation ont été adsorbés à la surface de la particule, et que le traitement réalisé lors de l'extraction n'est pas assez efficace pour les désorber. Cela remet donc en cause la pureté des particules extraites selon les procédés d'extraction décrits dans la littérature. Les méthodes décrites dans l'étude de Nischwitz & Goenaga-Infante 2012 permet d'obtenir des suspensions de particules de dioxyde de titane désagrégées et similaires en terme de tailles aux nanoparticules brutes, mais d'après nos résultats il est clair qu'il reste des résidus de formulation adsorbés à la surface de la particule.

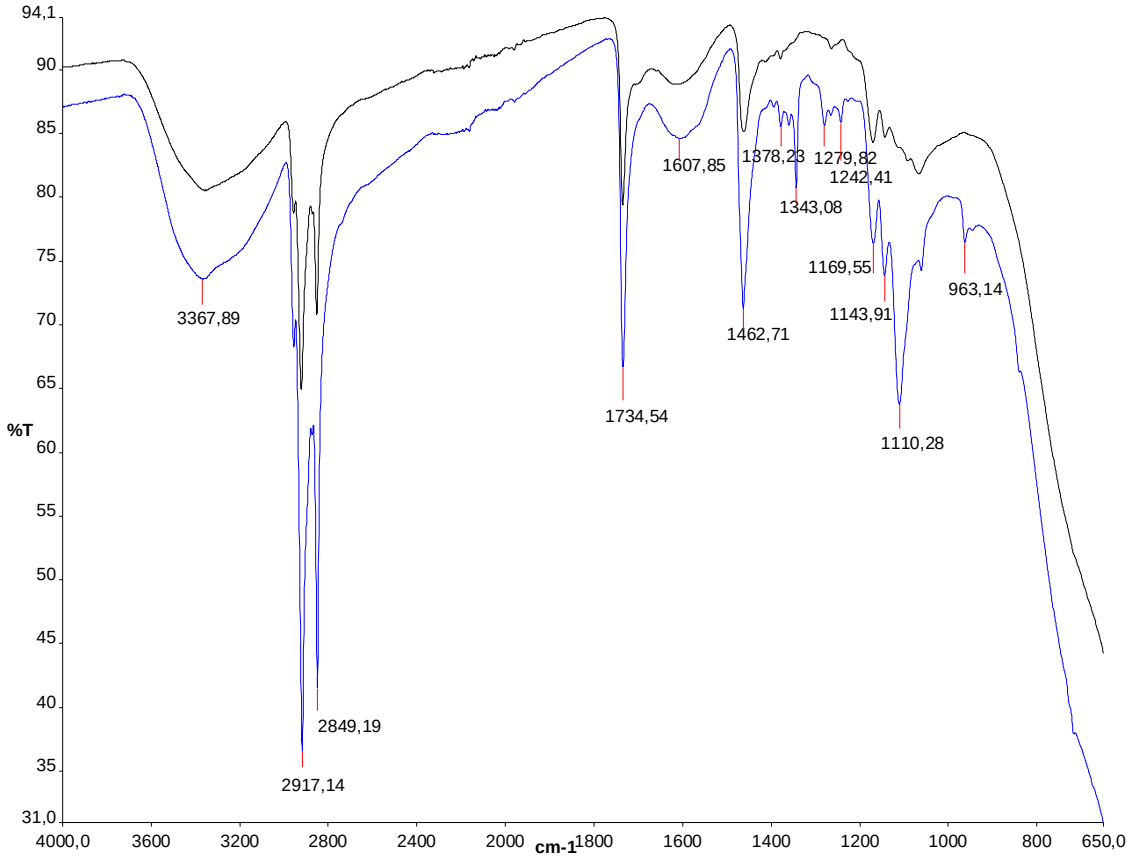


Figure 71 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations fraîches de coating 1 (noir) et 2 (bleu)

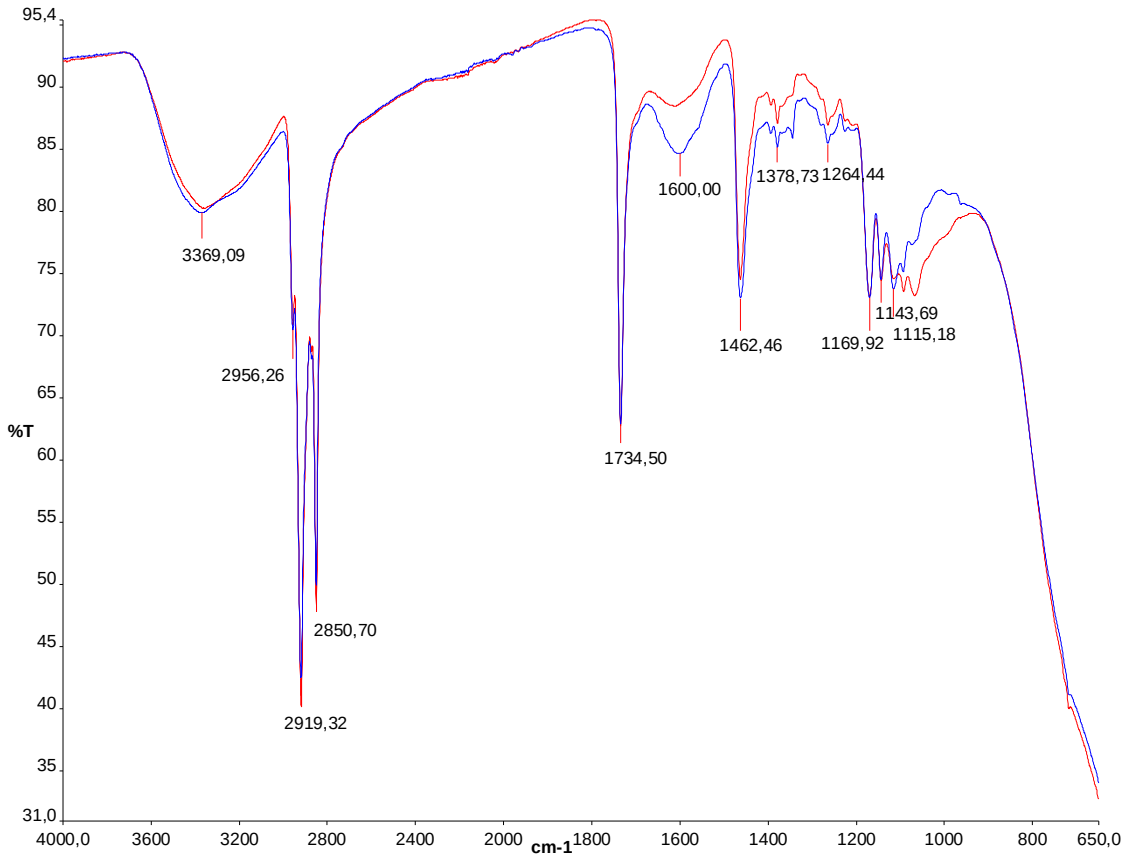


Figure 72 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations vieillies (40 jours) de coating 1 (bleu) et 2 (rouge)

1.4.3 Caractérisation physico-chimique des nanoparticules extraites : 2nd protocole

Afin de minimiser la présence de résidus de formulation à la surface des particules, nous avons mis en place le deuxième protocole d'extraction, qui a nécessité une étape de lavage supplémentaire au DMSO. Précédemment, la dernière étape faisait intervenir du méthanol, un solvant couramment utilisé pour solubiliser de nombreux composés organiques mais le DMSO solubilise davantage de composés organiques, y compris certaines résines et polymères, ainsi que des composés inorganiques. Les nanoparticules ont été soumises aux mêmes techniques d'analyse afin de repérer les éventuelles modifications.

a) Analyses Infrarouge

On a superposé sur la Figure 73, les nanoparticules extraites de la formulation fraîche F-N2 selon le premier protocole (en noir) et selon le second protocole (en bleu). Seules les bandes différentes sont annotées sur le graphe. On remarque que grâce au lavage par le DMSO, on a probablement réussi à retirer les composés organiques de la formulation adsorbés à la surface des particules. En effet la bande d'absorption à 1700 cm^{-1} disparait ainsi que celles entre 952 et 1436 cm^{-1}.

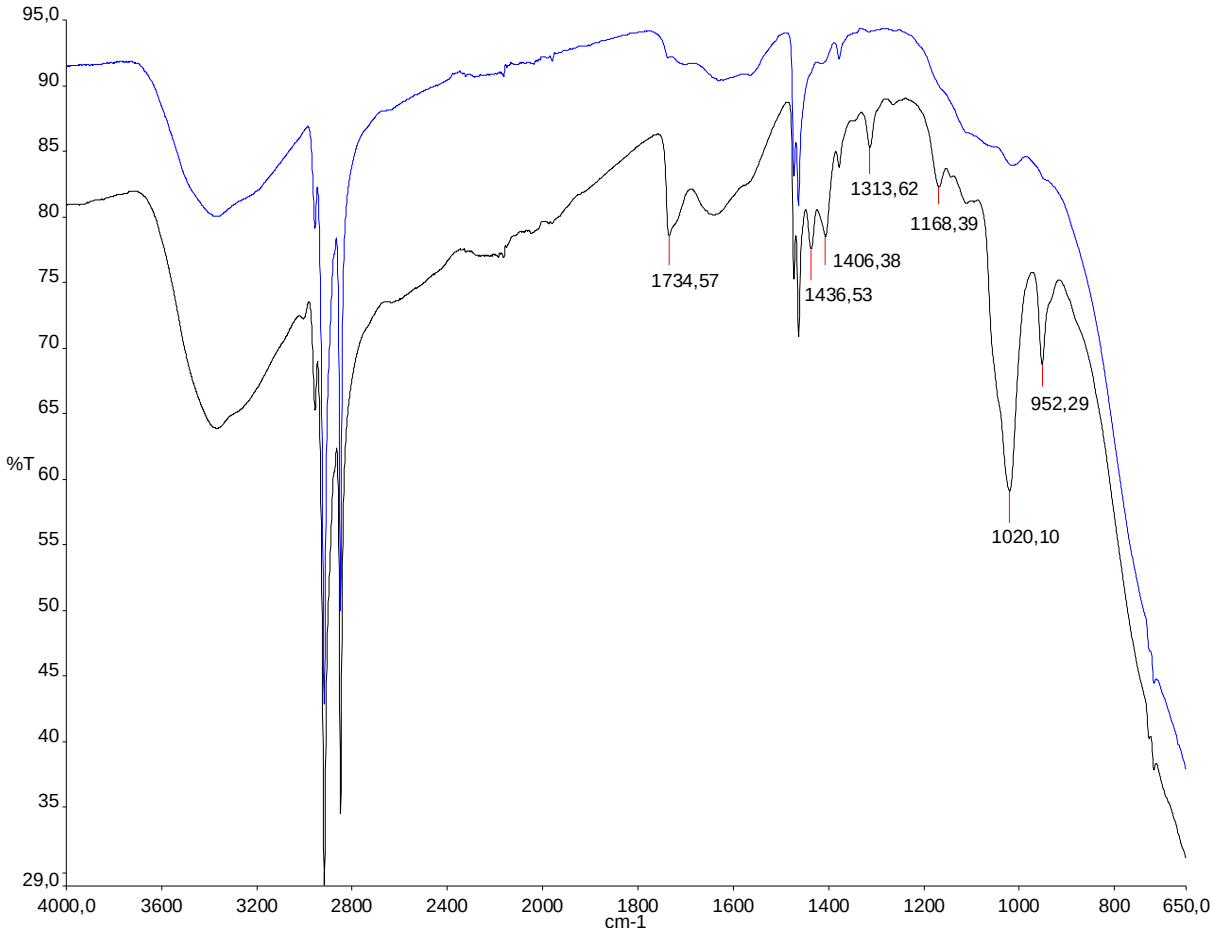


Figure 73 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations F-N2 fraîches selon le premier (noir) et second protocole (bleu)

Par ailleurs, on ne fait pas la distinction entre des particules extraites de formulations fraîches ou vieillies ainsi qu'en fonction des traitements de surface : les spectres infrarouge sont identiques comme le montre la Figure 74.

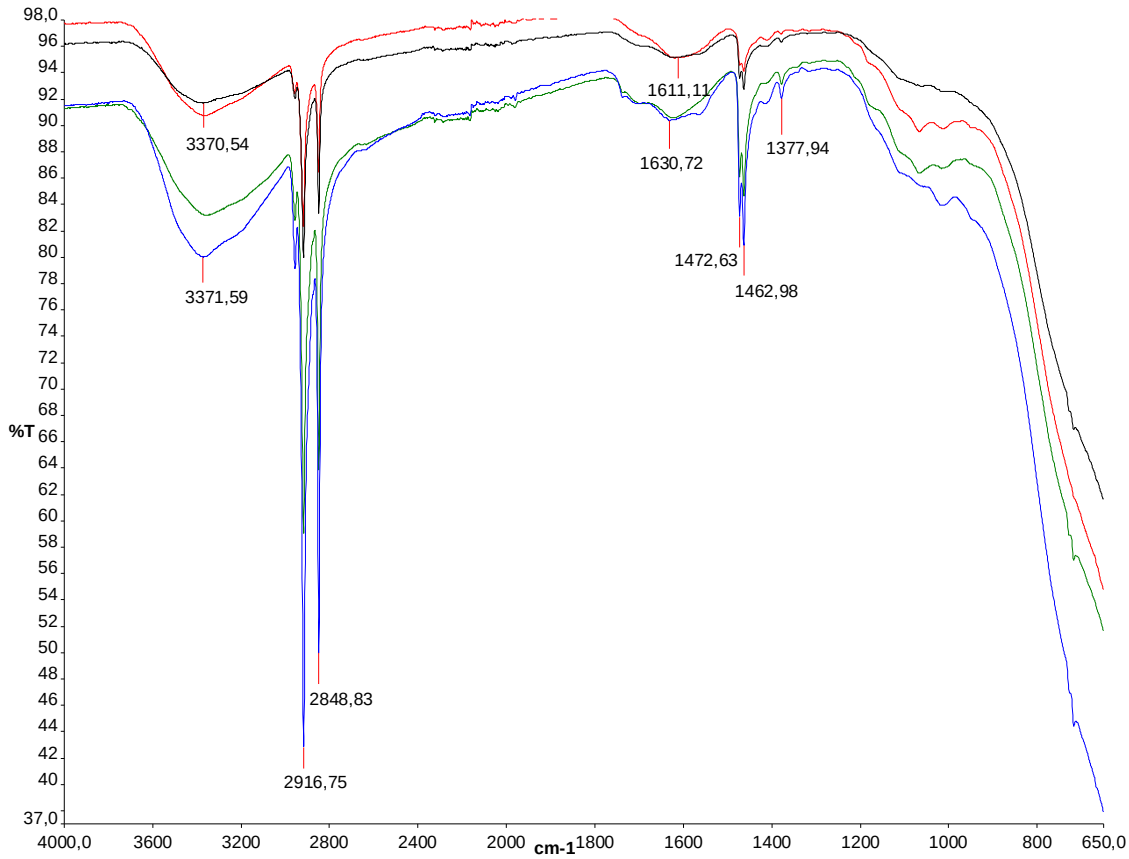


Figure 74 - Spectres Infrarouge en transmittance pour les nanoparticules extraites de formulations fraîches (coating 1 en noir, coating 2 en rouge) et vieillies (coating 1 en bleu, coating 2 en vert) selon le second protocole

Ces spectres sont par ailleurs très similaires à ceux des nanoparticules brutes (Figure 68). Cependant, il n'est pas impossible que certaines molécules soient encore présentes à la surface de la particule puisque la technique n'est pas assez sensible pour détecter tous les constituants de la surface de la particule, comme il a été précisé précédemment.

b) Potentiel Zêta

On a ensuite mesuré le potentiel zêta des particules extraites selon le deuxième protocole d'extraction, dont les valeurs sont représentées sur la Figure 75. On remarque que les valeurs du potentiel zêta de ces particules sont toujours plus élevées que ceux des nanoparticules brutes correspondantes. Cependant, on n'observe plus d'écarts très significatifs pour les nanoparticules extraites d'une formulation vieillie comme c'était le cas pour les nanoparticules extraites selon le premier protocole sans DMSO. Le deuxième protocole a permis d'obtenir des particules avec un état de surface comparable. On peut donc supposer qu'après le premier protocole d'extraction, les résidus de formulation présents à la surface de la particule modifiaient fortement les valeurs du potentiel zêta. Le deuxième protocole a donc permis de retirer une majeure partie de ces résidus, libérant ainsi la surface de la particule. Les valeurs du potentiel zêta des particules extraites restent néanmoins significativement différentes de celles des nanoparticules brutes, ce qui nous fait supposer une fois encore qu'il peut soit rester

des résidus très adsorbés à la surface de la particule, soit que le traitement de surface ait lui-même été altéré.

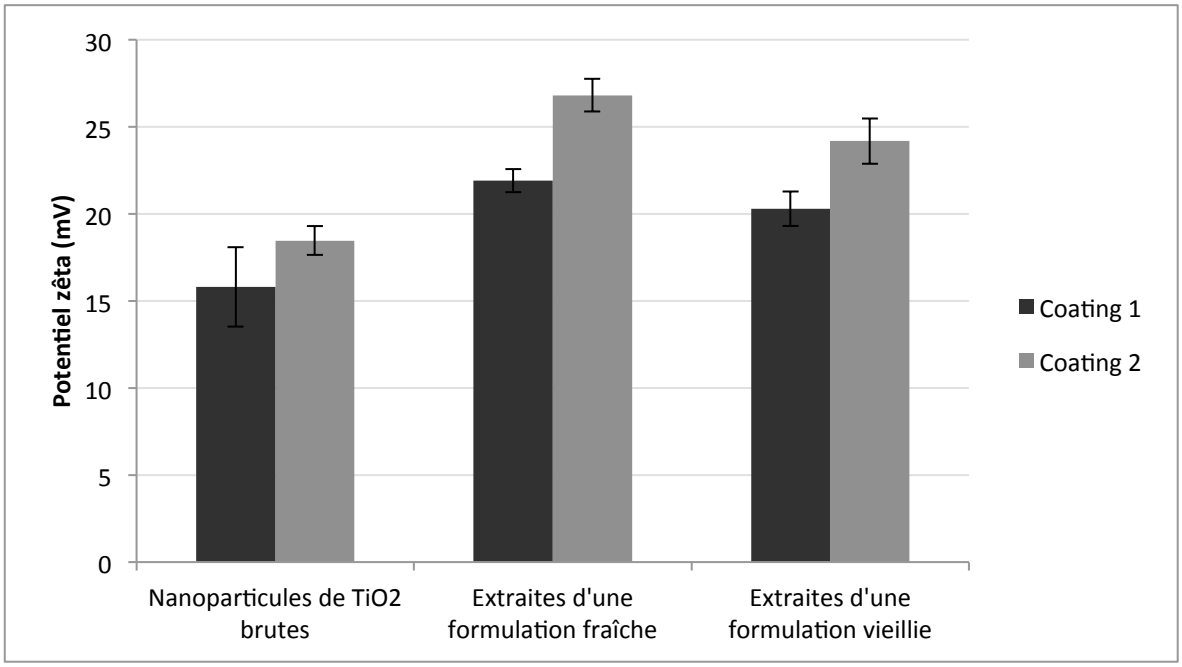


Figure 75 - Potentiel zêta des nanoparticules brutes et extraites selon le 2ème protocole d'extraction des formulations fraîche et vieillie (40 jours), pour les deux traitements de surface utilisés

c) Analyses XPS

Nanoparticules brutes NP1 et NP2

Afin de caractériser l'extrême surface des nanoparticules de manière plus précise, nous avons procédé à des analyses XPS. Les résultats de ces analyses fournissent le spectre représenté sur la Figure 76 pour les nanoparticules brutes de coating 1.

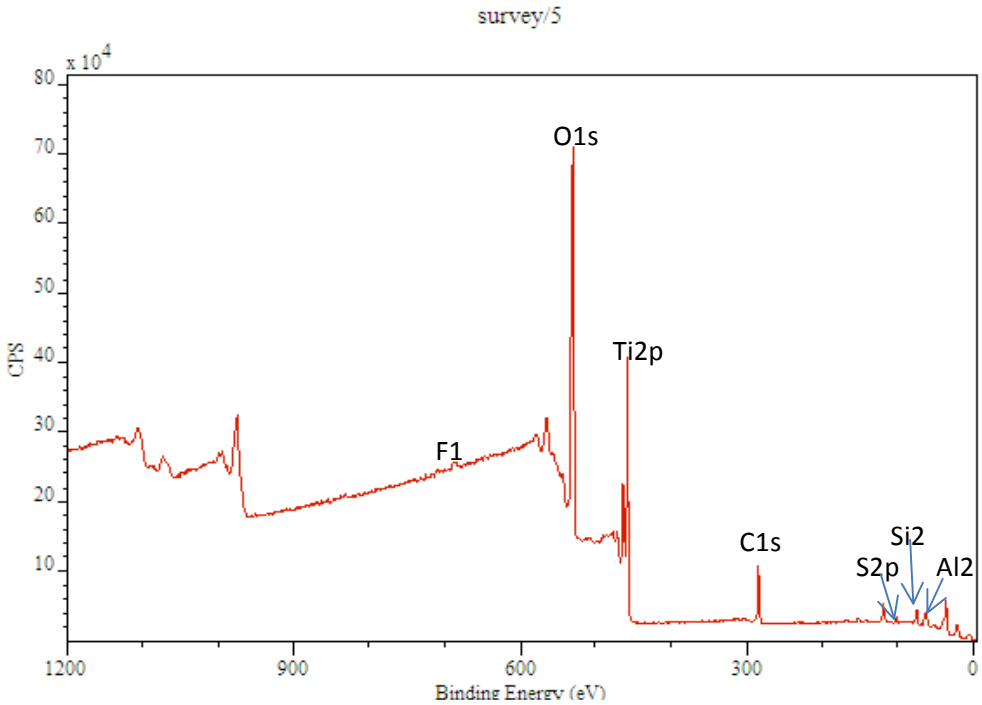


Figure 76 - Spectre XPS des nanoparticules de coating 1

On observe bien pour le titane une seule contribution $Ti2p_{3/2}$ à 459,0 eV, correspondant à du dioxyde de titane, et pour l'aluminium une seule contribution à 74,5 eV correspondant à l'alumine du traitement de surface. La valeur de l'énergie de liaison (102,3 eV) de Si2p est compatible avec le silicium du triethoxycaprylylsilane. Celui-ci ne présente que des liaisons C-C, C-H (285 eV) et C-O (autour de 286,3 eV). Cependant, une contribution correspondant à des liaisons –COO à 289,5eV est observée : elles proviennent probablement de la contamination carbonée des échantillons, malheureusement inévitable.

Pour les nanoparticules brutes de coating 2, on observe les mêmes contributions que pour l'échantillon NP1 avec une diminution du ratio Al/Ti pouvant s'expliquer par l'ajout du triisostearate présent dans le traitement de surface. De plus le taux de carbone est de l'ordre de 7% plus important ce qui est probablement lié à la présence de ce même triisostearate. La composante à 289,3 eV sur le spectre C1s correspondant aux liaisons -COO est mieux définie que pour NP1, indiquant donc une quantité plus importante de ce groupement, ce qui va également dans le sens de la présence du triisostearate.

Nanoparticules extraites de la formulation fraîche selon le second protocole

Dans le cas de chacun des traitements de surface, les échantillons extraits des formulations fraîches selon le protocole avec l'étape de lavage au DMSO, présentent un taux de carbone deux fois plus important que l'échantillon des nanoparticules brutes NP1, ce qui traduit la présence plus importante de composés organiques en surface et donc probablement de composés issus de la formulation dont sont extraites les particules. On peut le remarquer sur la

Figure 77 où le pic correspondant au C1s de la Figure 76 à 285 eV y est plus important. Il n'y a pas d'autres différences avec le composé NP1.

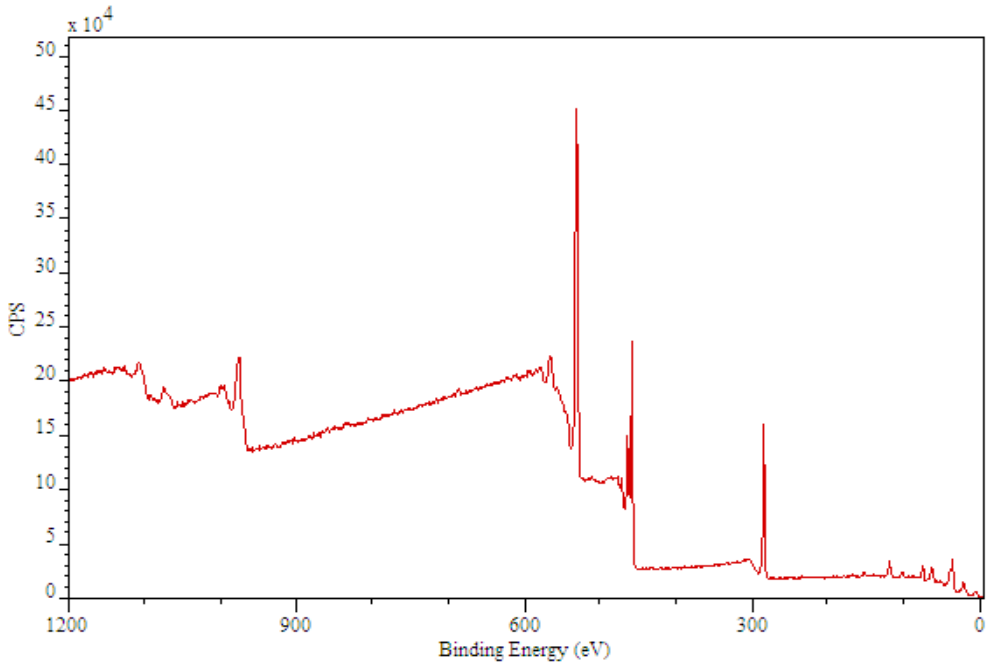


Figure 77 - Spectre XPS des nanoparticules de coating 1 extraites d'une formulation fraîche selon le 2nd protocole

Nanoparticules extraites de la formulation vieillie selon le second protocole

Les résultats pour les nanoparticules extraites d'une formulation vieillie sont très similaires à ceux des nanoparticules extraites d'une formulation fraîche. La seule différence notable se situe au niveau du taux de carbone qui est légèrement plus faible que les nanoparticules extraites des formulations fraîches mais néanmoins plus élevé que pour les nanoparticules brutes.

Au vu de ces différentes caractérisations, il apparaît que les nanoparticules extraites d'une formulation, fraîche ou vieillie, présentent une surface modifiée par rapport aux nanoparticules brutes de départ. Ceci étant notamment dû à l'adsorption de composés organiques de la formulation à la surface de la nanoparticule, et ce malgré un procédé de lavage d'extraction conséquent au DMSO. Nous ne sommes pas en mesure d'observer une possible altération du traitement de surface de la nanoparticule à l'issue de son extraction de la formulation, cependant il apparaît que la formulation cosmétique contient très probablement des nanoparticules modifiées en surface à la suite de l'adsorption d'une quantité d'ingrédients de l'émulsion.

Il est alors pertinent d'évaluer la potentielle toxicité de l'émulsion cosmétique en présence de ces particules modifiées, et ce à différents étapes de vieillissement de la formulation.

Chapitre 2 *Evaluation toxique des formulations cosmétiques et des nanoparticules*

Dans une problématique d'évaluation des risques pour la santé et l'environnement, nous avons procédé à l'analyse toxique des différents systèmes caractérisés précédemment. Nous avons donc étudié tout d'abord l'effet cytotoxique des formulations elles-mêmes, fraîches et vieillies pendant 40 jours à 50°C. L'idée est de tester les formulations sans nanoparticules (F-0) et les formulations avec nanoparticules (F-N) afin de pouvoir distinguer les effets cytotoxiques liés à la formulation seule et ceux aux nanoparticules. Les mêmes tests cytotoxiques ont ensuite été réalisés sur les nanoparticules brutes, et extraites de formulations fraîches ou vieillies afin de repérer des modulations d'activité toxique en fonction des différences de surface des nanoparticules.

2.1 Qualité microbiologique des crèmes cosmétiques

Les analyses microbiologiques réalisées par le laboratoire ACM Pharma montrent qu'aucune des formulations cosmétiques auxquelles nous avons exposé les cellules n'ont été contaminées par des bactéries ou levures. Afin de déterminer la présence de bactéries aérobies mésophiles, les crèmes cosmétiques ont été analysées selon la norme NF 21149 qui donne des lignes directrices générales pour le dénombrement et la détection de ces bactéries dans les produits cosmétiques. Cela consiste à compter les colonies en milieu gélosé après incubation. La présence de levures et moisissures a été mesurée selon la norme ISO 16212. Les résultats montrent que les crèmes sont conformes aux critères définis avec un nombre de bactéries par gramme inférieur à 10 UFC/g.

2.2 Toxicité des formulations cosmétiques

2.2.1 Formulation sans nanoparticules F-0

a) Inhibition de croissance et mortalité cellulaire

Essais sur lignées humaines MCF-7

La cytotoxicité des formulations est évaluée par dénombrement cellulaire sur la lignée adénocarcinomateuse mammaire humaine MCF-7, classiquement utilisée dans les tests de survie/prolifération (Soundararajan & Sreenivasan 2012; Monga *et al.* 2013).

Les dénombrements directs sont effectués après ensemencement de boîtes de culture 60 x 15 mm avec N_0 = 10 000 cellules. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont exposées au traitement puis décollées avec de la trypsine/EDTA et comptées à la chambre de Malassez toutes des 12 heures sur 140 heures, selon la méthode proposée antérieurement (Pasquier *et al.* 2011). Comme l'indique la Figure 78, en condition contrôle, dans le milieu RPMI additionné de SVF 5 %, les MCF-7 ont une croissance exponentielle avec un taux de croissance σ qui

peut être obtenu par régression linéaire de la relation exprimant le nombre de cellules comptées en fonction du temps, $Ln[N(t)] = Ln(N_0) + \sigma t$. La pente obtenue est $\sigma = 0{,}023\ h^{-1}$. Le temps de doublement de la population $t_{1/2}$ correspondant, calculé par $t_{1/2} = Ln\ 2/\ \sigma$, est donc estimé à 30 heures.

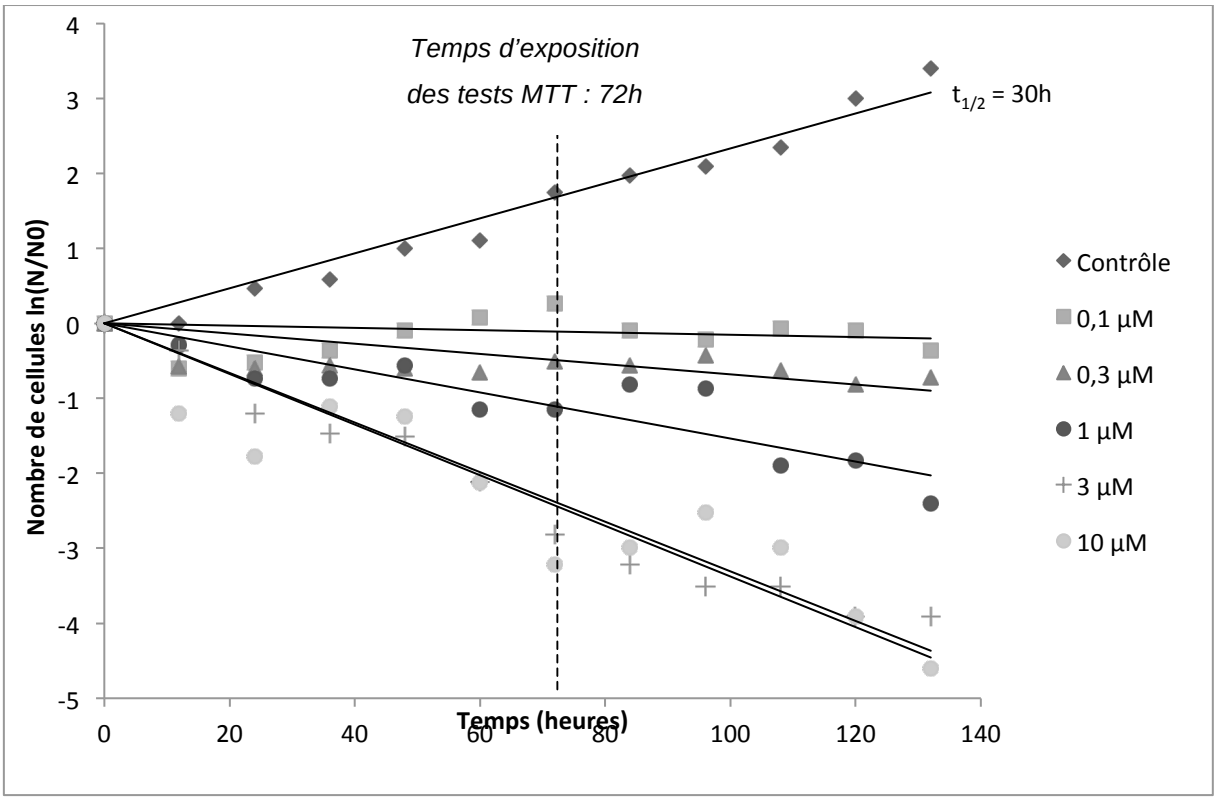


Figure 78 - Prolifération des cellules MCF-7 en présence de doxorubicine à différentes concentrations

Le cytotoxique de référence utilisé est la doxorubicine, encore appelée hydroxydaunorubicine, principe actif de la préparation commerciale Adriamycine. La doxorubicine est un antibiotique de la famille des anthracyclines, issu de la fermentation de bactéries du genre *Streptomyces.* Elle est couramment utilisée comme antinéoplasique dans les traitements antitumoraux de première intention pour de nombreux cancers, en association avec d'autres agents cytotoxiques (adjuvantonline.com). Son mécanisme d'action classe cette molécule parmi des intercalants de l'ADN. Elle est également reconnue comme inhibiteur de la topoisomérase II (Pasquier 2011).

En présence de doxorubicine, le taux de croissance σ des MCF-7 est altéré. Le temps de doublement devient beaucoup plus important lorsque les cellules sont traitées avec 0,1 µM de doxorubicine, ce qui peut être interprété par un ralentissement important du cycle cellulaire associé à une mortalité modérée, donnant en bilan une population cellulaire en survie sans croissance nette. Pour des concentrations supérieures en doxorubicine, σ devient négatif et décroit de manière dose-dépendante avec l'exposition à la doxorubicine. La mortalité cellulaire est donc d'autant plus rapide que la concentration en cytotoxique augmente (Figure 78).

Pour gagner en reproductibilité et en rapidité, dans cette étude l'effet des nanoparticules a été quantifié par dénombrement indirect des MCF-7, à l'aide d'un test de survie/prolifération au MTT. Ce test colorimétrique est fondé sur l'activité métabolique mitochondriale, qui est supposée ne varier qu'en fonction du nombre de cellules vivantes. Nous avons démontré que, dans nos conditions d'ensemencement et de culture, la DO MTT est une fonction quasi-linéaire du nombre de cellules MCF-7 (Pasquier et al. 2013). Des tests alternatifs au dénombrement indirect par MTT ont été essayés, sans succès (cf 3.1.3 p. 233).

Dans ce cas, des plaques 96 puits sont ensemencées avec N_0 = 5 000 cellules. Après 24 heures d'incubation, les cellules sont exposées au traitement. La DO MTT est déterminée après 3 jours de culture en présence des agents à tester. Le taux de croissance σ est obtenu par $\sigma = \frac{Ln\,(DO\ MTT\ 3j) - Ln(DO\ MTT\ 0j)}{3}$. En condition contrôle, dans le milieu RPMI additionné de SVF 5 %, σ = 0,57 ± 0,025 $jour^{-1}$ (n=6). Le temps de doublement de la population $t_{1/2}$ correspondant, calculé par $t_{1/2} = \frac{Ln\,2}{\sigma}$, est estimé à 1,21 jours soient 29 heures, ce qui correspond exactement à la valeur spécifiée par l'*American Type Culture Collection* (http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#specifications) et est très proche du résultat obtenu par dénombrement direct.

La DO MTT des MCF-7 à 3 jours diminue de manière dose-dépendante avec la concentration du cytotoxique de référence, la doxorubicine. Pour pouvoir comparer avec les expositions aux formulations cosmétiques, les quantités de doxorubicine ont été exprimées en concentrations massiques (mg/L) sur la Figure 79.

Le point d'inflexion de la courbe dose-réponse correspondante, en noir sur la Figure 79, est l'EC_{50} ou puissance de la molécule. Elle représente la concentration pour laquelle on observe une inhibition de croissance correspondant à 50 % de l'inhibition maximale E_{max} – un paramètre pharmacodynamique appelé aussi efficacité. Le meilleur ajustement de la courbe dose-réponse sur la distribution des points expérimentaux donne pour la doxorubicine une EC_{50} = 1,64 ± 0,67 mg/L et une E_{max} = -1,09 ± 0,34 j^{-1} obtenu pour une concentration comprise entre 5 et 10 mg/L (n=6), pour la doxorubicine dans ces conditions.

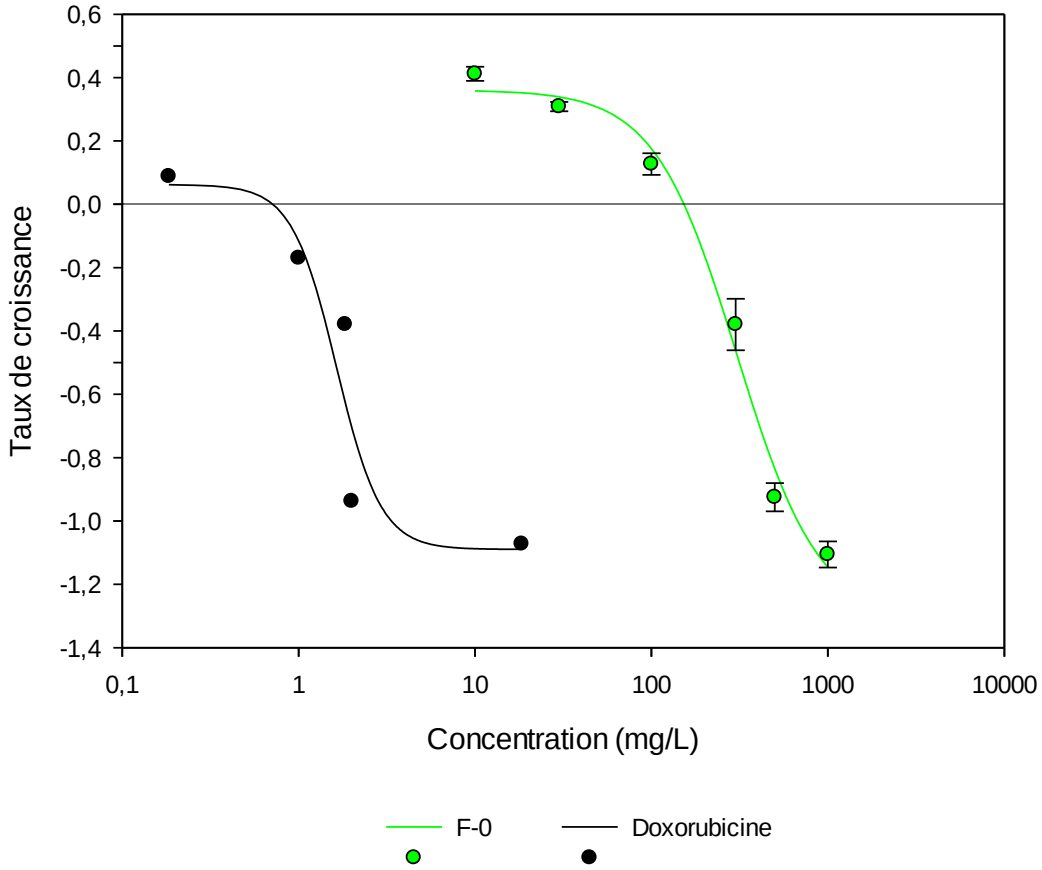


Figure 79 - Courbe dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration de formulation fraîche de F-0, n=6

Ce mode opératoire a été utilisé pour évaluer l'effet de la formulation cosmétique fraîche, F-0, non vieillie et sans nanoparticules (Figure 79, en vert). Comme avec le cytotoxique doxorubicine, on peut observer deux types d'effets dose-dépendants :

- une inhibition de croissance où le taux de croissance diminue jusqu'à atteindre la valeur de 0 ;
- une mortalité cellulaire où le taux de croissance devient négatif : le nombre de MCF-7 après trois jours de traitement est très inférieur au nombre initial de cellules.

Toutefois, ces effets sont obtenus à des concentrations élevées, de l'ordre de la centaine de milligramme par litre. Ainsi pour F-0, la première concentration à partir de laquelle le taux de croissance est significativement différent du contrôle avec $p<0,001$, la CMEO *(Concentration minimale de l'effet observé)* ou LOEC *(Lowest Observed Effect Concentration* en anglais) est 30 mg/L. La première concentration associée à un taux de croissance négatif est 300 mg/L. La valeur de l'EC_{50} est de 312,3 ± 21,8 mg/L. La valeur la plus faible du taux de croissance E_{max} est de -1,11 ± 0,04 j^{-1}, une valeur très proche de celle obtenue avec la doxorubicine.

En comparaison avec le toxique de référence, on peut constater que la formulation F-0 présente une cytotoxicité relativement faible. En effet, pour F-0 la CMEO est supérieure à la concentration correspondant à l'E_{max} de la doxorubicine, et la valeur de l'EC_{50} est de l'ordre de 300 mg/L, ce qui est très élevé par rapport à celle obtenue avec la doxorubicine, de l'ordre de 1 mg/L. En revanche, pour les deux traitements, les effets maximaux sur σ sont équivalents ce qui indique que le bioessai utilisé est adapté.

Lignées de poisson SAF-1

Sur les fibroplastes de poisson SAF-1, la gamme de concentration testée pour la formulation F-0 a été adaptée en fonction des résultats avec les cellules MCF-7. Elle a été échelonnée entre 50 et 2000 mg/L (Figure 86 p.202). La viabilité cellulaire n'est pas affectée par l'exposition à la formulation F-0. Il n'est donc pas possible de déterminer une valeur d'EC_{50}. Ce résultat est donc sensiblement différent des effets obtenus sur les cellules MCF-7. On peut expliquer cette différence de sensibilité des lignées à F-0, par le fait que les cellules MCF-7 ont un temps de doublement de 29h et sont donc plus prolifératives que les SAF-1, au temps de doublement de 48h.

b) Génotoxicité

Le « SOS Chromotest », selon le mode opératoire précédemment décrit, ne révèle pas de génotoxicité, ni de cytotoxicité de la formulation F-0 lorsqu'il est testé dans une gamme de concentration allant de 10 à 1000 mg/L que ce soit sans activation métabolique ou avec S9, comme l'indiquent les Figure 80 et Figure 81.

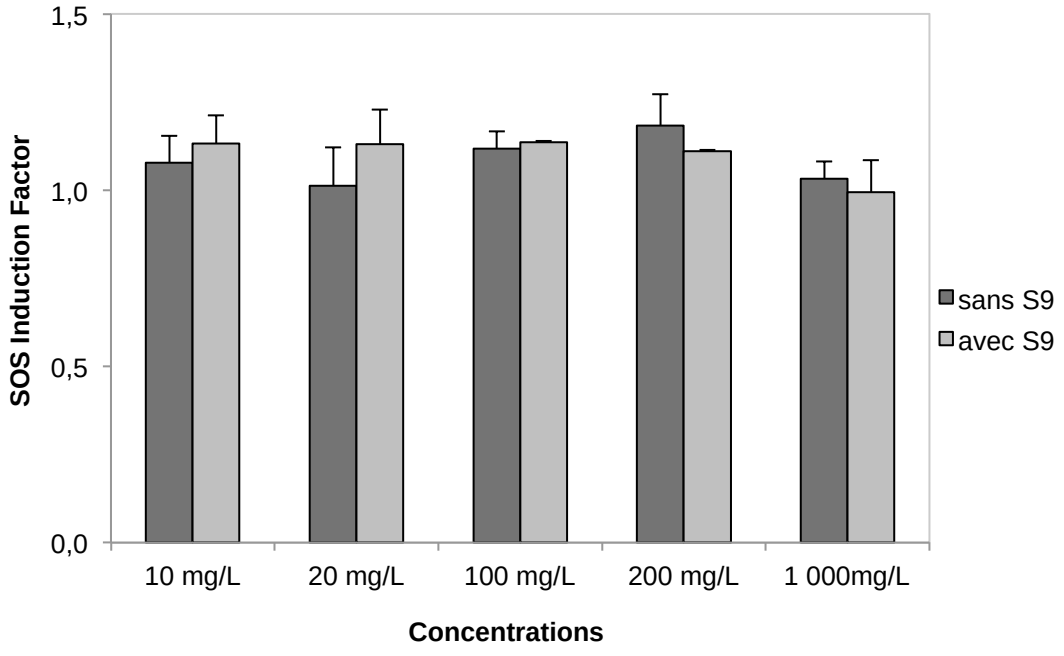


Figure 80 - SOS Induction Factors obtenus pour la formulation fraîche F-0 en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3

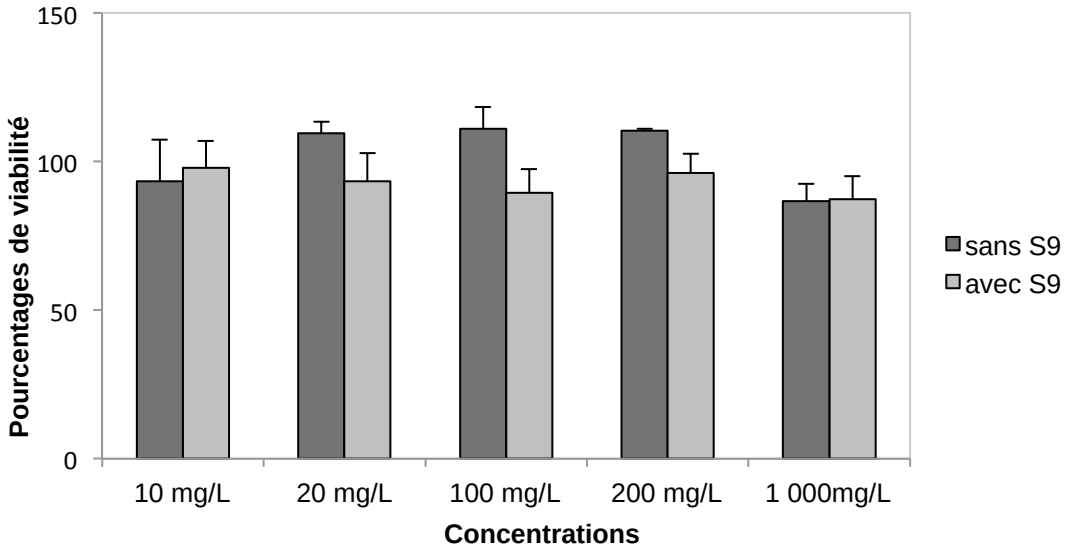


Figure 81 – Pourcentage de viabilité obtenus pour la formulation fraîche F-0 en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3

L'effet toxique observé sur les cellules MCF-7 n'est donc pas lié à un effet génotoxique révélé par le test SOS, essentiellement sensible aux dommages occasionnés à l'ADN bactérien et à l'origine du blocage de la fourche de réplication.

c) Embryotoxicité

Le test d'embryotoxicité utilisé est fondé sur l'analyse des anomalies du développement de l'huitre creuse *Crassostrea gigas*. Dans leurs stades embryo-larvaires précoces, les mollusques bivalves sont très sensibles aux composés toxiques, en particuliers aux métaux traces (Beiras & Albentosa 2004), et en général moins tolérants que les adultes de même espèce (Jha *et al.* 2000; Jha, Hagger & Hill 2000). En conséquence, la détection de larves d'huître présentant des anomalies de développement après exposition à des sédiments ou de l'eau de mer contaminée fait partie des tests couramment utilisés pour évaluer les effets biologiques des substances toxiques (Money *et al.* 2011).

Dans ce travail, des effets embryotoxiques dose-dépendants ont été mis en évidence après exposition pendant 24 heures de larves d'huître à de l'eau de mer additionnée de formulation F-0. La valeur de l'EC_{50} a été calculée à 2190 mg/L avec une CMEO égal à 200 mg/L alors que les valeurs correspondantes pour le composé embryotoxique de référence, le $CuSO_4$, sont de 44,9 µg/L pour l'EC_{50} et de 25 µg/L pour la CMEO. La valeur d'EC_{50} est bien plus élevée que celle obtenue lors des tests MTT sur la lignée MCF-7, mais la CMEO est comparable (100mg/L). On peut noter, qu'à toutes les concentrations testées en embryotoxicité, le nombre d'anomalies du développement est supérieur au contrôle (Figure 78).

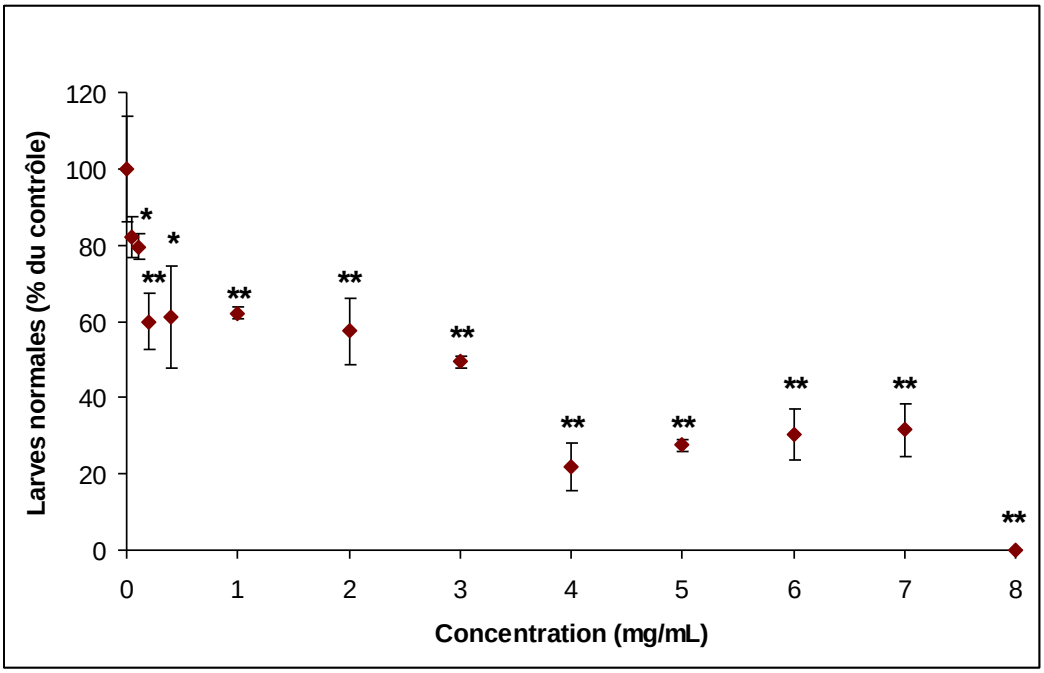


Figure 82 -Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de la formulation F-0 testée. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3

2.2.2 Formulations incorporant 5% nanoparticules : F-N1 et F-N2

a) Lignées humaines MCF-7

L'effet des formulations incorporant des nanoparticules a été testé sur la survie/prolifération des MCF-7. On rappelle que la gamme de concentration testée pour les nanoparticules poudres s'étend de 0,5 à 50 mg/L, ce qui correspond à une gamme de concentrations pour la formulation allant de 10 à 1000 mg/L avec une charge en nanoparticules fixée à 5 % (Tableau 6 p.122). On rappelle que F-N1 et F-N2 diffèrent par le traitement de surface des nanoparticules incorporées. Le coating 1 est constitué de triethoxycaprylylsilane, et le coating 2 d'isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane, ce qui est plus largement décrit dans le paragraphe 1.1.1 p.97 du chapitre Matériel et Méthodes et résumé dans le Tableau 3 p.100. La Figure 83 montre que les courbes dose-réponse des formulations F-0, F-N1 et F-N2 sont très similaires mais sont légèrement décalées entre elles.

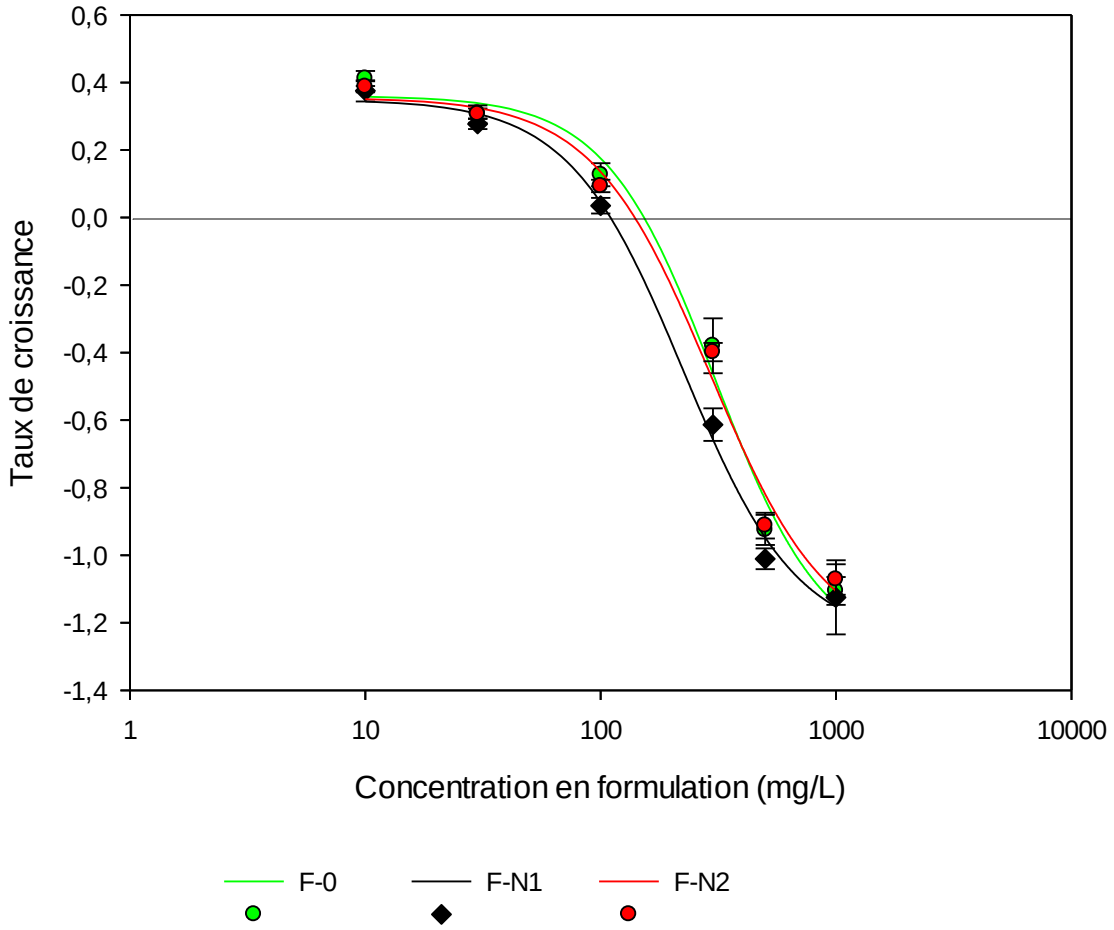


Figure 83 - Courbe dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F-0, F-N1, F-N2, n=6

Comme on l'a déjà vu (Figure 79 p.196), la formulation sans nanoparticules est très peu cytotoxique à la concentration de 10 mg /L, puisque le taux de croissance des cellules exposées à la formulation n'est pas significativement différent du taux de croissance contrôle, si on retient à $p<0,001$ comme critère. Cependant, les formulations avec les nanoparticules de coating 1 induisent déjà à cette concentration, un taux de croissance significativement inférieur au contrôle comme le montre la Figure 84.

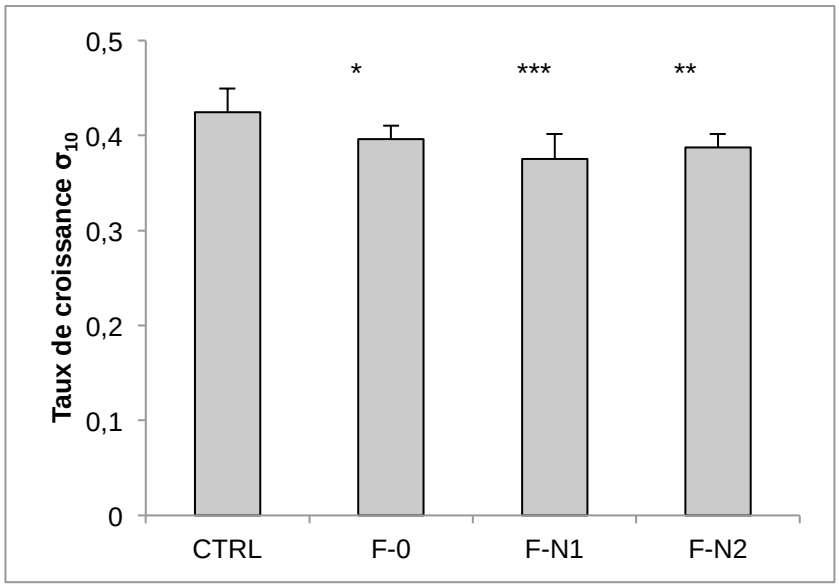


Figure 84 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 à 10mg/L, (: différence significative par rapport au contrôle, p<0,1 et ** p<0,01 et *** p<0,001), n=6*

La formulation contenant des nanoparticules de coating 1 semble donc être légèrement plus cytotoxique que F-0 et F-N2 dès la plus faible concentration de formulation exposée aux cellules.

Les EC_{50} pour chacune des formulations sont présentées sur la Figure 85. Il apparaît que la valeur d'EC_{50} de la formulation F-N1 est plus faible que celle de F-0 tandis que l'EC_{50} de F-N2 est similaire à celle de F-0. On peut donc là encore mettre en avant le caractère plus cytotoxique de F-N1 par rapport à F-0 et F-N2. Les données de toxicité disponibles sur les traitements de surface utilisés sont très pauvres. Parmi les effets immédiats, différés, et les effets chroniques à court ou long terme du triethoxycaprylylsilane, ne sont disponibles que la toxicité aigüe orale, mesurée par la valeur de LD_{50} de 10,6 mg/kg chez le rat, et celle de pénétration cutanée de 5.91 ml/kg chez le lapin. Une étude a montré que le traitement de surface à base de triethoxycaprylylsilane ne causait pas de toxicité pulmonaire significative (Warheit, Reed & Webb 2003). En ce qui concerne le second traitement de surface, l'isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane crosspolymer, aucune donnée de toxicité n'est connue à ce jour. Les données de la littérature ne sont donc pas assez fournies à ce jour pour pouvoir juger de la toxicité liée au traitement de surface seul. Dans la suite, seule F-N1 est testée.

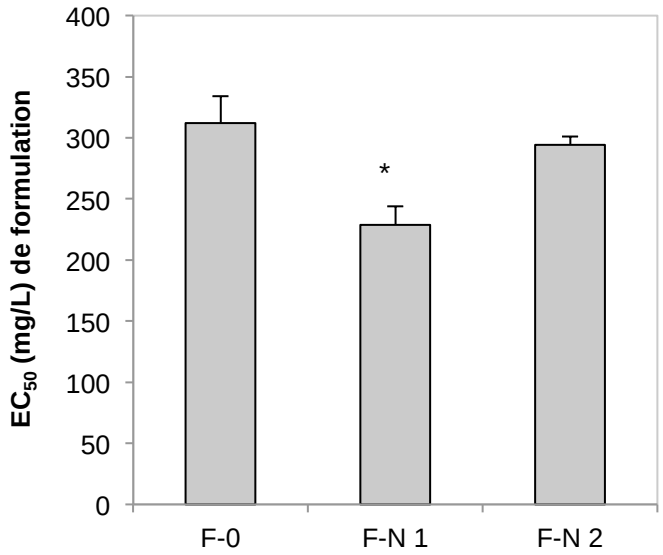


Figure 85 - Valeurs des EC_{50} pour F-0, F-N1 et F-N2 fraîches, (: différence significative par rapport au contrôle, p<0,1), n=6*

b) Lignées de poisson SAF-1

Comme dans le cas des formulations sans nanoparticules, la viabilité cellulaire sur cellules de poisson ne semble pas être affectée, comme le suggère la Figure 86.

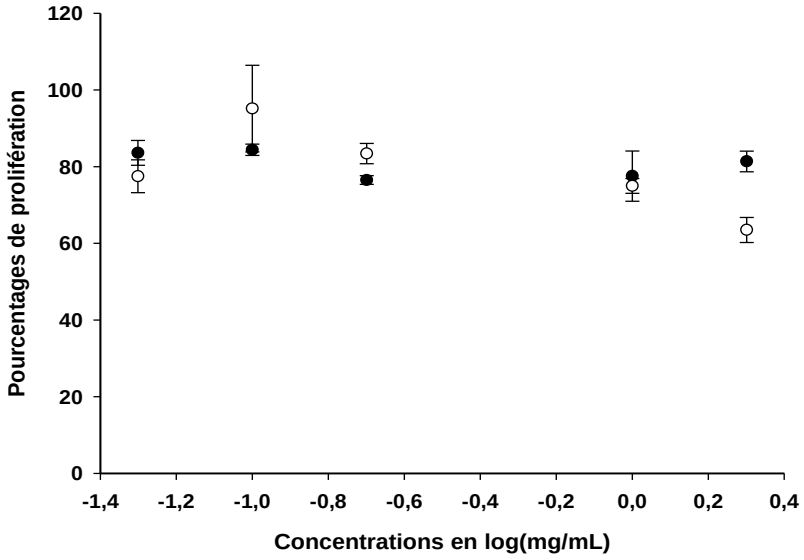


Figure 86 – Prolifération cellulaire des formulations fraîches F-0 (blanc) et F-N1 (noir), n=3

c) Génotoxicité

Par le « SOS Chromotest » des formulations avec nanoparticules, on observe les mêmes résultats que pour F-0 : aucune génotoxicité n'est observée.

d) Embryotoxicité

Les tests d'embryotoxicité montrent un effet sur le développement larvaire avec une valeur d'EC_{50} de 2087 mg/L, similaire à la valeur obtenue pour F-0 de 2190 mg/L, ce qui correspond à des valeurs de concentration très élevées. La valeur de CMEO est égale à 1000 mg/L, ce qui est cinq fois plus élevé que la valeur de CMEO de F-0 de 200 mg/L. La concentration la plus faible montrant un effet toxique significatif est donc plus importante pour la formulation avec nanoparticules que pour la formulation sans nanoparticules. C'est un effet contradictoire avec ce que l'on pouvait attendre par rapport aux résultats de survie/prolifération sur les MCF-7 où la valeur d'EC_{50} de la formulation F-N1 était inférieure à celle de F-0, montrant ainsi une toxicité plus marquée pour F-N1.

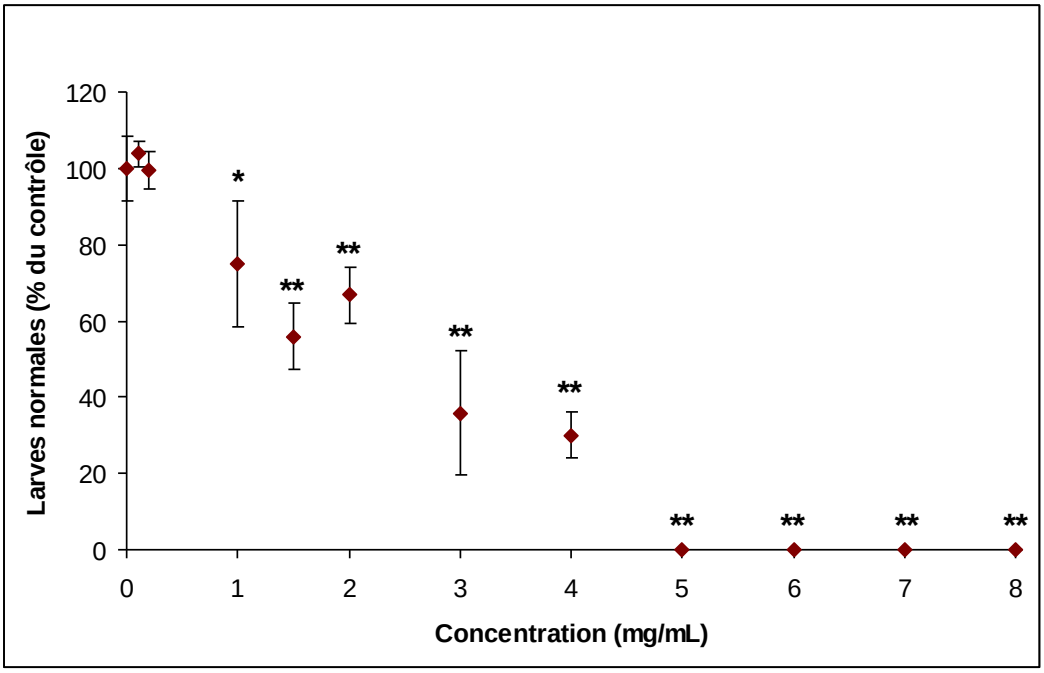


Figure 87 - Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de la formulation FN1 fraîche testée. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3

2.2.3 Formulations F' incorporant une proportion variable de nanoparticules

Les formulations F' contiennent une proportion variée en nanoparticules (voir Tableau 4 p.100 et Tableau 6 p.122). En remplaçant la paraffine utilisée dans les formulations F par l'alcool gras, le cetearyl alcohol, nous avons réussi à incorporer jusqu'à 10% en nanoparticules de coating 2 (cf p.138). Ces pourcentages, comme on l'a vu, sont comparables à ceux de formulations industrielles (Figure 37 p.139). Les formulations F' ont été évaluées en cytotoxicité par le test MTT sur la lignée MCF-7. Les résultats sont représentés sur la Figure 88.

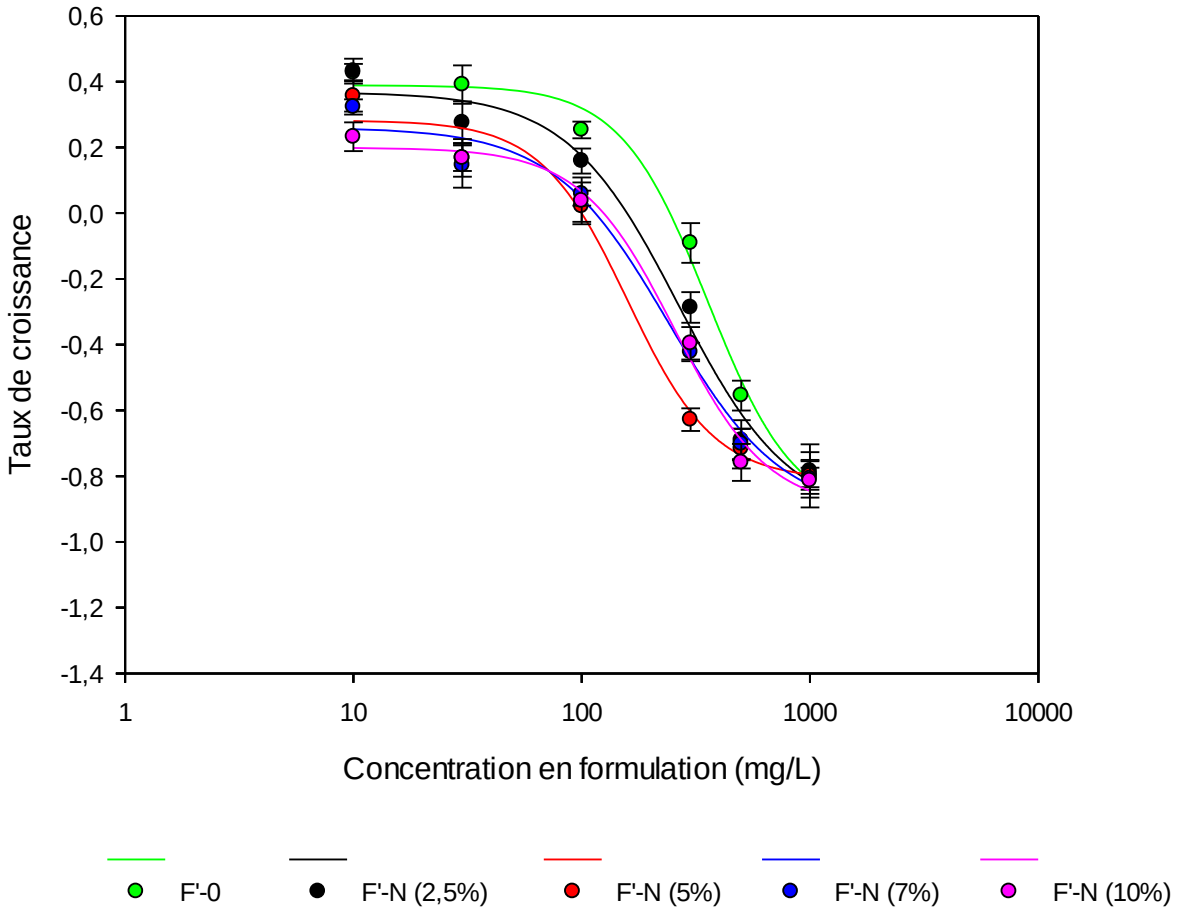


Figure 88 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F'-0, F'-N (2,5%), F'-N (5%), F'-N (7%), F'-N (10%), n=6

Lorsqu'on compare à la concentration de 10mg/L les différentes valeurs des taux de croissance pour les formulations à différentes teneur en nanoparticules, on obtient la Figure 89. Le taux de croissance cellulaire σ_{10} est significativement différent de celui de la formulation sans nanoparticules uniquement pour les formulations incorporant 7 et 10% de nanoparticules.

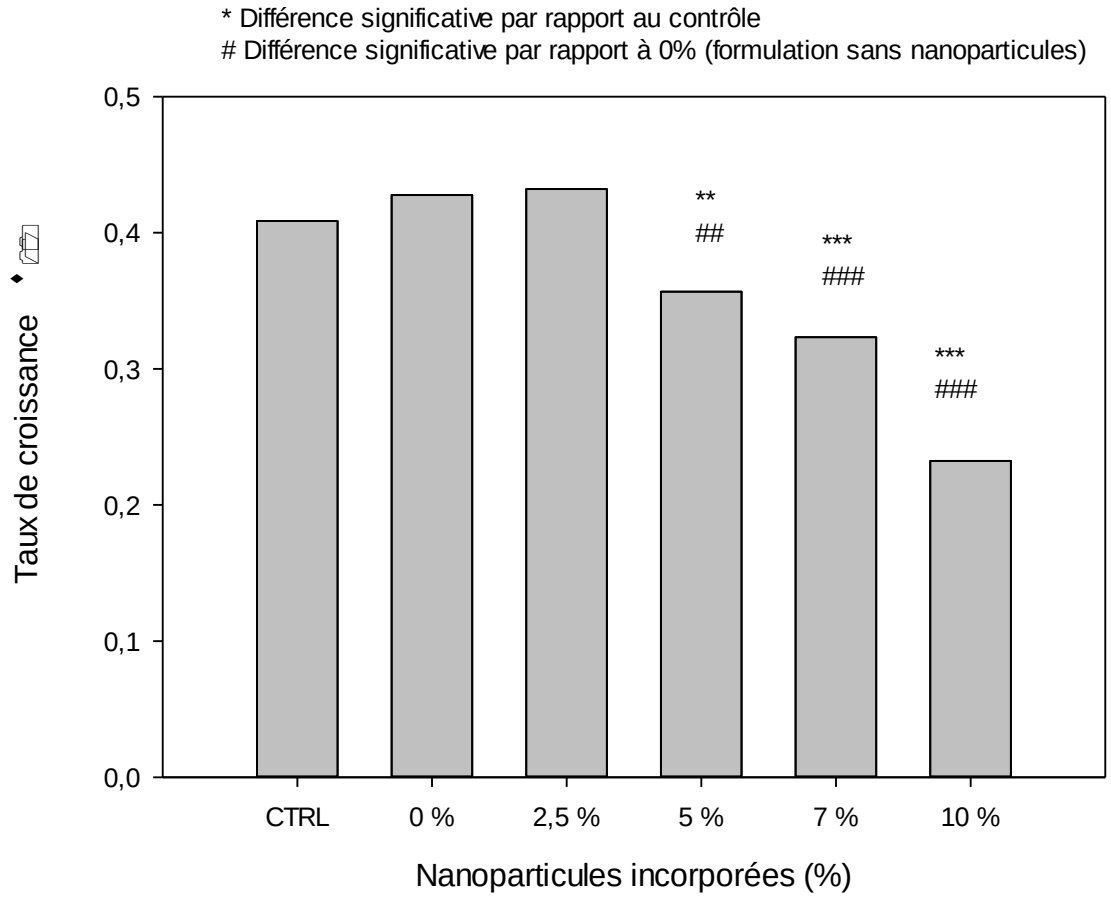


Figure 89 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F' fraîches à 10mg/L, (: différence significative par rapport au contrôle p<0,1 et ** p<0,01 et *** p<0,001, # : différence significative par rapport à la formulation F'-0), n=6*

Le taux de croissance est d'autant plus faible que le pourcentage en nanoparticules est important.

Les valeurs des EC_{50} pour chacune de ces formulations sont résumées sur la Figure 90. On remarque tout d'abord que les formulations contenant des nanoparticules sont à l'origine de valeurs d'EC_{50} significativement plus faibles que celle de F'-0, indiquant une plus forte cytotoxicité. De plus, il apparaît que parmi elles, la formulation à 5% est la plus cytotoxique, avec une valeur d'EC_{50} à 163,2 $\pm$ 10,3 mg/L. Les formulations à 2,5 ; 7 et 10% présentent des valeurs d'EC_{50} relativement proches.

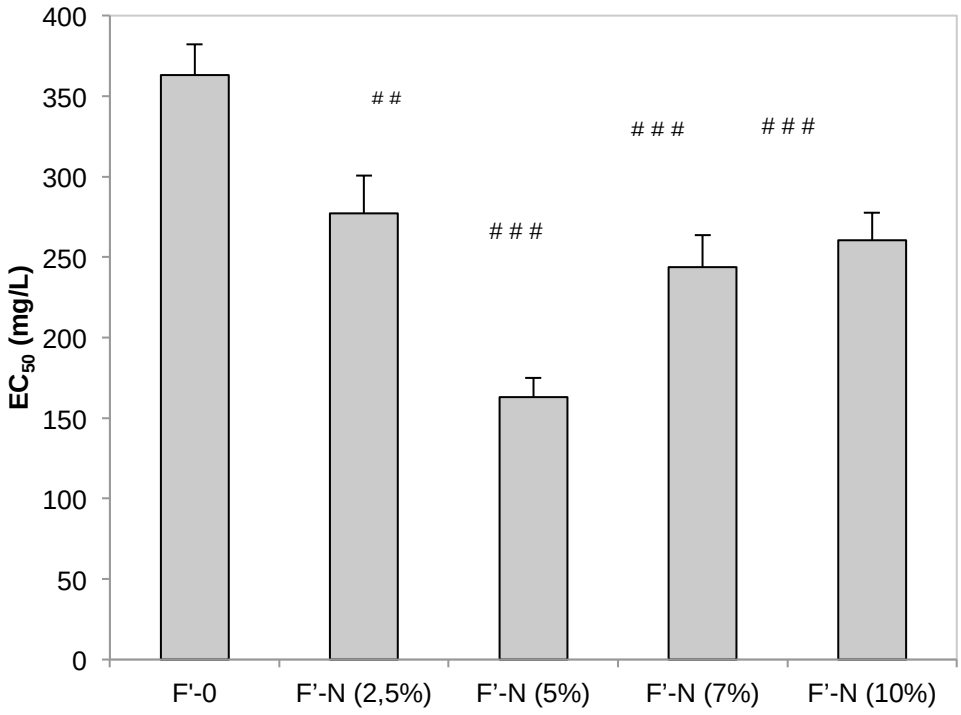


Figure 90 - Valeurs des EC_{50} pour les formulations F' fraîches, (## : différence significative par rapport à F'-0, p<0,01 et ### p<0,001), n=6

Lorsqu'on compare les valeurs d'EC_{50} obtenues dans le cas de F-0 et F'-0, celles-ci sont proches et ne sont pas significativement différentes. On rappelle que ces deux formulations diffèrent par un ingrédient : la paraffine présente dans F-0 a été remplacée par le cetearyl alcohol pour F'-0. Lorsque ces deux formulations incorporent le même pourcentage (5%) de nanoparticules de même coating, des différences importantes apparaissent (Figure 91). En effet la formulation F' à 5% en nanoparticules de coating 2 est à l'origine d'une inhibition de croissance avec un EC_{50} beaucoup plus faible que la formulation F-N2. Cela pourrait s'expliquer par des interactions entre des ingrédients au sein de la formulation, notamment entre les nanoparticules de coating 2 et le cetearyl alcohol utilisé comme agent de viscosité. Alternativement, ces différences pourraient trouver leur origine dans des comportements physico-chimiques modifiés par la présence de nanoparticules, qui conduiraient à une modification de la cytotoxicité.

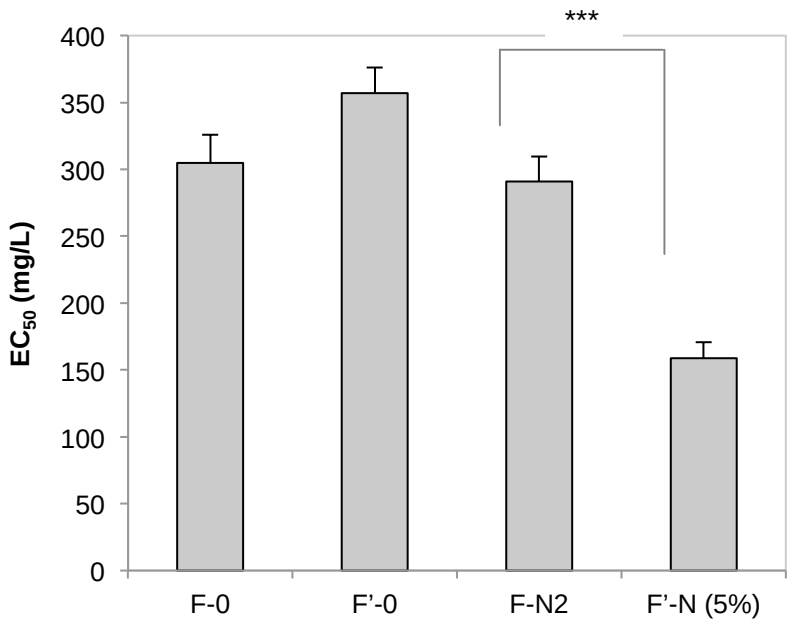


*Figure 91 - Valeurs des EC_{50} pour des formulations sans nanoparticules (F-0 et F'-0) et des formulations contenant 5% de nanoparticules de coating 2 (F-N2 et F'-N (5%)) fraîches, (*** : différence significative p<0,001) n=6*

En comparant les deux formulations F et F', les EC_{50} calculées lors des tests MTT sur MCF-7 montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre F-0 et F'-0. Cela signifie qu'a priori la modification d'ingrédient qui a consisté à changer la paraffine par le cetearyl alcohol, n'influe pas sur la réponse cytotoxique de la formulation générale, malgré les différences constatées de comportement rhéologique, rappelées dans le Tableau 20. Cependant, on a remarqué que F-N2 et F'-N (5%) avaient des valeurs d'EC_{50} significativement différentes, alors que ce sont les mêmes nanoparticules utilisées, et en même quantité. On pourrait alors supposer que la forte augmentation de γ_c soit un paramètre à l'origine de cette différence cytotoxique. En effet, cette formulation F'-N(5%) présente un réseau particulièrement floculé des gouttelettes, ce qui pourrait être un facteur de modification de cytotoxicité de la formulation.

Tableau 20 – Paramètres rhéologiques et Valeurs d'EC_{50} pour F-0, F'-0, F-N2 et F'-N(5%)

	F-0	**F'-0**	**F-N2**	**F'-N (5%)**
G' (Pa)	**742** ± 2,7	**1611** ± 57	**756** ± 8,4	**1533** ± 9
Tan(δ)	**0,226** ± 0,002	**0,226** ± 0,026	**0,223** ± 0,001	**0,244** ± 0,013
γ_c (%)	**2,16** ± 0,66	**0,899** ± 0,383	**2,56** ± 0,24	**4,6** ± 0,55
EC_{50} (mg/L)	**312,3** ± 21,8	**363,2** ±10,5	**294,1** ± 7,1	**163,2** ± 10,3

2.2.4 Formulations vieillies

Les émulsions ont été conservées à l'étuve, et leur évaluation cytotoxique a été mesurée après une conservation de 40 jours à 50°C. Les courbes dose-réponse sont représentées sur la Figure 92.

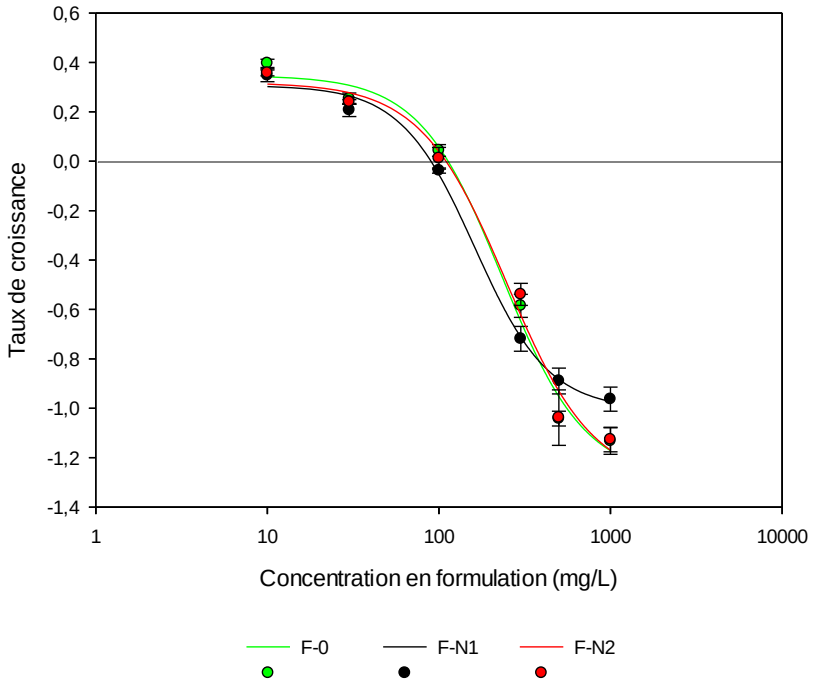


Figure 92 - Courbe dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations vieillies pour F-0, F-N1, F-N2, n=6

Lorsqu'on étudie les formulations à de faibles concentrations (10mg/L), la valeur du taux de croissance dans le cas d'une exposition cellulaire aux formulations vieillies est significativement différente de celle du contrôle, en particulier dans le cas des formulations contenant des nanoparticules (Figure 93). Cette différence est très certainement liée à la nature chimique des traitements de surface utilisés, et à l'évolution de leurs propriétés de surface au cours du vieillissement accéléré en formulation.

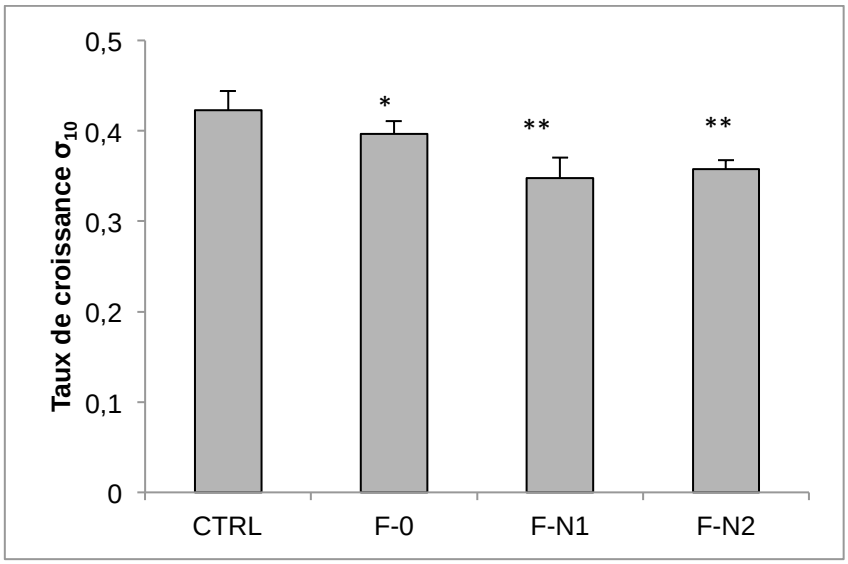


Figure 93 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 vieillies, à une concentration de 10mg/L, (: différence significative par rapport au contrôle p<0,1 et *** p<0,001), n=6*

Les émulsions F' ont permis d'incorporer un pourcentage massique variable de nanoparticules de TiO_2. Dans ces conditions, on constate que la formulation vieillie F'-0 à la plus faible concentration altère la croissance des cellules après 72h d'exposition (Figure 94), ce qui n'est pas le cas de la formulation fraîche F'-0 (Figure 89). Il est donc plus difficile d'évaluer la contribution spécifique des nanoparticules à l'altération de survie/prolifération cellulaire. Sur toute la gamme de concentrations de nanoparticules testées, l'effet est d'autant plus marqué que la concentration en nanoparticules est grande (Figure 94).

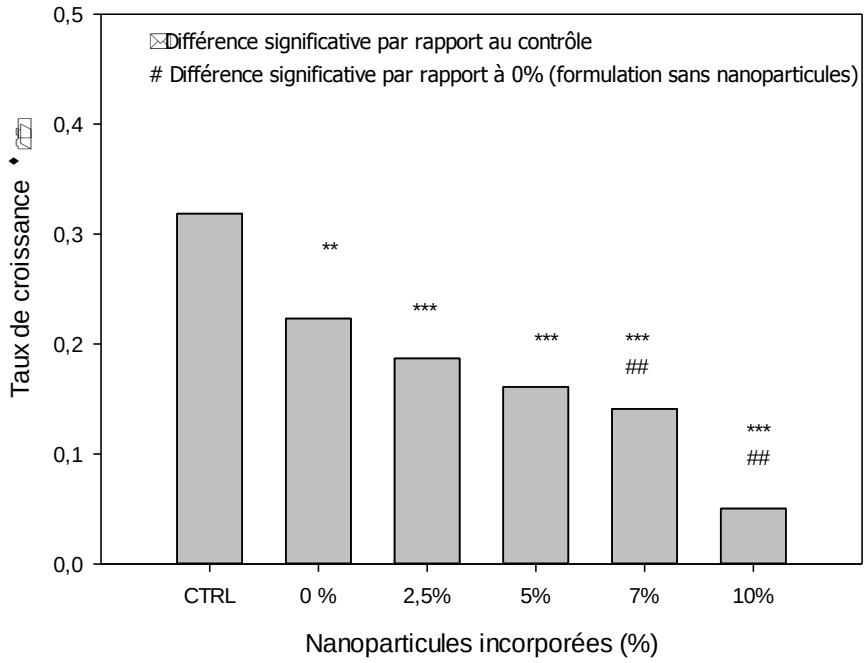


*Figure 94 - Taux de croissance σ_{10} des cellules pour les formulations F' vieillies à une concentration de 10mg/L, (** : différence significative par rapport au contrôle p<0,01 et *** p<0,001, ## : différence significative par rapport à la formulation F'-0 p<0,01), n=6*

La Figure 95 compare les valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 vieillies. Les émulsions vieillies contenant les nanoparticules de coating 1 sont plus cytotoxiques que F-0 et F-N2 vieillies, ce qui était également le cas pour les formulations fraîches.

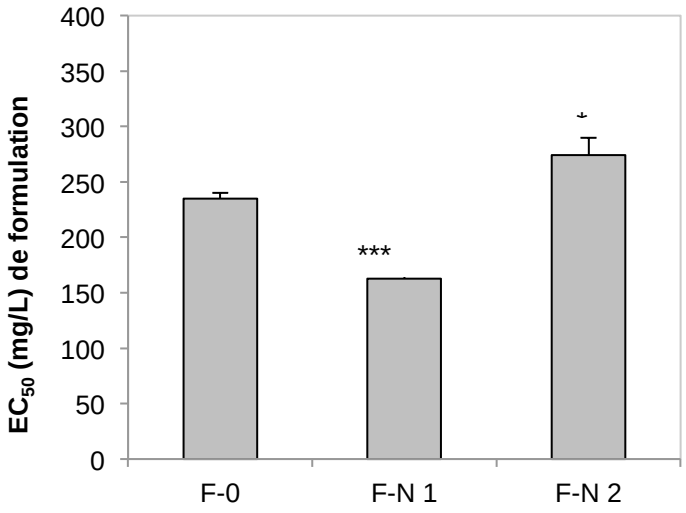


Figure 95 - Valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 vieillies, (: différence significative par rapport à F-0, p<0,1, *** : p<0,001), n=6*

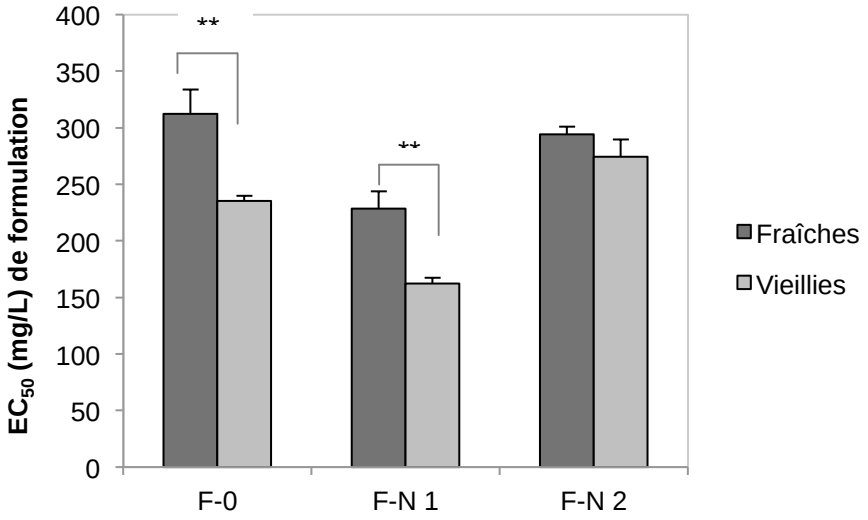


*Figure 96 – Valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, F-N1 et F-N2 fraîches et vieillies, (**: différence significative p<0,01), n=6*

On remarque sur la Figure 96 que dans les trois cas, les formulations vieillies ont une valeur d'EC_{50} plus faibles que pour les formulations fraîches. Ces valeurs sont significativement différentes pour F-0 et F-N1. Les formulations vieillies semblent donc être plus cytotoxiques.

La Figure 97 représente les valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, et F' fraîches ou vieillies. Ici encore, les formulations vieillies ont une valeur d'EC_{50} bien plus faibles que pour les formulations fraîches.

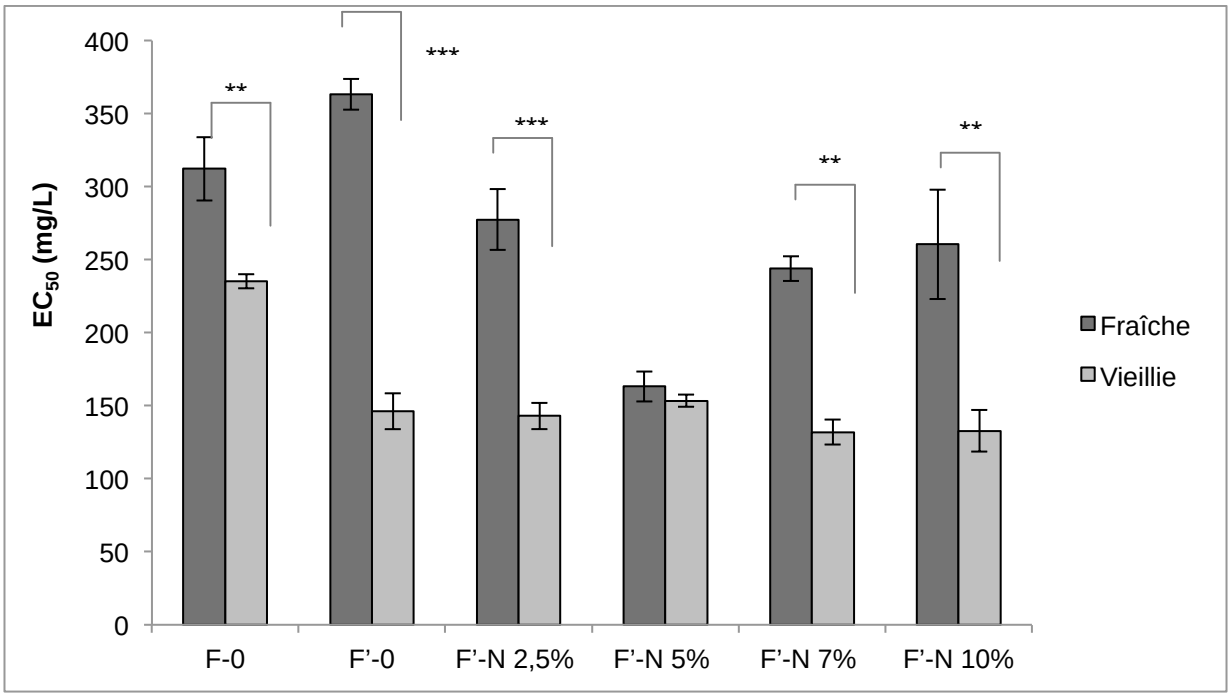


Figure 97 - Valeurs des EC_{50} pour les formulations F-0, et F', fraîches et vieillies, n=6

Au vu de ces résultats, le vieillissement accentue légèrement la toxicité des formulations seules et celles incorporant un pourcentage de nanoparticules. Il est donc important d'évaluer la toxicité des nanoparticules incorporées au sein de telles formulations.

2.3 Toxicité des nanoparticules

2.3.1 Toxicité des nanoparticules brutes

La cytotoxicité des nanoparticules brutes, a été évaluée selon les mêmes tests que pour les formulations. Comme on l'a expliqué dans le Tableau 6 p.122, à chaque concentration de formulation F-N correspond une concentration de nanoparticules incorporées. Nous avons testées une large gamme de concentration de nanoparticules de 1,5 à 5000 mg/L sur les cellules MCF-7 afin d'observer un effet aux plus hautes concentrations. Ces concentrations correspondent à des concentrations de formulations qui s'échelonnent entre 30 mg/L et 100 g/L pour une incorporation de 5% en nanoparticules. Les plus hautes valeurs de concentration testée en nanoparticules peuvent correspondre par exemple à des concentrations de formulations qui incorporeraient un pourcentage très important de nanoparticules par exemple. Cependant, des formulations incorporant des hauts pourcentages de nanoparticules pourront subir des mécanismes de vieillissement tout à fait différents de formules à 5%, comme on l'a vu dans le cas des formules F'. Cette gamme de concentration correspondante est représentée sur les premiers graphes de cytotoxicité des nanoparticules (Figure 98 et Figure 102).

a) Inhibition de croissance

Lignées humaines MCF-7

En présence de nanoparticules brutes, il apparaît que les cellules MCF-7 connaissent une inhibition de croissance pour les deux traitements de surface utilisés dès la plus faible concentration en nanoparticules testée et correspondant à une concentration en formulation de 30 mg/L. On note un faible effet dose-dépendant, comme l'indique la Figure 98. A 5000 mg/L en nanoparticules, il n'y a pas de mortalité cellulaire pour le coating 1. Le coating 2 présente des valeurs de taux de croissance inférieures à celles du coating 1 et qui sont négatives à hautes concentrations en nanoparticules. Il y a d'ailleurs une différence significative entre la valeur contrôle et le taux de croissance à la concentration la plus faible pour le coating 2.

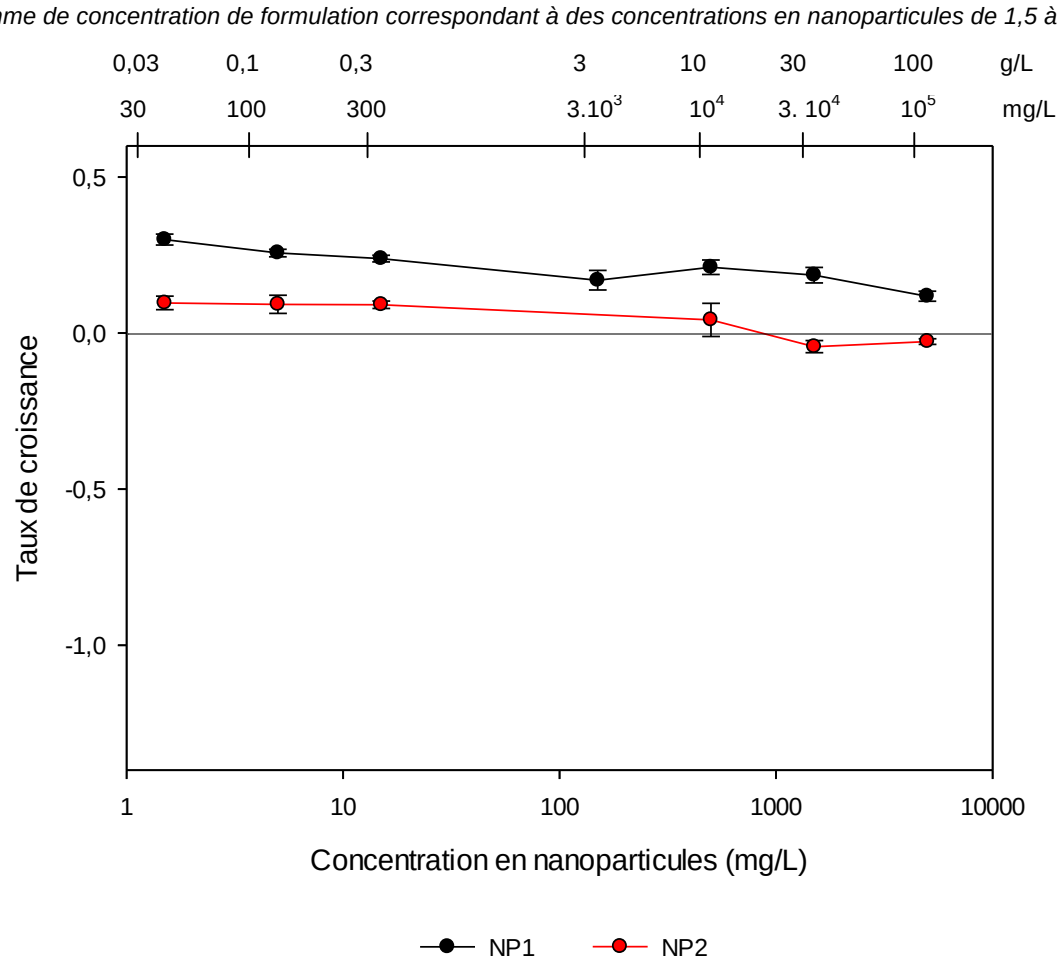


Figure 98 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules de coating 1 et de coating 2, n=6

Lignées de poisson SAF-1

Ces mêmes particules ont été testées sur les lignées cellulaires de poisson sur une gamme de concentration de 2,5 à 100 mg/L correspondant à la gamme de formulation précédemment testée sur cette même lignée, de 50 à 2000 mg/L, et ne présentent pas de cytotoxicité significative cette gamme de concentration (Figure 99).

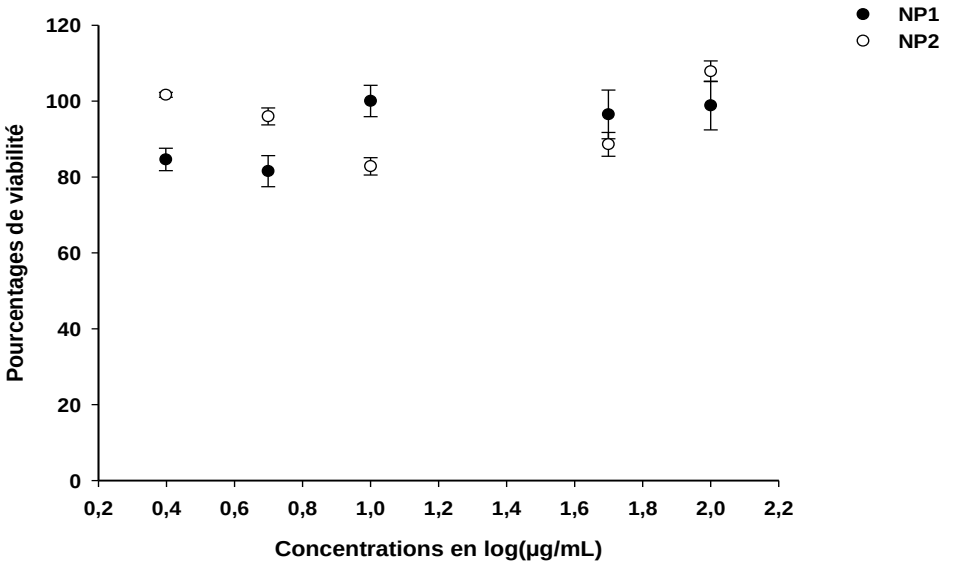


Figure 99 - Viabilité cellulaire en présence de nanoparticules brutes NP1 et NP2, n=3

b) Génotoxicité

Les tests de génotoxicité sont également négatifs pour les nanoparticules de coating 1 sur la gamme de 0,5 à 50 mg/L (Figure 100 et Figure 101).

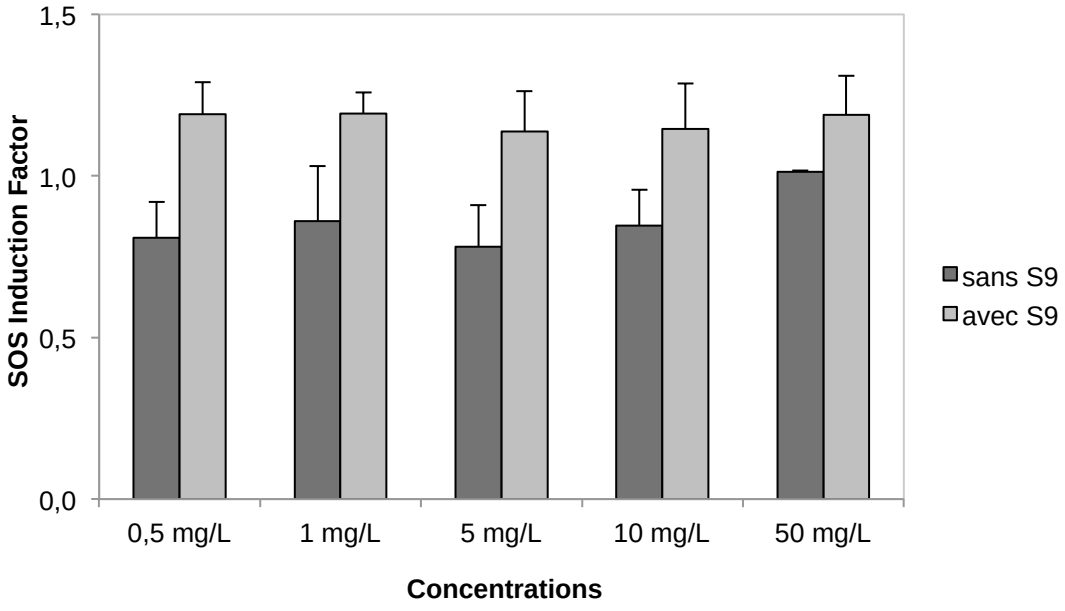


Figure 100 - SOS Induction Factors obtenus pour les nanoparticules de coating 1 (NP1) en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3

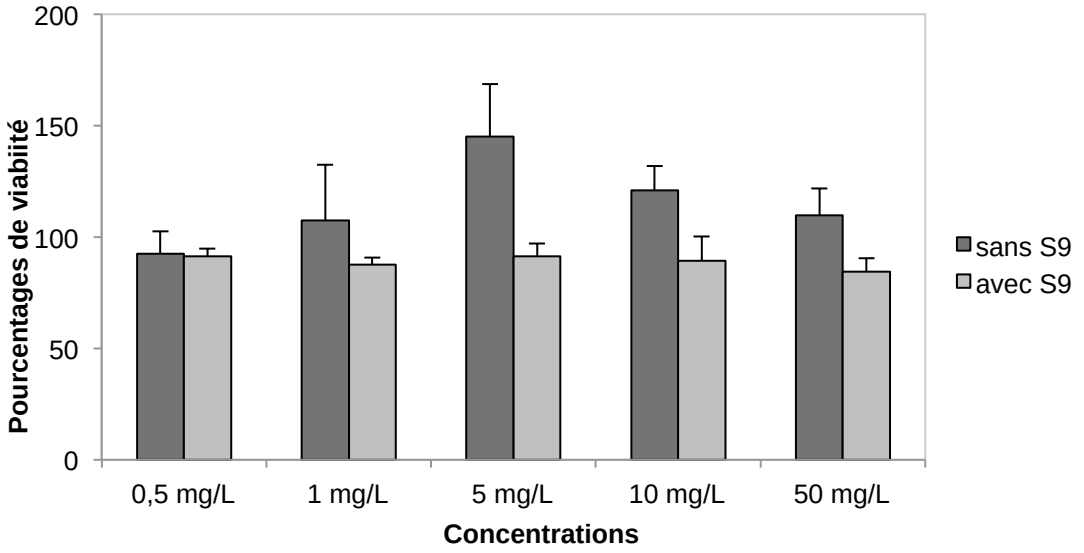


Figure 101 - Pourcentage de viabilité obtenus pour les nanoparticules de coating 1 (NP1) en fonction des concentrations testées avec et sans activation métabolique, n=3

c) Embryotoxicité

Le test d'embryotoxicité sur larves d'huîtres creuses, ne révèle aucune toxicité de l'échantillon des nanoparticules NP1 lorsqu'il est testé dans une gamme de concentration allant de 0 à 600 mg/L.

2.3.2 Toxicité des nanoparticules extraites

Comme nous l'avons décrit précédemment, nous avons extrait les nanoparticules des formulations selon deux protocoles d'extraction, afin de caractériser leur état de surface et d'évaluer leur cytotoxicité par rapport aux nanoparticules brutes avant incorporation en émulsion.

a) Premier protocole d'extraction (sans DMSO)

Impact du traitement de surface sur nanoparticules extraites de formulations fraîches

Dans le procédé suivant le premier protocole d'extraction, on observe que la courbe dose-réponse du taux de croissance des cellules MCF-7 en présence de nanoparticules extraites est différente de celle en présence de nanoparticules brutes. Pour les deux traitements de surface utilisés, on obtient des valeurs d'E_{max} inférieures à celles obtenues pour les nanoparticules brutes. Il y a un effet cytotoxique plus important que dans le cas des nanoparticules brutes. Pour les nanoparticules extraites de F-N2 fraîche, on atteint une valeur minimale E_{max} plus faible que pour le coating 1, et la valeur d'EC_{50} n'est pas calculable. Néanmoins, le taux de croissance négatif est atteint dès la concentration de 300 mg/L (Figure 102). Pour les nanoparticules extraites de F-N1 fraîches, on obtient une courbe sigmoïde avec une valeur d'EC_{50} calculée de 392,1 $\pm$ 34,9 mg/L.

Le test d'embryotoxicité mesure une valeur d'EC_{50} de 574,4 mg/L pour l'échantillon de nanoparticules extraites de F-N1 fraîches (Figure 103), alors qu'aucune toxicité n'était diagnostiquée pour les nanoparticules brutes NP1. Les deux valeurs d'EC_{50} des tests MTT et embryotoxicité sont du même ordre de grandeur. Cela montre bien que les nanoparticules ont subi des modifications chimiques modifiant leur cytotoxicité. Bien que ces effets toxiques soient visibles à très hautes concentrations en nanoparticules, cela nous permet d'observer des activités toxiques différentes par rapport aux nanoparticules brutes.

Gamme de concentration de formulation correspondant à des concentrations en nanoparticules de 1,5 à 5000 mg/L

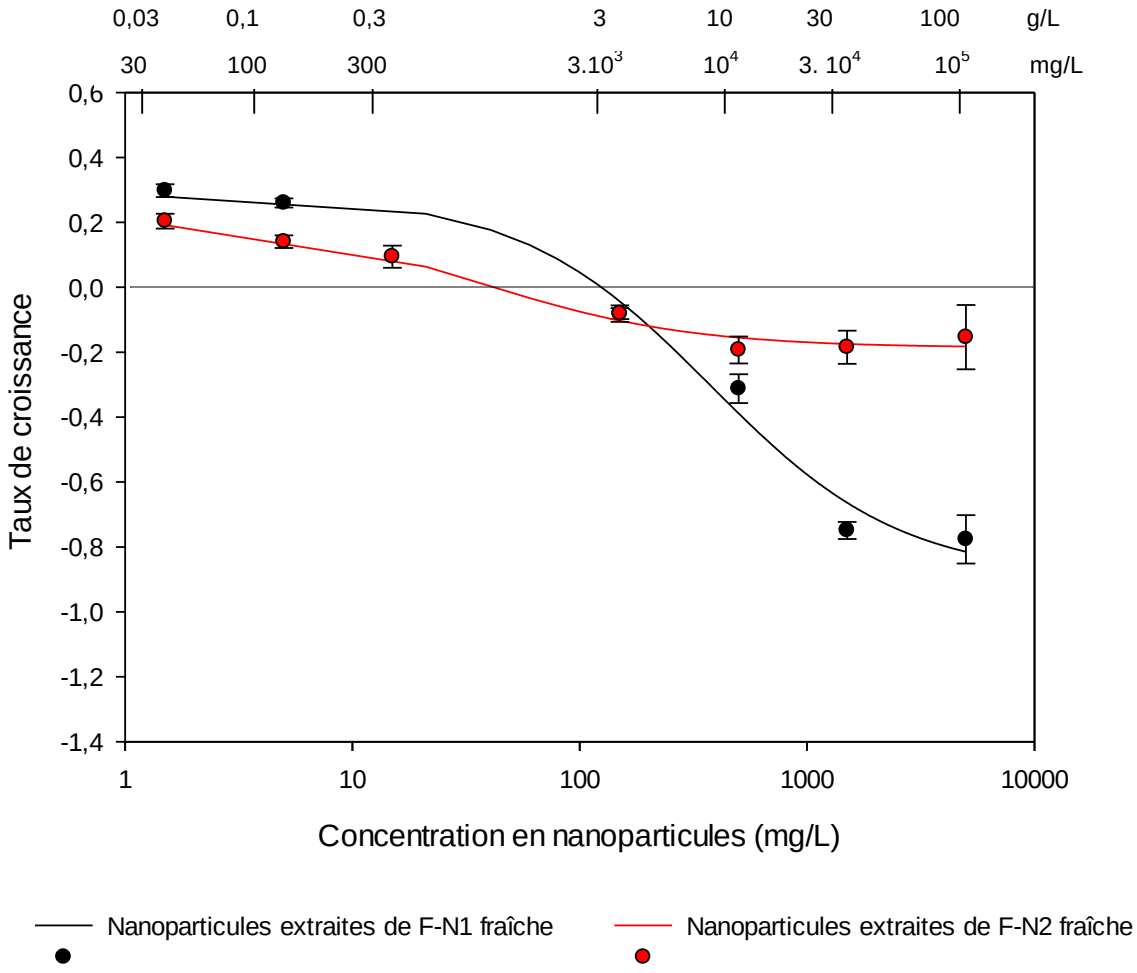


*Figure 102 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 fraîches selon le premier protocole d'extraction, (*** : différence significative par rapport au contrôle p<0,001), n=6*

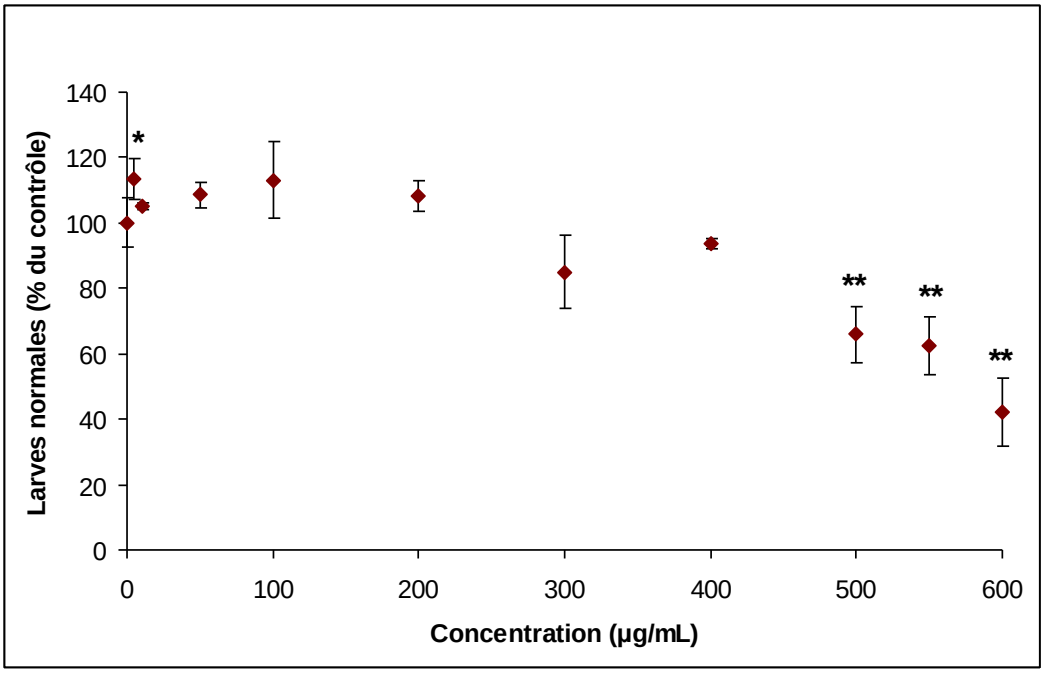


Figure 103 - Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de nanoparticules extraites de F-N1 fraîche testée, selon le premier protocole d'extraction. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3

Impact du vieillissement

Lorsque les nanoparticules sont extraites des formulations vieillies, les résultats sont très similaires pour les nanoparticules quel que soit le traitement de surface utilisé (Figure 104). Pour les deux traitements de surface utilisés, on obtient des valeurs d'E_{max} inférieures à celles obtenues pour les nanoparticules extraites des formulations fraîches. On obtient une sigmoïde identique pour les deux types de nanoparticules extraites, avec une valeur d'EC_{50} de 222,7 $\pm$ 13,2 mg/L pour les particules extraites de F-N1 vieillie et de 177,4 $\pm$ 9,9 mg/L pour celles extraites de F-N2 vieillie. Le vieillissement de la formulation a des conséquences directes sur la cytotoxicité des nanoparticules extraites, avec des valeurs d'EC_{50} inférieures à celles calculées, lorsque c'était possible, pour les formulations fraîches.

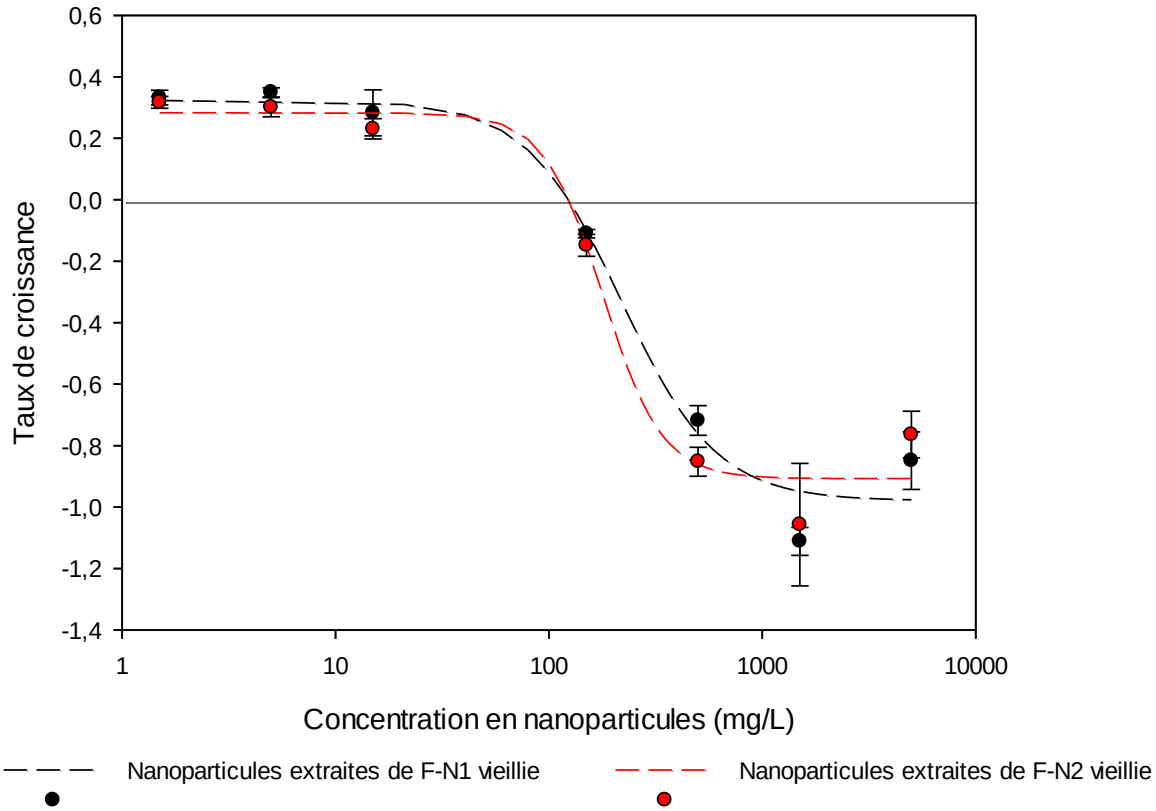


Figure 104 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 vieillies selon le premier protocole d'extraction, n=6

Les tests de mutagénicité et génotoxicité concluent à une absence de toxicité sur les nanoparticules extraites de la formulation F-N1 vieillie sur la gamme de concentration de 0,5 à 50 mg/L.

En revanche les tests d'embryotoxicité ont révélé une activité toxique pour les particules extraites de F-N1 vieillie avec une valeur d'EC_{50} de 173,78 mg/L, valeur du même ordre de grandeur qu'en cytotoxicité, et bien inférieure à la valeur de l'EC_{50} dans le cas des nanoparticules extraites d'une formulation fraîche (574,4 mg/L).

Les nanoparticules extraites selon ce premier protocole qui ont très nettement subi des modifications chimiques de surface, modulent ainsi les résultats de cytotoxicité et d'embryotoxicité.

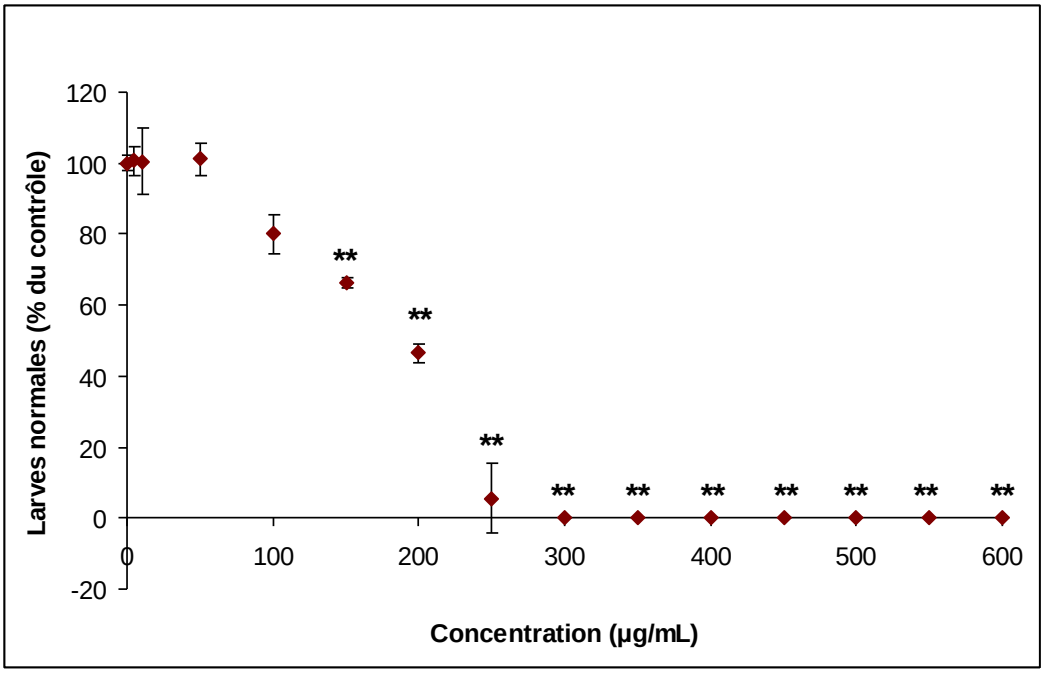


Figure 105 - Evolution du pourcentage de larves normales en fonction de la concentration de nanoparticules extraites de formulation F-N1 vieillie testée, selon le premier protocole d'extraction. Les valeurs significativement différentes du témoin négatif sont annotées (**) pour le risque 0,01%, n=3

b) Second protocole d'extraction (avec DMSO)

Après une extraction selon le second protocole, on obtient la Figure 106 pour les nanoparticules extraites des formulations fraîches, à comparer donc avec la Figure 102. On obtient une diminution progressive du taux de croissance avec la concentration en nanoparticules, et notamment pour les particules extraites de F-N1, les valeurs de taux de croissance à la plus faible concentration testée σ_{10} sont très nettement inférieures à celles obtenues lors du premier protocole d'extraction. Pour les deux types de particules, l'EC_{50} n'est pas calculable. On peut donc conclure que l'effet cytotoxique est nettement atténué lors de l'extraction des nanoparticules selon le second protocole, en présence de DMSO.

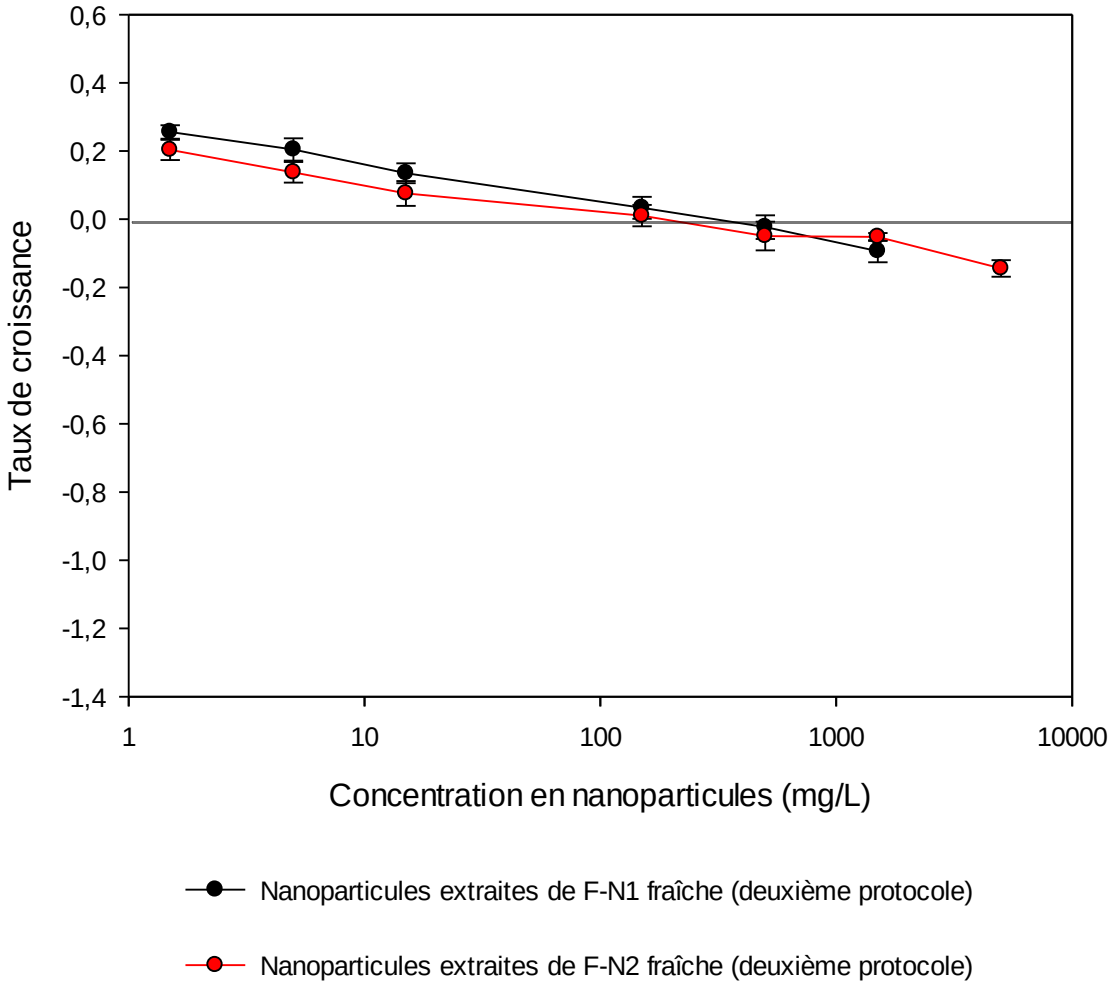


Figure 106 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 fraîches, selon le second protocole d'extraction, n=6

On observe le même type de phénomènes concernant les nanoparticules extraites des formulations vieillies. Le second protocole d'extraction permet également de diminuer l'effet cytotoxique, comme on peut l'observer sur la Figure 107. Le taux de croissance devient en effet négatif dès les deux dernières plus fortes concentrations testées pour le coating 2, mais on n'observe plus de courbe dose-réponse avec un E_{max} important, et le calcul d'EC_{50} n'est pas possible. On est dans un cas très similaire à celui des nanoparticules brutes. Les nanoparticules extraites selon ce second protocole diffèrent par leur état de surface de celles extraites selon le premier protocole, et leur cytotoxicité en a été modifiée. Le protocole d'extraction a donc une importance fondamentale sur les propriétés de surface des nanoparticules.

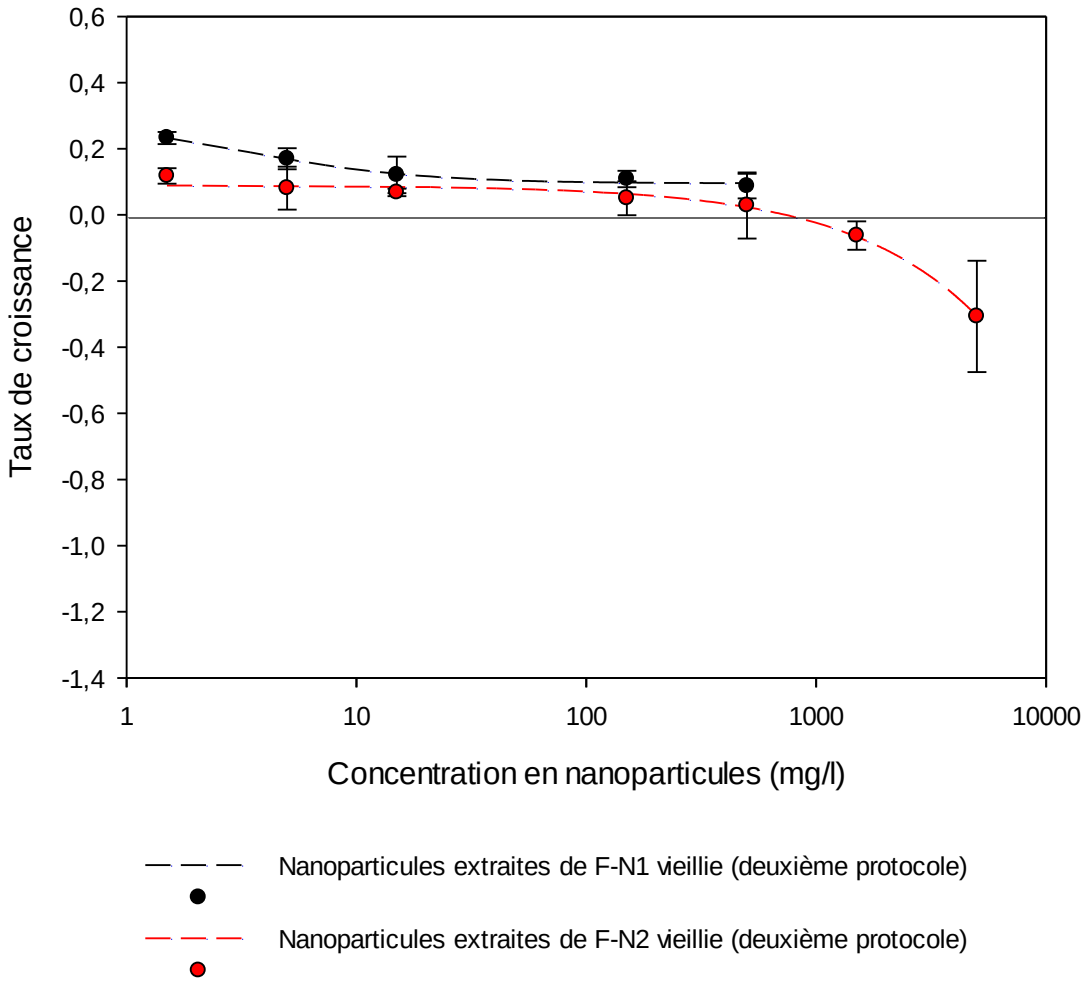


Figure 107 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des nanoparticules pour les nanoparticules extraites des formulations F-N1 et F-N2 vieillies, selon le second protocole d'extraction, n=6

2.4 Conclusion

Avertissement au lecteur

Dans ce travail, nous avons été amenés à analyser les effets de différents types de toxiques. Parmi les composés utilisés figurent un toxique de référence, la doxorubicine, dont la toxicité est directement liée à sa concentration molaire. Les tests biologiques ont également été menés avec des formulations cosmétiques complexes, selon des quantités exprimées en concentration massique. Les cellules ont aussi été exposées à des nanoparticules brutes ou extraites, mises en suspension dans le milieu biologique à des concentrations également exprimées en mg/L, sachant que ce paramètre est sans doute peu représentatif des inetractions particules/cellules, compte tenu des phénomènes de sédimentation et d'agglomération qui modifient potentiellement les surfaces réactives réellement accessibles. On est donc amené à comparer et rapprocher des grandeurs, dont on a fait en sorte qu'elles

soient comparables car exprimées dans la même unité, mais qui ne signifient pas la même chose, et qui ne sont pas testées dans les mêmes conditions d'exposition.

Plusieurs points ressortent des résultats d'évaluation de la toxicité des formulations testées sur les systèmes cellulaires. Ils sont récapitulés par les Tableau 21 à 23, et les Figure 108 à 112.

Tout d'abord, les tests de survie/prolifération des MCF-7 et de toxicité larvaire sur huître donnent des résultats comparables lorsqu'ils ont été effectués en parallèle. Les essais sur cellules SAF-1 et les tests de génotoxicité ont toujours donné des résultats négatifs. Le test de survie/prolifération des MCF-7 est plus riche en renseignements de nature toxicodynamique. L'effet maximal atteint est comparable pour la Doxorubicine et pour la formulation F, mais les puissances sont très différentes. Cette différence entre les EC_{50} provient de la distribution des points expérimentaux sur les relations dose-réponse des tests de toxicité larvaire qui présente plusieurs points d'inflexion et ne se prête pas à l'ajustement d'une relation sigmoïde à trois paramètres. Elle ne doit pas être considérée comme particulièrement significative.

Les formulations utilisées sont légèrement cytotoxiques. La formulation F-0 sans nanoparticules altère la survie/prolifération des cellules MCF-7 et altère le développement de larves d'huitres à des concentrations élevées de plusieurs centaines de mg/L.

La présence de nanoparticules dans les formulations, modifie peu la réponse biologique aux formulations F-N1 et F-N2.

L'effet cytototoxique est toutefois significativement augmenté avec les particules de coating 1. Les valeurs d'EC_{50} lors des tests d'embryotoxicité sur ces formulations sont beaucoup plus élevées (de l'ordre de 2000 mg/L) en comparaison à celles obtenues lors des tests MTT (300 mg/L), et sans différence significative entre la formulation avec et la formulation sans nanoparticules (Figure 110). En revanche les valeurs de CMEO sont bien différentes entre les formulations, indiquant un effet toxique plus marqué pour la formulation sans nanoparticules.

L'effet cytotoxique est significativement augmenté pour les plus fortes concentrations en nanoparticules. En ce qui concerne les formulations F' intégrant un pourcentage de nanoparticules variant de 2,5 à 10%, le taux de croissance à 10 mg/L σ_{10} diminue avec l'incorporation croissante de nanoparticules de TiO_2.

Le vieillissement est un paramètre ayant un impact sur la cytotoxicité des formulations, et ce dès une concentration faible, en particulier pour les formulations F' (Figure 94), ce qui est bien visible sur la Figure 112. Il accentue légèrement la toxicité des formulations sans

nanoparticules. Il intensifie aussi l'effet de l'exposition aux formulations incorporant un fort pourcentage de nanoparticules de coating 2. Dans tous les cas, les valeurs des EC_{50} sont élevées et peu variables, entre 300 et 150 mg/L, ce qui signifique que les variations des conditions d'exposition (absence ou présence de TiO_2, de coating 1 ou 2, vieillies ou non) modifie la faible toxicité cellulaire de la formulation initialedans une gamme restreinte (Figure 109).

On peut constater, comme l'indiquent la Figure 108 et le Tableau 22, que les nanoparticules brutes NP1 et NP2 n'ont pas d'effet cytotoxique franc. L'effet est très peu marqué et, en conséquence, très peu dose-dépendant. Le taux de croissance cellulaire reste positif sur toute la gamme de concentration testée : les cellules continuent à proliférer, mais moins vite. Il y a une inhibition de croissance, mais pas de mortalité cellulaire. Les nanoparticules NP2 ont plus d'effet que les NP1.

Le vieillissement est à l'origine d'une activité toxique pour les NP2 extraites sans DMSO. Cette toxicité semble être provoquée par l'adsorption de constituants des formulations sur les nanoparticules. Cet effet peut être annulé par un procédé d'extraction avec lavage au DMSO. L'état de surface résultant du protocole d'extraction a une grande influence sur la toxicité des nanoparticules extraites. Les nanoparticules adsorbent des constituants toxiques de la formulation, en fonction de leur coating initial et d'autant plus que le système vieillit.

Pour résumer, nous sommes face à trois réponses différentes pour chacun des systèmes étudiés : les nanoparticules brutes, les formulations avec nanoparticules et les nanoparticules extraites des formulations. Les formulations exercent un effet délétère sur la survie/prolifération de la lignée MCF-7, avec mortalité cellulaire à des concentrations élevées, alors que les nanoparticules brutes aux mêmes concentrations n'entraînent qu'une inhibition de croissance sans mortalité. Les nanoparticules extraites présentent des profils cytotoxiques différents en fonction du protocole d'extraction et du vieillissement de la formulation, ce qui signifie que les modifications subies par les particules au cours de ces extractions affectent leur cytotoxicité. Pour une même quantité testée de nanoparticules (brutes, extraites ou en formulation), la réponse cytotoxique n'est pas la même : l'effet de l'environnement et celui du milieu contenant ces nanoparticules sont fondamentaux.

Dans la partie qui suit, nous proposons une discussion générale des données biologiques à la lumière des résultats physico-chimiques obtenus dans le chapitre 1.

Tableau 21 - Taux de croissance à 10mg/L (σ_{10}) et EC_{50} des formulations F-0, F-N1 et F-N2, fraîches et vieillies, pour les différents tests réalisés. Les résultats significativement différents du σ_{10} contrôle ou de l'EC_{50} de F-0 sont dans des cases roses, dans le cas contraire, la case est bleue

		F-0	F-N1	F-N2
Fraîches	MTT	σ_{10} = 0,412 ± 0,009 j^{-1} EC_{50} = 312,3 ± 21,8 mg/L	σ_{10} = 0,375 ± 0,013 j^{-1} EC_{50} = 228,6 ± 15,6 mg/L	σ_{10} = 0,388 ± 0,007 j^{-1} EC_{50} = 294,1 ± 7,1 mg/L
	Embryotoxicité	CMEO = 200 mg/L EC_{50} = 2190 mg/L	CMEO = 1000 mg/L EC_{50} = 2087 mg/L	ND[1]
	Cell Tracker	NSD[2]	NSD	ND
	Génotoxicité / Mutagénicité	NSD	NSD	ND
Vieillies	MTT	σ_{10} = 0,396 ± 0,007 j^{-1} EC_{50} = 235,1±4,9 mg/L	σ_{10} = 0,348 ± 0,011 j^{-1} EC_{50} = 162,5±4,7 mg/L	σ_{10} = 0,357 ± 0,005 j^{-1} EC_{50} = 274,1±15,6 mg/L

[1] Non Déterminé
[2] Non Significativement Différent du contrôle

Tableau 22 - Taux de croissance correspondant à une concentration de formulation de 10mg/L (σ_{10}) et EC_{50} des nanoparticules brutes et extraites des formulations fraîches et vieillies pour les différents tests réalisés.

		NP1	NP2	NP extraites de F-N1 Protocole 1	NP extraites de F-N2 Protocole 1	NP extraites de F-N2 Protocole 2	NP extraites de F-N2 Protocole 2
Fraîches	MTT	$\sigma_{10} = 0,300 \pm 0,007\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,096 \pm 0,009\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,298 \pm 0,008\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,204 \pm 0,009\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,256 \pm 0,008\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,203 \pm 0,012\ j^{-1}$
		EC_{50} = NC[3]	EC_{50} = NC	EC_{50} = 392,1±34,9 mg/L	EC_{50} = NC	EC_{50} = NC	EC_{50} = NC
	Embryotoxicité	NSD	ND	EC_{50} = 574,4 mg/L	ND	ND	ND
	Cell Tracker	NSD	NSD	NSD	NSD	ND	ND
	Génotoxicité / Mutagénicité	NSD	NSD	ND	ND	ND	ND
Vieillies	MTT			$\sigma_{10} = 0,332 \pm 0,010$	$\sigma_{10} = 0,317 \pm 0,008$	$\sigma_{10} = 0,233 \pm 0,008$	$\sigma_{10} = 0,118 \pm 0,010$
				EC_{50} = 222,7±13,2 mg/L	EC_{50} = 177,4±9,9 mg/L	EC_{50} = NSD	EC_{50} = NSD
	Embryotoxicité			EC_{50} = 173,78 mg/L	ND	ND	ND
	Cell Tracker			NSD	NSD	ND	NSD

Tableau 3 – Taux de croissance à 10mg/L (σ_{10}) et EC_{50} des formulations F' fraîches et vieillies pour les tests MTT

		F'-0	F'-N 2,5%	F'-N 5%	F'-N 7%	F'-N 10%
Fraîches	MTT	$\sigma_{10} = 0,428 \pm 0,011\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,432 \pm 0,015\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,428 \pm 0,011\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,323 \pm 0,009\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,232 \pm 0,018\ j^{-1}$
		EC_{50} = 363,2±10,5 mg/L	EC_{50} = 277,4±20,9 mg/L	EC_{50} = 163,2±10,3 mg/L	EC_{50} = 243,8±8,4 mg/L	EC_{50} = 260,5±37,4 mg/L
Vieillies	MTT	$\sigma_{10} = 0,223 \pm 0,027\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,187 \pm 0,019\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,161 \pm 0,027\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,141 \pm 0,022\ j^{-1}$	$\sigma_{10} = 0,050 \pm 0,032\ j^{-1}$
		EC_{50} = 146,2±12,3 mg/L	EC_{50} = 143,0±9,0 mg/L	EC_{50} = 153,3±4,2 mg/L	EC_{50} = 131,8±8,6 mg/L	EC_{50} = 132,8±14,4 mg/L

[3] NC : Non Calculable

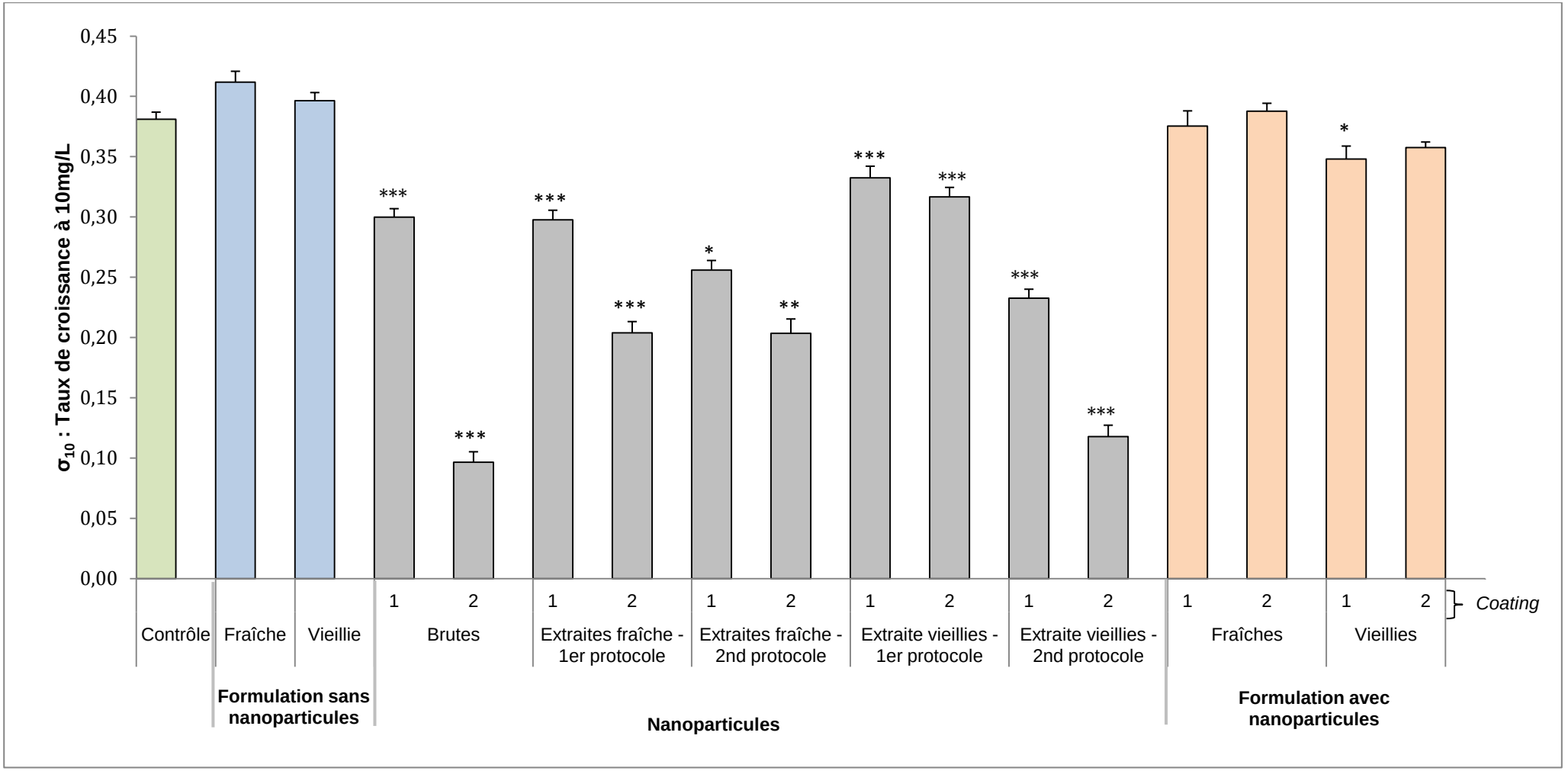


*Figure 108 - Effet des différents systèmes testés de la formulation F pour une concentration de 10mg/L, (*** : différence significative par rapport au contrôle [calculé sur l'ensemble des tests réalisés] p<0,001), n=6*

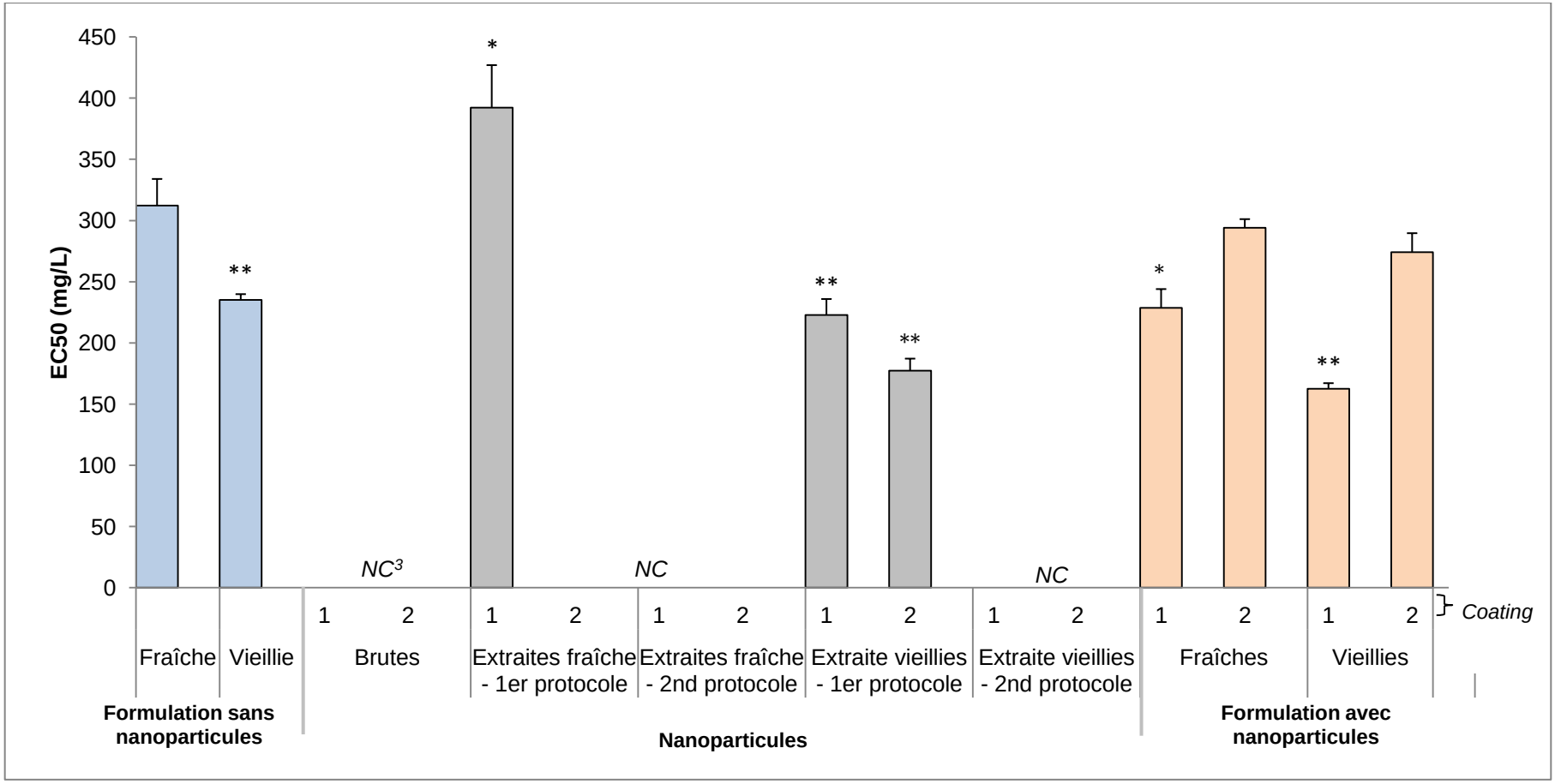


Figure 109 – Valeur des EC_{50} des différents systèmes testés pour la formulation F, (** : différence significative par rapport à la formulation fraîche sans nanoparticules F-0 $p<0,01$[4]), n=6

[4] Non Calculable

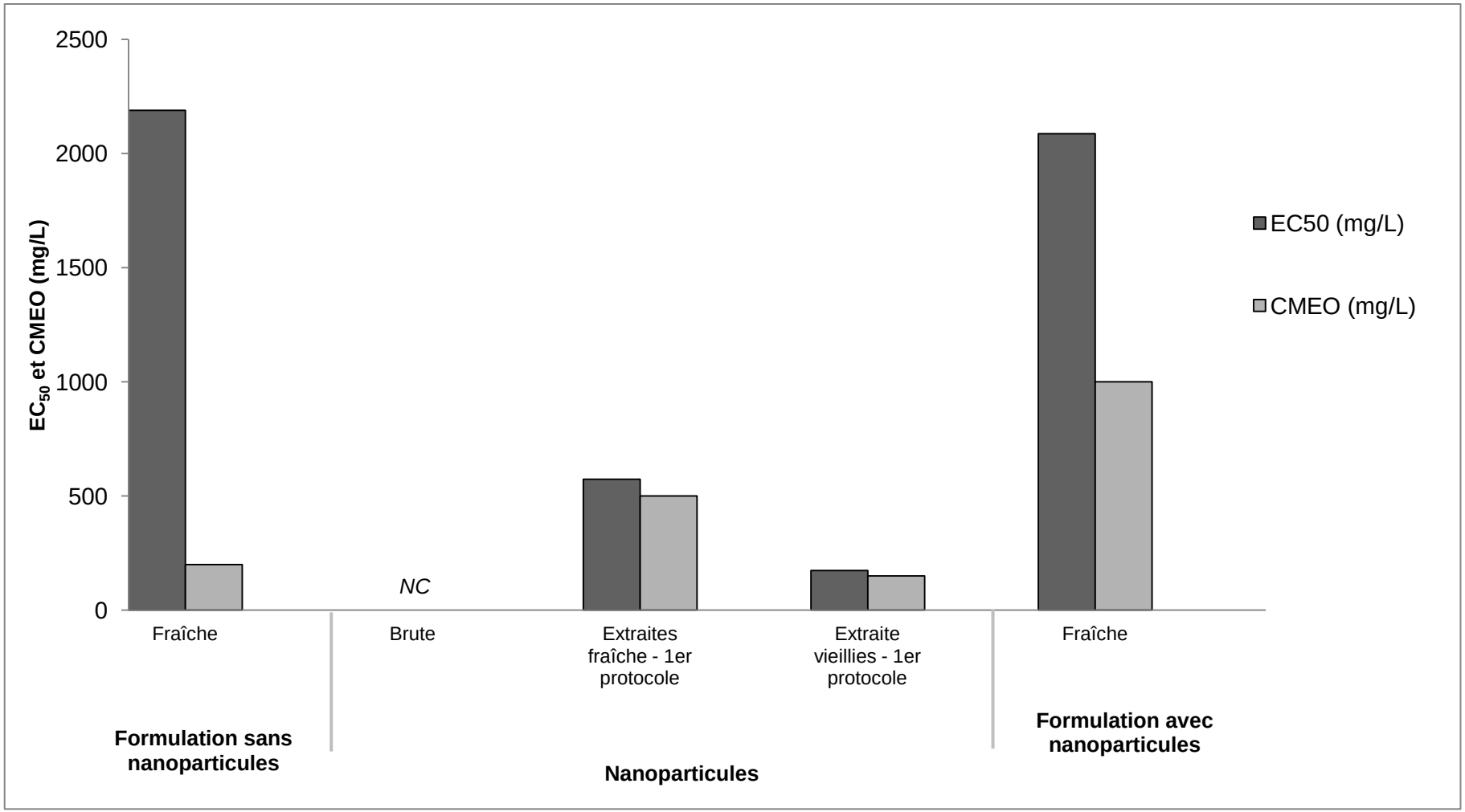


Figure 110 - Valeur des EC_{50} et CMEO en mg/L des différents systèmes testés, toujours avec le coating 1

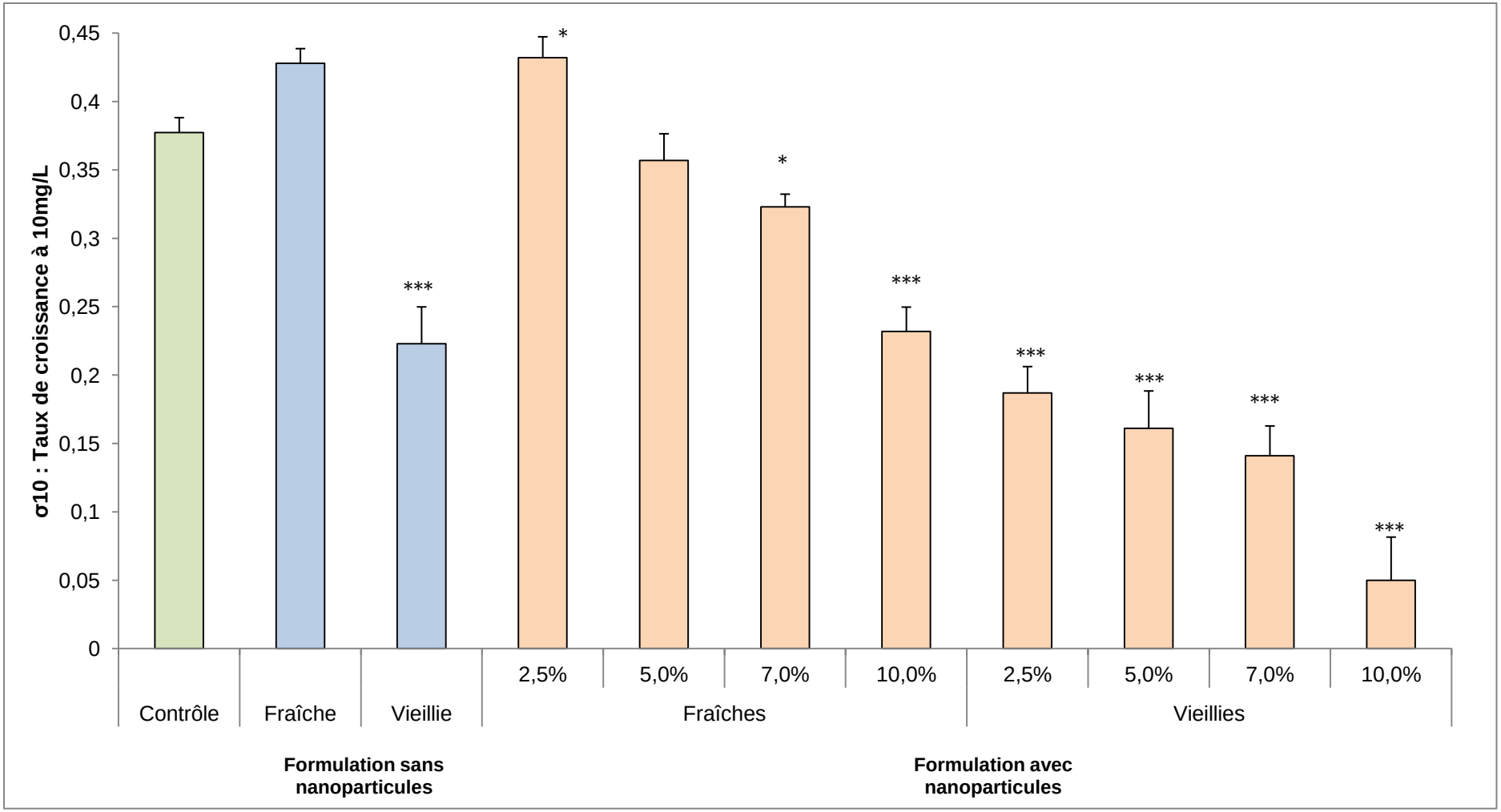


*Figure 111 - Effet des différents systèmes testés de la formulation F' pour une concentration de 10mg/L, (*** : différence significative par rapport au Contrôle [calculé sur l'ensemble des tests réalisés] p<0,001), n=6*

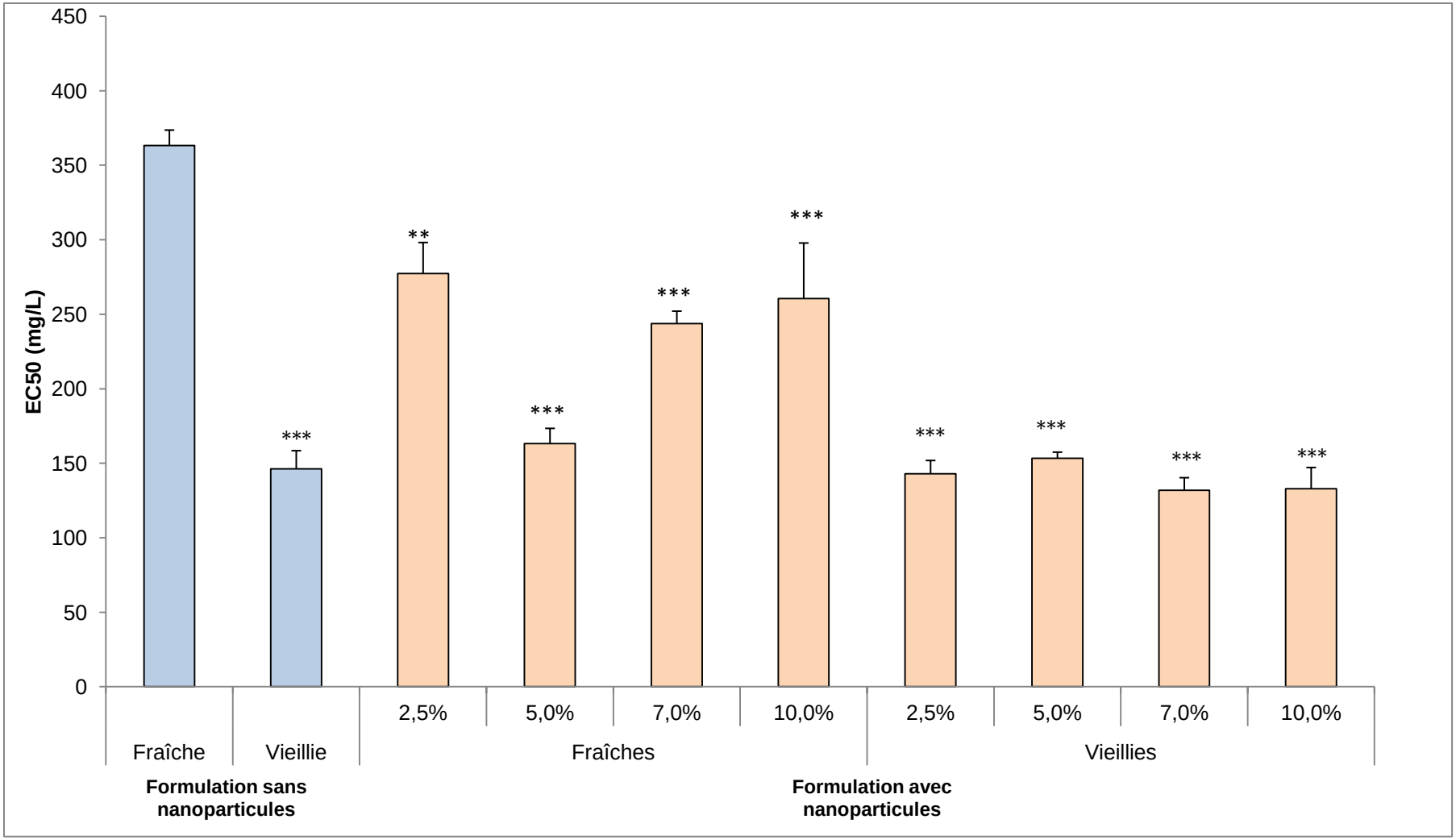


*Figure 112 - Valeur des EC_{50} des différents systèmes testés pour la formulation F', (*** : différence significative par rapport à la formulation fraîche sans nanoparticules F'-0 p<0,001), n=6*

Chapitre 3 *Discussion générale*

Le relargage de composés nanostructurés à partir de matériaux incorporant intentionnellement des nanoparticules manufacturées reste encore un domaine très peu étudié. En particulier, les processus conduisant à un tel relargage ainsi que l'état physico-chimique sous lequel les nanoparticules sont libérées dans l'environnement demeurent largement méconnus. Dans le cas d'une crème solaire, le produit est amené à subir des variations de température du fait de son utilisation dans des conditions de chaleur parfois caniculaires. Lors d'un vieillissement à 50°C, les émulsions et les particules qu'elles contiennent sont soumises à des déstabilisations physico-chimiques, comme on a pu le voir au chapitre 1.3 p.160. Nous avons pu mettre en évidence au cours de ces travaux que la crème cosmétique elle-même transforme profondément les nanoparticules brutes de départ : au cours du cycle de vie du produit à l'échelle du laboratoire (incorporation en émulsion après broyage, vieillissement dans le temps et à hautes températures), apparaissent des transformations majeures de la nature des nanoparticules utilisées. Nous apportons donc ici de nouveaux résultats pour une prise de conscience vis-à-vis des évolutions physico-chimiques et des effets biologiques des émulsions cosmétiques contenant des nanoparticules de TiO_2 revêtues.

3.1 Des conditions d'expérimentation éloignées de la réalité

La plupart des études menées jusqu'à présent sur les nanoparticules de TiO_2 ont été réalisées dans des conditions souvent très éloignées de celles rencontrées dans la réalité : leurs résultats sont donc difficilement généralisables et à considérer avec une grande prudence.

3.1.1 Des systèmes étudiés non représentatifs d'une situation d'exposition

Les nanomatériaux manufacturés bruts ou synthétisés en laboratoire sont différents des résidus de dégradation des nanomatériaux auxquels sont réellement exposés les écosystèmes et les populations humaines. Il est difficile de connaître avec certitude et de manière exhaustive un grand nombre de nanomatériaux qui sont incorporés dans les produits sur le marché, et par conséquent les résidus de dégradation des nanomatériaux relargués dans l'environnement tout au long du "cycle de vie" de ces produits. Il est également difficile de prendre en compte les transformations subies dans l'environnement comme le degré d'acidité ou de salinité de l'eau de mer par exemple. De plus, les études sont généralement faites en isolant les substances, ce qui ne permet pas d'établir les effets d'interaction d'une pluralité de substances pénétrant dans l'organisme. Il ne faut pas négliger un "effet cocktail" potentiel entre des nanomatériaux et certains ingrédients chimiques d'une émulsion par exemple. En choisissant de formuler nos propres produits cosmétiques dans le cadre de ce travail, nous maîtrisons davantage de données qui nous seraient inconnues en travaillant avec des crèmes commerciales. Nous pouvons notamment comparer les propriétés physico-chimiques et les effets cytotoxiques des produits vieillis avec les nanoparticules brutes de départ avant incorporation dans l'émulsion.

3.1.2 Difficultés d'évaluation des concentrations d'exposition

Les concentrations de nanomatériaux testés sont souvent plus importantes que celles estimées dans l'environnement. Dans un contexte environnemental, ces fortes concentrations permettent de correspondre à des situations de contamination aiguë et ponctuelle (comme par exemple un déversement accidentel sur un site de production, ou au cours du transport), mais peuvent également correspondre à des situations de bio-accumulation (cf 3.7.3 p.87). Les nanoparticules utilisées dans les émulsions solaires sont sujettes à être bio-concentrées puisque des nanoparticules de TiO_2 non revêtues peuvent être détectées dans différents compartiments endocellulaires (Rothen-Rutishauser *et al.* 2007; Xia *et al.* 2008). Dans tous les milieux, la capacité de détecter les nanoparticules à des niveaux de concentrations naturelles doit constituer une priorité de recherche afin de fournir des données de référence pour de futures études. Les techniques permettant cela doivent encore être développées puis validées (Ju-Nam & Lead 2008).

Jusqu'à présent la majorité des études se sont focalisées sur la dangerosité des nanoparticules de TiO_2 à fortes concentrations avec peu de caractérisations au plan physico-chimique. Les résultats restent parfois contradictoires, et il semble encore précoce de conclure quant à une absence totale de risques (Skocaj *et al.* 2011; Smijs & Pavel 2011). Dans notre étude, la gamme de concentration pour les formulations (10-1000 mg/L) a été choisie en fonction des études dans la littérature, où les doses de nanoparticules utilisées pour les expositions varient très fortement entre 5.10^{-4} et 10^{4} mg/L (Valant, Iavicoli & Drobne 2011). La gamme de concentration de formulation exposée pour Zanatta *et al.* 2008 se situe entre 31 et 1000 mg/mL, ce qui correspond à des valeurs extrêmement élevées pour observer un effet dose-réponse dans le cas des formulations testées au cours du présent travail. Généralement, des effets de cytotoxicité et d'inflammation sont observés à partir de concentrations de 100 mg/L selon un comportement dose-réponse classique et les effets augmentent en fonction du temps et de la concentration (Sayes et al. 2006). Les concentrations testées dans nos travaux sont très élevées, et supérieures aux concentrations du toxique de référence afin d'observer un effet toxique similaire. Les concentrations de nanoparticules correspondantes sont également des concentrations vraisemblablement plus importantes que celles qui pourraient se retrouver dans l'environnement, même si cela est difficile à calculer (Mueller & Nowack 2008; Gottschalk *et al.* 2009). Il faut donc prendre le recul nécessaire vis-à-vis des effets toxiques observés dans notre travail.

Les incertitudes sur les effets des nanoparticules donnent lieu à des divergences d'interprétation. Etant donné que les doses absorbées par l'organisme et que les concentrations environnementales restent inconnues, certaines recommandations tendent à minimiser les risques tandis que d'autres insistent sur l'effet toxique réel ou modélisé. Les

nombreuses incertitudes scientifiques qui demeurent laissent le champ libre à ces différences d'appréciation.

3.1.3 Inter-comparaison entre les tests de toxicité

Une autre difficulté de l'évaluation de ces nanoparticules réside dans la possibilité d'interférences des substances testées avec les réactifs ou milieux biologiques (cf 3.5.2 p.84).

a) Test LDH

Afin de déterminer les causes des effets toxiques observés, nous avons essayé de réaliser des tests LDH permettant de mesurer l'intégrité membranaire des cellules. En effet, les cellules dont la membrane a été rompue libèrent leur contenu cytosolique dans le milieu extracellulaire, et notamment l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH). La quantité de LDH relarguée dans le milieu de culture est fonction de la mort cellulaire. La mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture est effectuée par un dosage enzymatique colorimétrique (Decker & Lohmann-Matthes 1988; Legrand *et al.* 1992). La LDH transforme le lactate en pyruvate, en réduisant le NAD en NADH. En présence de NADH, le colorant jaune INT (2- (4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium) est transformé en formazan de couleur rouge absorbant à 492 nm. On peut ainsi avoir une mesure indirecte de la mort cellulaire provoquée par une altération de la membrane cellulaire. Malheureusement, avec les échantillons d'émulsions testés au cours de ce travail, ces analyses n'ont pas fourni de résultats valables. En effet à hautes concentrations de formulation, après ajout du réactif LDH, les puits de cellules prennent une coloration violette, ce qui n'est pas compatible avec les résultats attendus en présence d'une substance toxique : la coloration devrait virer au rouge foncé. Nous avons observé cette coloration inattendue pour des milieux de culture contenant du rouge de phénol ou non, et surtout sur des puits ne contenant pas de cellules. Nous avons donc supposé que cette coloration pouvait être due en partie au sérum de veau fœtal utilisé, ce qui a été confirmé : pour des puits ne contenant pas de cellules, la densité optique est identique avec ou sans rouge de phénol, et croît avec la quantité de sérum de veau fœtal. Le sérum interfère donc avec le réactif LDH et fausse la densité optique observée. Ce phénomène est amplifié avec l'exposition à de hautes concentrations en formulation. Ainsi, en présence de formulation à haute concentration et de sérum, le test colorimétrique est faussé et ne rend pas compte de la véritable activité LDH du milieu.

Afin de s'affranchir de ce problème, une solution possible a été d'ensemencer les cellules dans un milieu d'exposition ne contenant pas de sérum, ce qui a cependant la conséquence de ralentir très fortement la croissance cellulaire. Il aurait pu également être envisageable d'ensemencer les cellules dans un milieu d'exposition contenant du sérum, mais de rincer les cellules avec du RPMI non complet avant de procéder au protocole LDH. Ces tests n'ont pas été réalisés et doivent faire l'objet de travaux futurs.

b) Test WST1

C'est un test colorimétrique de cytotoxicité basé sur le clivage des sels de tétrazolium WST-1 (4-[3-(4-Iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzene disulfonate) incolore par les déshydrogénases mitochondriales. Sous l'action de ces enzymes on obtient un dérivé formazan de couleur jaune, quantifiable par spectrophotométrie à 420-480 nm. Une croissance du nombre de cellules viables implique une augmentation des déshydrogénases mitochondriales. Cette augmentation de l'activité enzymatique conduit à une augmentation de la quantité de formazan formée, et est donc directement corrélée au nombre de cellules métaboliquement actives dans la culture.

Ce test a fonctionné pour la formulation sans nanoparticules F'-0, comme l'indique la Figure 113. L'EC_{50} calculée vaut 420,2 ± 21,1 mg/L. Cette valeur est du même ordre de grandeur que l'EC_{50} calculée pour F'-0 par le test MTT de 356,9 ± 19,2 mg/L. Ces deux tests fournissent donc les mêmes résultats.

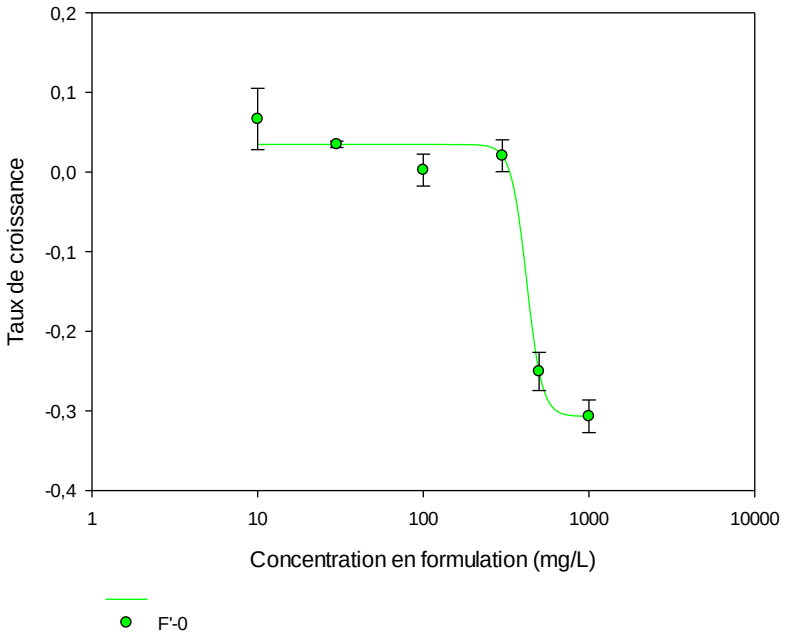


Figure 113 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F'-0 par le test WST1, n=6

En revanche pour les formulations à pourcentage croissant en nanoparticules, nous avons été confrontés à des valeurs étranges, pour des valeurs supérieures ou égales à 1000 mg/L. En effet, pour des valeurs de 1000, 3000 et 5000 mg/L (les deux dernières n'étant pas montrées ici), le taux de croissance ré-augmente, laissant penser que les formulations à très hautes concentrations ne sont plus aussi cytotoxiques qu'aux concentrations plus faibles. Cela est visible sur la Figure 114, avec un effet visible dès la concentration de 1000 mg/L. On peut donc supposer que l'utilisation de nanoparticules dans la formulation cosmétique crée des faux positifs dans le test du WST1.

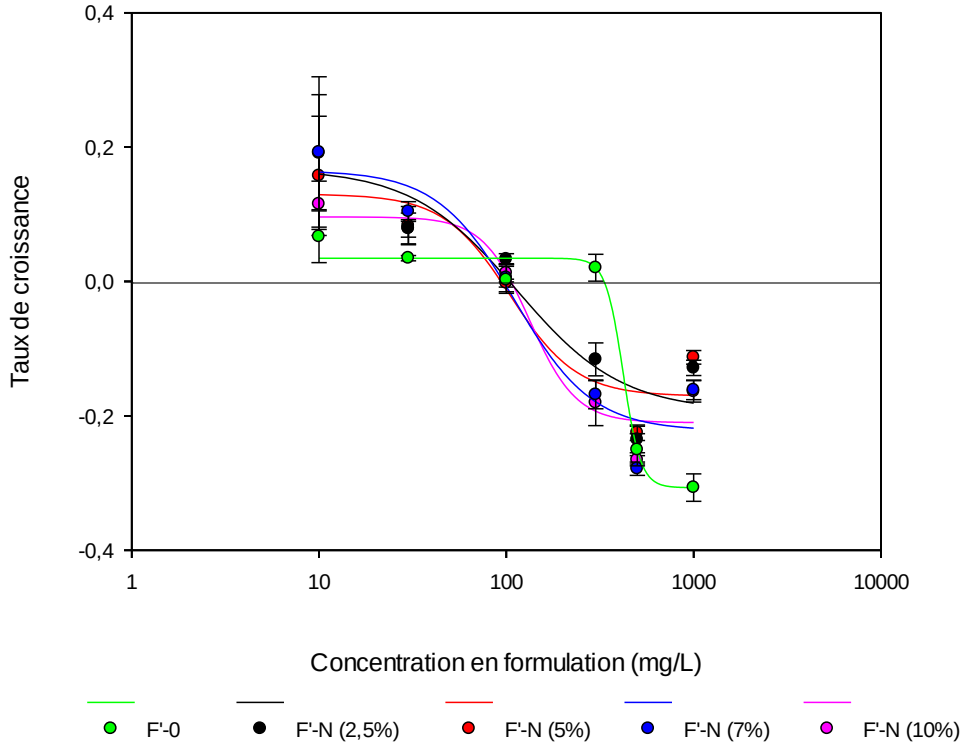


Figure 114 - Courbes dose-réponse du taux de croissance cellulaire en fonction de la concentration des formulations fraîches pour F'-0, F'-N (2,5%), F'-N (5%), F'-N (7%), F'-N (10%) par le test WST1, n=6

c) Test MTT

Le test MTT s'est avéré le meilleur test et a été de ce fait retenu et utilisé tout au long de l'étude. Nous n'avons en effet pas constaté que les propriétés de surface des nanoparticules interféraient avec le réactif MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Aucune interférence avec le dispositif utilisé pour la mesure d'absorbance n'a été observée. Il a pourtant été montré que ce réactif (ainsi que le rouge neutre) pouvait s'adsorber sur la nanoparticule et conduire à une évaluation erronée de la cytotoxicité (Monteiro-Riviere, Inman & Zhang 2009). Ces indicateurs colorés ont conduit à des faux-positifs lors de l'évaluation avec des nanomatériaux carbonés, mais ont donné des résultats fiables avec les quanta dots : ces phénomènes d'interférence ne seraient pas liés à une perturbation de l'activité enzymatique, mais plutôt à la nature insoluble du MTT-formazan. Les nanomatériaux se lient aux cristaux de formazan et stabilisent leur structure chimique, empêchant ainsi l'étape de solubilisation, et pouvant mener à une surestimation de cytotoxicité (Wörle-Knirsch, Pulskamp & Krug 2006). Cependant dans ces études, certains protocoles de tests MTT ont été réalisés avec l'utilisation d'acide ou d'alcool afin de solubiliser les cristaux de formazan. Ces solvants sont probablement moins efficaces pour solubiliser des nanoparticules hydrophobes. Le DMSO, utilisée dans nos protocoles, s'avère donc être indispensable comme solvant pour ce type d'étude afin de s'affranchir de ce problème.

3.1.4 Complexité liée à la multitude des caractéristiques physico-chimiques

La difficulté d'évaluer les effets des nanomatériaux sur la santé et l'environnement vient notamment du grand nombre de paramètres à prendre en compte. D'une part, il existe de multiples caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules comme leur dimension, forme, structure, état de charge, degré d'agglomération, composition, solubilité, qui varient elles-mêmes selon les conditions dans lesquelles les nanoparticules sont synthétisées, stockées, éventuellement enrobées, intégrées dans un produit puis relarguées dans l'environnement. D'autre part, ces nanomatériaux, ou leurs résidus, peuvent entrer en contact avec différents êtres vivants végétaux, animaux, micro-organismes, et autres substances chimiques. Dans notre étude les formulations cosmétiques complexes incorporant des nanoparticules sont des milieux différents des nanoparticules brutes ou extraites, mises en suspension dans le milieu biologique. Nous avons cependant fait varier un minimum les paramètres en exposant par exemple les formulations et les suspensions aux cellules de la même manière, après agitation et homogénéisation aux ultrasons. De plus, les deux types de nanoparticules utilisées sont des nanoparticules de TiO_2 similaires en terme de taille, et ne différant que par leur état de surface. Nous nous sommes donc efforcés de minimiser les paramètres variables liés à la nature des particules.

3.2 Importance du traitement de surface

3.2.1 Evolution physico-chimique

Un élément s'est avéré central dans notre étude : le traitement de surface des nanoparticules de TiO_2. Les revêtements de surface qui réduisent le risque de photo-activité d'une part et facilitent la formulation d'autre part, sont fondamentaux dans la fabrication d'écrans solaires. Des problèmes peuvent se poser si les particules ne sont pas traitées avec des revêtements inertes, si les revêtements ne sont pas stables (Brezová *et al.* 2005).

Dans notre travail, nous avons mis en évidence des modifications superficielles des nanoparticules traitées en surface, au sein d'une formulation cosmétique. Les techniques que nous avons mises en œuvre ont permis de conclure à une adsorption forte de certains composés de la formulation à la surface de ces nanoparticules, et non à une dégradation des couches de passivation et organique du traitement de surface. On a également pu constater une modification de la valeur du potentiel zêta des nanoparticules extraites mesuré par rapport aux valeurs de potentiel zêta des nanoparticules brutes. Les analyses infrarouges et XPS nous ont permis de conclure à l'adsorption à la surface des particules de composés organiques, comme le cetearylethylhexanoate utilisé en tant qu'émollient majoritaire dans la phase grasse de l'émulsion de la formulation et ce, sans modification fondamentale des traitements de surface (dont la composition élémentaire ne varie pas). Cette adsorption induit des effets

toxiques pour les nanoparticules extraites de formulations, d'autant plus marqués qu'elles sont vieillies.

D'autres auteurs ont par contre mis en évidence une modification, au cours d'un vieillissement, de la surface de nanoparticules de TiO_2 revêtues, interprétée comme une dégradation du traitement de surface. Il a été montré par exemple que le chlore des piscines pouvait dégrader le revêtement d'hydroxyde d'aluminium qui entoure les nanoparticules de dioxyde de titane intégrées dans certaines crèmes solaires. Au contact de l'eau et sous l'effet de la lumière, le cœur du nanomatériau peut alors libérer des radicaux libres (Virkutyte, Al-Abed & Dionysiou 2012). De plus, comme on l'a déjà précisé p.55, il a été montré que le vieillissement artificiel sous l'effet de la lumière et de l'eau au fil du temps altère la couche de surface de polydimethylsiloxane des nanoparticules de TiO_2 et donc leurs propriétés en solution aqueuse (Auffan *et al.* 2010; Labille *et al.* 2010). Ce n'est pas ce que l'on observe dans le cas des nanoparticules étudiées au cours de notre travail. En effet, après une agitation des nanoparticules dans l'eau pendant plusieurs mois à la lumière, et à différents pH, les particules ne se dispersent pas en milieu aqueux et conservent leurs caractéristiques hydrophobes (données non présentées dans ce manuscrit). Les différents traitements de surface utilisés dans notre travail présentent donc des propriétés de résistance différentes de celles d'autres nanoparticules coatées différemment. Ceci est lié à la composition du revêtement employé ainsi que très probablement à la technique de greffage utilisée. Ces techniques sont assez détaillées dans la littérature (Kim *et al.* 2005; Chen & Yakovlev 2010; Kango *et al.* 2013), mais les caractéristiques du revêtement de surface et ses évolutions dans le temps le sont beaucoup moins (Gao *et al.* 2006) et surtout la stabilité de ce traitement de surface au cours d'un vieillissement thermique, ou mécanique. Ces différences de surface des nanoparticules peuvent être susceptibles d'induire des effets toxicologiques et écotoxiques très différents.

3.2.2 Impact toxicologique

Les différences dans le revêtement de l'oxyde métallique TiO_2 des nanoparticules brutes ont été confirmées par les analyses XPS. D'après nos mesures, ces nanoparticules ne présentent pas d'effet cytotoxique franc, et leur évolution en fonction de la concentration en nanoparticules est similaire pour chacun des traitements de surface utilisés. Toutefois, les NP2 brutes affectent davantage la croissance des MCF-7 que les NP1, les tests d'embryotoxicité et de génotoxicité donnant des résultats non significativement différents du contrôle dans les deux cas. Cette différence en termes de cytotoxicité est donc essentiellement liée aux traitements de surface distincts utilisés. On rappelle que les deux traitements de surface sont hydrophobes et sont distincts de par leur composition chimique : triethoxycaprylylsilane pour les NP1 et isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane pour les NP2 (Tableau 3 p.100). Le coating 2 est hybride et plus encombrant que le coating 1.

Le vieillissement en revanche, est à l'origine d'une activité toxique pour les NP2 extraites sans DMSO. Le vieillissement a donc un impact important sur les effets de toxicité observés. Cet effet peut être annulé, lors du protocole d'extraction, par un lavage au DMSO sous ultrasons. Cependant, il est important de préciser que les conditions dans lesquelles s'opèrent les protocoles d'extraction, en particulier le second, ne correspondent pas à un évènement naturel du cycle de vie des nanoparticules. Nous avons utilisé de techniques de lavages à l'aide de solvants organiques, ce qui est bien loin de conditions de lavage que pourrait subir la formulation solaire dans l'eau de mer. Si les particules se trouvent libérées de la formulation dans un contexte environnemental, leur surface comporte donc très probablement des ingrédients de la formulation ; par conséquent d'après nos résultats les particules auront une activité embryotoxique et cytotoxique plus importante. Cependant, l'étude de Fisichella *et al.* 2012 qui s'est intéressée au devenir des nanoparticules commercialisées, et dégradées par des conditions environnementales, sur les cellules épithéliales intestinales humaines, montre au contraire que les nanoparticules de TiO_2 utilisés dans les formulations solaires ne présentent pas de toxicité aiguë à faibles concentration (jusqu'à 100 mg/L). Les nanoparticules de TiO_2, revêtues d'$Al(OH)_3$ et de polydimethylsiloxane ont été soumises au vieillissement sous une exposition UV ayant pour but de simuler une dégradation environnementale et en milieu acide pour une dégradation gastro-intestinale : aucun effet toxique pour trois tests de toxicité réalisés (test au bleu de trypan, mesures d'ATP intracellulaire et test XTT) n'ont été observés. De plus, la morphologie cellulaire est restée intacte, ce qui a été attesté par SEM, et la pénétration des nanoparticules n'a pas été observée par TEM. Ils avancent l'hypothèse que la couche d'hydroxyde d'aluminium protège les cellules d'un contact direct avec le noyau de TiO_2 potentiellement phototoxique. Ces nanoparticules, contrairement à celles utilisées dans notre étude n'ont pas le même traitement de surface organique, n'ont pas été intégrées dans une émulsion et ne sont pas vieillies dans les mêmes conditions.

Pour résumer, nous avons observé dans notre travail que la formulation cosmétique sans et avec nanoparticules présente un effet cytotoxique à hautes concentrations. Les nanoparticules extraites de ces formulations ont également des effets cytotoxique et embryotoxique, qui varient en fonction des caractéristiques de surface. Cependant, lorsqu'on procède à une extraction optimisée de ces nanoparticules, les résultats de leur évaluation cytotoxique redeviennent similaires à ceux des nanoparticules brutes de départ. On a donc observé une modulation toxique liée à l'effet de surface et due à l'adsorption des composés de la formulation cosmétique sans pour autant identifier ces composés. Les modifications de surface apparues ne sont donc pas donc dans ce cas liées à une dénaturation du traitement de surface seule, comme cela a été montré dans des récentes études (Auffan *et al.* 2010; Virkutyte, Al-Abed & Dionysiou 2012) mais plutôt à une adsorption de composés toxiques.

La caractérisation des états et des propriétés de surface s'est avérée fondamentale dans le cadre de nos travaux. Ainsi, le revêtement des nanoparticules de TiO_2 apparaît indispensable pour protéger les cellules de la toxicité de cet oxyde métallique (Dunford, Salinaro & Cai 1997; Uchino *et al.* 2002; Tedja *et al.* 2011; Fisichella *et al.* 2012). Néanmoins, ces traitements induisent l'adsorption de composés potentiellement toxiques du milieu de formulation et, dans certains cas, de manière augmentée avec le vieillissement du revêtement.

Pour les nanoparticules de TiO_2 de grade cosmétique, le traitement de surface apparaît comme le paramètre déterminant pour les effets biologiques des nanoparticules, plus important encore que les effets liés à la dimension nanométrique, conformément aux conclusions déjà obtenues par des études récentes sur des nanoparticules de nature différente (Tiano *et al.* 2010; Uchino, Ikarashi & Nishimura 2011; Hamzeh & Sunahara 2013).

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons élaboré des formulations cosmétiques type crèmes solaire selon un protocole réalisé à l'échelle du laboratoire, en s'inspirant des caractéristiques des crèmes solaires huile-dans-eau commerciales et contenant deux types de nanoparticules de TiO_2, différant par leur traitement de surface. Ce procédé de formulation nous a permis d'intégrer des nanoparticules de TiO_2 différant par le pourcentage d'incorporation (de 2,5 à 10%) ou par leur traitement de surface (coating 1 (triethoxycaprylylsilane), et coating 2 (isopropyl titanium triisostearate/ triethoxycaprylylsilane)).

La microstructure des émulsions avec ou sans nanoparticules, a été étudiée à l'aide des techniques d'analyses telles que la rhéologie, la microscopie, la granulométrie et les mesures de potentiel zêta. Les informations importantes à retenir sont que les émulsions avec nanoparticules ont un comportement structural dépendant du traitement de surface du dioxyde de titane utilisé, lié à sa composition chimique de surface. L'addition de nanoparticules contribue à une plus grande résistance à la déformation du réseau de l'émulsion, sans que sa structure soit pour autant altérée. De plus, à partir d'un pourcentage élevé de particules au sein de l'émulsion les paramètres rhéologiques et granulométriques sont très différents de la formulation sans nanoparticules.
L'évolution des émulsions a été suivie dans le temps : les phénomènes de déstabilisation identifiés pour les différentes formulations varient en fonction de la présence de nanoparticules ou non : on observe respectivement un phénomène d'agrégation de particules colloïdales, ou une coalescence des gouttelettes.
Enfin, il apparaît que les nanoparticules extraites d'une formulation, fraîche ou vieillie, présentent une surface modifiée par rapport aux nanoparticules brutes de départ. Ceci est dû à l'adsorption de composés organiques de la formulation à la surface de la nanoparticule.

L'analyse des effets biologiques des différents systèmes caractérisés, sur lignées cellulaires humaines a montré que les formulations utilisées sont légèrement cytotoxiques.
La présence de nanoparticules dans les formulations modifie peu la réponse biologique et l'effet cytotoxique est significativement augmenté pour les plus fortes concentrations en nanoparticules. Le vieillissement accentue légèrement la toxicité des formulations sans nanoparticules et intensifie l'effet de l'exposition aux formulations incorporant un fort pourcentage de nanoparticules de coating 2. Les nanoparticules brutes n'ont pas d'effet cytotoxique franc, la toxicité observée pour les nanoparticules extraites est provoquée par l'adsorption de constituants des formulations sur les nanoparticules. L'état de surface résultant du protocole d'extraction a une grande influence sur la toxicité des nanoparticules extraites.

Nous avons montré que des produits similaires à des crèmes commercialisées contenant des nanoparticules de TiO_2 modifiées en surface subissent des évolutions physico-

chimiques différentes en fonction de leur formulation et de leur proportion en nanoparticules. Nous avons également vu que ces nanoparticules se modifiaient au fil du temps, au cours de leur vieillissement, en adsorbant des composés de la formulation : leur état de surface s'est ainsi avéré un paramètre crucial dans l'évaluation de leur toxicité. Ces nanoparticules modifiées sont en effet plus toxiques que les nanoparticules de départ. Les mécanismes de vieillissement peuvent donc libérer des résidus de nanomatériaux avec une certaine activité toxique dans l'environnement et ainsi conduire à une exposition de l'homme et de l'environnement.

La caractérisation des nanoparticules reste à explorer sur de nombreux autres aspects. Nous avons été dans notre travail confrontés à des systèmes d'émulsions très complexes où il a été impossible de corréler les effets toxicologiques observés à un paramètre physico-chimique en particulier. Il pourrait être intéressant de suivre un paramètre spécifique, comme la déformation critique en rhéologie, le diamètre de Sauter en granulométrie ou un ingrédient chimique déterminé, et de le mettre en parallèle avec des effets toxiques observés en faisant varier de manière contrôlée les autres paramètres physico-chimiques. D'autres techniques d'analyses nous apporteraient également davantage d'informations associées aux mécanismes de déstabilisation, comme la microscopie TEM adaptée pour les systèmes d'émulsions, ou la spectroscopie acoustique, une méthode non destructive et non intrusive pour mesurer les propriétés de suspensions denses en conservant leur état de dispersion. D'autre part, les nanoparticules extraites pourraient être davantage caractérisées en utilisant des techniques, telle que l'AFM, qui permettraient de caractériser la topographie de la surface des nanoparticules en fonction des constituants présents.

D'un point de vue biologique, les effets toxiques des particules et formulations que nous avons observés pourraient être recherchés par exemple au niveau de perturbations du cycle et de la mort cellulaire. Les interactions entre les différents systèmes et les cellules pourraient être par exemple suivies en microscopie et en cytométrie afin de mettre en évidence les évènements de phagocytose et de trafic intra et extracellulaire. Des effets de la production cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pourraient être également recherchés.

Plus généralement, la caractérisation des nanoparticules en milieu biologique constitue à elle seule un sujet à part entière afin de comprendre quelle propriété est réellement mesurée lors des analyses de toxicité. On l'a vu, une difficulté de l'évaluation des nanoparticules demeure dans la possibilité d'interférences des substances testées avec les milieux biologiques. Il est important de pouvoir tenir compte des phénomènes de sédimentation et d'agglomération des particules.

Enfin, une question essentielle concerne le devenir des nanomatériaux de TiO_2 incorporés dans des crèmes solaires dans un scénario de relargage dans les eaux de baignade. Cela n'a été que très peu développé dans la littérature actuelle alors que l'environnement aquatique (micro-organismes, algues, invertébrés, poissons) est un acteur directement exposé. Il serait intéressant dans la suite de ce travail par exemple d'exposer des organismes aquatiques aux formulations vieillies ou aux nanoparticules extraites, afin d'observer si les résultats concordent avec ceux observés en embryotoxicité.

Ces problématiques restent à l'heure actuelle encore peu documentées car les industriels ne sont pas tenus de divulguer les caractéristiques précises des particules utilisées dans les crèmes solaires mises sur le marché, alors que l'utilisation de nanoparticules dans les cosmétiques est de plus en plus courante. Cette utilisation pose non seulement un défi réglementaire pour les industriels mais aussi des interrogations quant à leur innocuité au sein des produits de soin. Il est aujourd'hui nécessaire d'apporter des éléments de recherche permettant de développer ces produits pour lesquels les nanoparticules apportent réellement un bénéfice bien supérieur aux risques potentiels. Une étroite collaboration de chercheurs de différents domaines tels que écotoxicologues, biologistes, micro-biologistes, chimistes, physiciens, spécialistes des matériaux, ainsi que de l'industrie s'avère généralement très précieuse dans ces études.

Communications

Publication

Rossano, M., Hucher, N., Picard, C., Coletta, D., Le Foll, F. & Grisel, M. (2014) Effects of aging on structure and stability of TiO_2 nanoparticle containing oil-in-water emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, **461**, 89–96 (voir Annexes p.267)

Communication par affiche

Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie 2011, *31 Mai 2011, Le Havre*

Use of nanoparticles in cosmetic formulations: Stability and Impact on Environment and Human Health

Communications orales

Journée de l'Ecole Doctorale Normande de Chimie 2012, *12 juin 2012, Rouen*

Titanium dioxide nanoparticles in cosmetic sunscreen: consequences of accelerated aging formulation

NANOSAFE 2012 - International conference on safe production and use of nanomaterials, *13-15 Novembre 2012, Grenoble*

TiO_2 nanoparticles in cosmetic sunscreen: effect of aging on physico-chemical and cytotoxic properties of both plain formulation and extracted nanoparticles

Références

Adams, L.K., Lyon, D.Y. & Alvarez, P.J.. (2006) Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO2, SiO2, and ZnO water suspensions. *Water research*, **40**, 3527–3532.

Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail. (2006) *Les Nanomatériaux. Effets Sur La Santé de L'homme et Sur L'environnement*.

Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. (2012) *Evaluation Du Risque Lié À L'utilisation Du Phénoxyéthanol Dans Les Produits Cosmétiques*.

Alba, F., Crawley, G.M., Fatkin, J., Higgs, D.M.J. & Kippax, P.G. (1999) Acoustic spectroscopy as a technique for the particle sizing of high concentration colloids, emulsions and suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **153**, 495–502.

Allouni, Z.E., Cimpan, M.R., H\ol, P.J., Skodvin, T. & Gjerdet, N.R. (2009) Agglomeration and sedimentation of TiO2 nanoparticles in cell culture medium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **68**, 83–87.

American Society for Testing and Materials. (1994) Standard Guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs.

Andersen, M.E. & Barton, H.A. (1998) The Use of Biochemical and Molecular Parameters to Estimate DoseResponse Relationships at Low Levels of Exposure. *Environmental Health Perspectives*, **106**, 349–355.

Andre, V. & Brotzman, R. Cosmetic formulations comprising ZnO nanoparticles.

André, V., Willenbacher, N., Debus, H., Börger, L., Fernandez, P., Frechen, T. & Rieger, J. (2003) Prediction of emulsion stability: facts and myth. *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide 102Y109*.

Arditty, S. (2004) *Fabrication, Stabilité et Propriétés Rhéologiques Des Émulsions Stabilisées Par Des Particules Colloïdales*. Université Sciences et Technologies-Bordeaux I.

Armand, L. (2011) *Effet Des Nanoparticules de Dioxyde de Titane Sur Les Métalloprotéases, Influence Des Paramètres Physicochimiques*. AgroParisTech.

Armstrong, B.K. & Kricker, A. (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **63**, 8–18.

Aubry, Sebag & Deroo. (2006) *Formulation Cosmétique: Matières Premières, Concepts et Procédés Innovants*. EDP Sciences.

Auffan, M., Pedeutour, M., Rose, J., Masion, A., Ziarelli, F., Borschneck, D., Chaneac, C., Botta, C., Chaurand, P. & Labille, J. (2010) Structural degradation at the surface of a TiO2-based nanomaterial used in cosmetics. *Environmental science and technology*, **44**, 2689–2694.

Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.-P. & Wiesner, M.R. (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, **4**, 634–641.

Avenel-Audran, M., Dutartre, H., Goossens, A., Jeanmougin, M., Comte, C., Bernier, C., Benkalfate, L., Michel, M., Ferrier-Lebouëdec, M.C. & Vigan, M. (2010) Octocrylene, an emerging photoallergen. *Archives of dermatology*, **146**, 753.

Azouz, K.B. (2010) *Relation Entre Propriétés Rhéologiques et Structure Microscopique de Dispersions de Particules D'argile Dans Des Dispersions de Polymères*. Université de Haute Alsace-Mulhouse.

Baer, D.R., Gaspar, D.J., Nachimuthu, P., Techane, S.D. & Castner, D.G. (2010) Application of surface chemical analysis tools for characterization of nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **396**, 983–1002.

Baiju, K.V., Shukla, S., Biju, S., Reddy, M.L.P. & Warrier, K.G.K. (2009) Morphology-Dependent Dye-Removal Mechanism as Observed for Anatase-Titania Photocatalyst. *Catalysis Letters*, **131**, 663–671.

Bąk, A. & Podgórska, W. (2013) Drop breakage and coalescence in the toluene/water dispersions with dissolved surface active polymers PVA 88% and 98%. *Chemical Engineering Research and Design*.

Bally, R. & Barouki, R. (2010) *Rapport Du Groupe de Travail Sur La Stratégie Nationale de Recherche En Toxicologie et En Écotoxicologie, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La Recherche*.

Bancroft, W.D. (1913) The theory of emulsification, V. *The Journal of Physical Chemistry*, **17**, 501–519.

Bandyopadhyay, R. & Sood, A.K. (2005) Effect of silica colloids on the rheology of viscoelastic gels formed by the surfactant cetyl trimethylammonium tosylate. *Journal of Colloid and Interface Science*, **283**, 585–591.

Bang, S.H., Le, T.-H., Lee, S.K., Kim, P., Kim, J.S. & Min, J. (2011) Toxicity Assessment of Titanium (IV) Oxide Nanoparticles Using Daphnia magna (Water Flea). *Environmental Health and Toxicology*, **26**.

Barnes, H.A. (1994) Rheology of emulsions—a review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **91**, 89–95.

Baron, M., Purcell, W.M., Jackson, S.K., Owen, S.F. & Awadesh, N.J. (2012) Towards a more representative in vitro method for fish ecotoxicology: morphological and biochemical characterisation of three-dimensional spheroidal hepatocytes. *Ecotoxicology*, **21**, 2419–2429.

Al-Bawab, A. & Friberg, S.E. (2006) Some pertinent factors in skin care emulsion. *Advances in colloid and interface science*, **123**, 313–322.

Beiras, R. & Albentosa, M. (2004) Inhibition of embryo development of the commercial bivalves Ruditapes decussatus and Mytilus galloprovincialis by trace metals; implications for the implementation of seawater quality criteria. *Aquaculture*, **230**, 205–213.

Bejar, J., Borrego, J.J. & Alvarez, M.C. (1997) A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (< i> Sparus aurata</i> L.). *Aquaculture*, **150**, 143–153.

Bendová, H., Akrman, J., Krejčí, A., Kubáč, L., Jírová, D., Kejlová, K., Kolářová, H., Brabec, M. & Malý, M. (2007) In vitro approaches to evaluation of Sun Protection Factor. *Toxicology in Vitro*, **21**, 1268–1275.

Benn, T.M., Westerhoff, P. & Herckes, P. (2011) Detection of fullerenes (C60 and C70) in commercial cosmetics. *Environmental Pollution*, **159**, 1334–1342.

Bennat, C. & Muller-Goymann, C.C. (2000) Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter. *International journal of cosmetic science*, **22**, 271–284.

Bhatt, N., Prasad, R.K., Singh, K. & Panpalia, G.M. (2010) Stability study of O/W emulsions using zeta potential. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2**, 512–527.

Binks, B.P., Desforges, A. & Duff, D.G. (2007) Synergistic Stabilization of Emulsions by a Mixture of Surface-Active Nanoparticles and Surfactant. *Langmuir*, **23**, 1098–1106.

Birnbaum, L. (1994) The Mechanism of Dioxin Toxicity: Relationship to Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, **102**.

Borm, P.J.., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann, J. & others. (2006) The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, **3**, 11.

Botta, C., Labille, J., Auffan, M., Borschneck, D., Miche, H., Cabié, M., Masion, A., Rose, J. & Bottero, J.Y. (2011) TiO2-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: Structures and quantities. *Environmental Pollution*, 1543–1550.

Braydich-Stolle, L.K., Schaeublin, N.M., Murdock, R.C., Jiang, J., Biswas, P., Schlager, J.J. & Hussain, S.M. (2008) Crystal structure mediates mode of cell death in TiO2 nanotoxicity. *Journal of Nanoparticle Research*, **11**, 1361–1374.

Brezová, V., Gabčová, S., Dvoranová, D. & Staško, A. (2005) Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an EPR study). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **79**, 121–134.

Briant, J. (1989) *Phénomènes D'interface - Agents de Surface, Principes et Modes D'action*, Technip. Ecole nationale supérieure du pétrole et des moteurs.

Brochette, P. (1999) *Emulsification - Elaboration et Etude Des Émulsions*. Techniques de l'Ingénieur.

Buchalska, M., Kras, G., Oszajca, M., Lasocha, W. & Macyk, W. (2010) Singlet oxygen generation in the presence of titanium dioxide materials used as sunscreens in suntan lotions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **213**, 158–163.

Burrows, S.P. (2010) *Infrared Spectroscopic Measurement of Titanium Dioxide Nanoparticle Shallow Trap State Energies*. Virginia Polytechnic Institute and State University.

Butz, T. (2007) *Quality of Skin as a Barrier to Ultra-Fine Particles*. Nanoderm.

Calabrese, E. (2005) Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environmental Pollution*, **138**, 379–412.

Candi, Schmidt & Melino. (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 328–340.

Canesi, L., Ciacci, C., Vallotto, D., Gallo, G., Marcomini, A. & Pojana, G. (2010) In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO2, SiO2) on Mytilus hemocytes. *Aquatic Toxicology*, **96**, 151–158.

Canselier, J.P. & Poux, M. (2004) *Procédés D'émulsification - Mécanismes de Formation Des Émulsions*. Techniques de l'Ingénieur.

Carrot, C. (1999) *Viscoélasticité Linéaire Des Polymères Fondus*. Ed. Techniques Ingénieur.

Casals, Vasquez-Campos, Bastus & Puntes. (2009) Distribution and potential toxicity of engineered inorganic nanoparticles and carbon nanostructures in biological systems. *Nanotoxicology*, **3**, 46–59.

Caswell, M. (2001) Sunscreen Formulation and Testing. *Cosmetics and Toiletries magazine*, **116**.

Chanamai, R. & McClements, D.J. (2000) Dependence of creaming and rheology of monodisperse oil-in-water emulsions on droplet size and concentration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **172**, 79–86.

Chaudhuri, R.K. & Majewski. (1998) Amphiphilic microfine titanium dioxide: Its properties and application in sunscreen formulations. *Drug and Cosmetic Industry*, **162**, 24–31.

Chaudhuri, R.K. & Majewski. (2000) Sprayable Sunscreen Compositions.

Chen, L.L., Tooley, I. & Wang, S.Q. (2012) Nanotechnology in Photoprotection. *Nanotechnology in Dermatology*, Springer.

Chen, Q. & Yakovlev, N.L. (2010) Adsorption and interaction of organosilanes on TiO2 nanoparticles. *Applied Surface Science*, **257**, 1395–1400.

Colquhoun, D. (1998) Binding, gating, affinity and efficacy: The interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *British Journal of Pharmacology*, **125**, 923–947.

Contado, C. & Pagnoni, A. (2008) TiO2 in commercial sunscreen lotion: Flow field-flow fractionation and ICP-AES together for size analysis. *Analytical chemistry*, **80**, 7594–7608.

Coussot, P. & Grossiord, J.-L. (2002) *Comprendre La Rhéologie: De La Circulation Du Sang À La Prise Du Béton*, EDP Sciences.

Couteau, C., Chammas, R., Alami-El Boury, S., Choquenet, B., Paparis, E. & Coiffard, L.J.M. (2008) Combination of UVA-filters and UVB-filters or inorganic UV filters—Influence on the sun protection factor (SPF) and the PF-UVA determined by in vitro method. *Journal of Dermatological Science*, **50**, 159–161.

Danovaro, R., Bongiorni, L., Corinaldesi, C., Giovannelli, D., Damiani, E., Astolfi, P., Greci, L. & Pusceddu, A. (2008) Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. *Environmental Health Perspectives*.

Darnajoux, R., Constantin, J., Miadlikowska, J., Lutzoni, F. & Bellenger, J. (2014) Is vanadium a biometal for boreal cyanolichens? *New Phytologist Trust*, **202**, 765–771.

Decker & Lohmann-Matthes. (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, **115**, 61–69.

Delrieu, P. & Shao, Y. Particle Size Measurement of attenuation grade titanium dioxide in dispersion and in sunscreen lotion.

Dickinson, E. (1992) Interfacial interactions and the stability of oil-in-water emulsions. *Pure and applied chemistry*, **64**, 1721–1721.

Domingos, R.F., Tufenkji, N. & Wilkinson, K.J. (2009) Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid. *Environmental Science & Technology*, **43**, 1282–1286.

Doumeix, O. (2011) *Opérations Unitaires En Génie Biologique. Tome 1: Les Émulsions*. CRDP d'Aquitaine.

Dransfield, G., Guest, P., Lyth, P., McGarvey, D. & Truscott, T. (2000) Photoactivity tests of TiO2-based inorganic sunscreens:: Part 1: Non-aqueous dispersions. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **59**, 147–151.

Drobne, D., Jemec, A. & Pipan Tkalec, Ž. (2009) In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO2. *Environmental Pollution*, **157**, 1157–1164.

Dunford, R., Salinaro, A. & Cai, L. (1997) Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters*, **418**, 87–90.

Duprez, L., Wirawan, E., Berghe, T.V. & Vandenabeele, P. (2009) Major cell death pathways at a glance. *Microbes and Infection*, **11**, 1050–1062.

Durand, L., Habran, N., Henschel, V. & Amighi, K. (2009) In vitro evaluation of the cutaneous penetration of sprayable sunscreen emulsions with high concentrations of UV filters. *International journal of cosmetic science*, **31**, 279–292.

Dussert, A.S., Gooris, E. & Hemmerle, J. (1997) Characterization of the mineral content of a physical sunscreen emulsion and its distribution onto human stratum corneum. *International journal of cosmetic science*, **19**, 119–129.

Eccleston, G.M. (1990) Multiple-phase oil-in-water emulsions. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **41**, 1–22.

Eccleston, G.M. (1997) Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **123**, 169–182.

Egerton, T.A., Everall, N.J. & Tooley, I.R. (2005) Characterization of TiO2 Nanoparticles Surface Modified with Aluminum Stearate. *Langmuir*, **21**, 3172–3178.

Ehrenberg, M.S., Friedman, A.E., Finkelstein, J.N., Oberd\örster, G. & McGrath, J.L. (2009) The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells. *Biomaterials*, **30**, 603–610.

Ekwall, B. (1983) Screening of toxic compoiunds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **407**, 64–77.

El Yamani, M. & Seret, C. *La Toxicologie*. Affset.

El-Boury, S., Couteau, C., Boulande, L., Paparis, E. & Coiffard, L. (2007) Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method. *International Journal of Pharmaceutics*, **340**, 1–5.

Environment Agency. (2007) The direct toxicity assessment of aqueous environmental samples using the oyster (Crassostrea gigas) embryo-larval development test.

Etat Des Connaissances Relatif Aux Nanoparticules de Dioxyde de Titane et D'oxyde de Zinc Dans Les Produits Cosmétiques En Termes de Pénétration Cutanée, de Génotoxicité et de Cancérogenèse. (2011) Afssaps.

Euvananont, C., Junin, C., Inpor, K., Limthongkul, P. & Thanachayanont, C. (2008) TiO2 optical coating layers for self-cleaning applications. *Ceramics International*, **34**, 1067–1071.

Évaluation Des Risques Liés Aux Nanomatériaux Pour La Population Générale et Pour L'environnement. (2010) Afsset.

Evans, Casartelli, Herreros, Miinnick, Day, George & Westmoreland. (2001) Development of a high throughput in vitro toxicity screen predictive of high acute in vivo toxic potential. *Toxicology in Vitro*, **15**, 579–584.

FEBEA. (2009) Cahier d'acteur sur le développement et la régulation des nanotechnologies.

Fernadez, Merck & Kerdudo. (2012) *Conservateurs Pour Cosmétiques - Généralités et Conservateurs Antimicrobiens*. Techniques de l'Ingénieur.

Fernandez-Nieves, A. & De Las Nieves, F. (1999) The role of [zeta] potential in the colloidal stability of different TiO2/electrolyte solution interfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **148**, 231–243.

Finnegan, M.P., Zhang, H. & Banfield, J.F. (2007) Phase stability and transformation in titania nanoparticles in aqueous solutions dominated by surface energy. *Journal of Physical Chemistry C*, **111**, 1962–1968.

Fisichella, M., Berenguer, F., Steinmetz, G., Auffan, M., Rose, J. & Prat, O. (2012) Intestinal toxicity evaluation of TiO2 degraded surface-treated nanoparticles: a combined physico-chemical and toxicogenomics approach in caco-2 cells. *Part Fibre Toxicol*, **9**, 18.

Fitzgerald, K., Davies, A. & Russell, A.D. (1992) Effect of chlorhexidine and phenoxyethanol on cell surface hydrophobicity of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Mircrobiology*, **14**, 91–95.

Foltête, A.S., Masfaraud, J.F., Bigorgne, E., Nahmani, J., Chaurand, P., Botta, C., Labille, J., Rose, J., Férard, J.F. & Cotelle, S. (2011) Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO< sub> 2</sub> nanocomposites on< i> Vicia faba</i>. *Environmental Pollution*, **159**, 2515–2522.

Forestier, S. (2008) Rationale for sunscreen development. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **58**, S133–S138.

Forster, A.H. & Herrington, T.M. (1997) Rheology of siloxane-stabilized water in silicone emulsions. , **19**, 173–191.

Fouqueray, M., Dufils, B., Vollat, B., Chaurand, P., Botta, C., Abacci, K., Labille, J., Rose, J. & Garric, J. (2012) Effects of aged TiO2 nanomaterial from sunscreen on Daphnia magna exposed by dietary route. *Environmental Pollution*, **163**, 55–61.

Frelichowska, J. (2009) *Émulsions Stabilisées Par Des Particules Solides: Études Physico-Chimiques et Évaluation Pour L'application Cutanée.* Université Claude Bernard Lyon 1.

Fruijtier-Pölloth, C. (2005) Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. *Toxicology*, **214**, 1–38.

Fu, Zhang, Liang, Yang & Pan. (2002) The multidrug resistance of tumour cells was reversed by tetrandrine in vitro and in xenografts derived from human breast adenocarcinoma MCF-7/adr cells. *European Journal of Cancer*, **38**, 418–426.

Gamer, A.O., Leibold, E. & Van Ravenzwaay, B. (2006) The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin. *Toxicology in vitro*, **20**, 301–307.

Gao, J., Zou, J., Tan, X. & Wang, Y. (2006) Characteristics and properties of surface coated nano-Ti02. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 1252–1258.

Garoli, D., Pelizzo, M.G., Bernardini, B., Nicolosi, P. & Alaibac, M. (2008) Sunscreen tests: Correspondence between in vitro data and values reported by the manufacturers. *Journal of Dermatological Science*, **52**, 193–204.

Gee, P., Sommers, S.H., Melick, Gidrol, Todd, Burris, Nelson, Klemm & Zeiger. (1998) Comparison of responses of base-specific Salmonella tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study. *Mutation Research*, **412**, 115–130.

Gottschalk, F. & Nowack, B. (2011) The release of engineered nanomaterials to the environment. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**, 1145.

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W. & Nowack, B. (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO2, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*, **43**, 9216–9222.

Grassian, V.H. (2008) When Size Really Matters: Size-Dependent Properties and Surface Chemistry of Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Gas and Liquid Phase Environments. *Journal of Physical Chemistry C*, **0**, 0–0.

Gurr, J.R., Wang, A.S.S., Chen, C.H. & Jan, K.Y. (2005) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, **213**, 66–73.

Guzman, K.A.D., Finnegan, M.P. & Banfield, J.F. (2006) Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, **40**, 7688–7693.

Hamzeh, M. & Sunahara, G.I. (2013) In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. *Toxicology in Vitro*, **27**, 864–873.

Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H.-C. & Kahru, A. (2008) Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. *Chemosphere*, **71**, 1308–1316.

Hervé-Bazin, B. (2007) *Les Nanoparticules*, EDP Sciences.

Himics, R. & Pineiro, R. (1998) The Importance of Particle Size in Liquid Coatings : Products Finishing. *Products Finishing Magazine*.

His, E., Seaman, M.N.L. & Beiras, R. (1997) A simplification the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research*, **31**, 351–355.

Hsu, L.-Y. & Chein, H.-M. (2007) Evaluation of nanoparticle emission for TiO2 nanopowder coating materials. *Journal of Nanoparticle Research*, **9**, 157–163.

Hu, C.W., Li, M., Cui, Y.B., Li, D.S., Chen, J. & Yang, L.Y. (2010) Toxicological effects of TiO2 and ZnO nanoparticles in soil on earthworm Eisenia fetida. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**, 586–591.

Hughes, T.M. & Stone, N.M. (2007) Benzophenone 4: an emerging allergen in cosmetics and toiletries? *Contact dermatitis*, **56**, 153–156.

Hund-Rinke, K. & Simon, M. (2006) Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO2) on Algae and Daphnids (8 pp). *Environmental Science and Pollution Research - International*, **13**, 225–232.

Hyun, K., Kim, S.H., Ahn, K.H. & Lee, S.J. (2002) Large amplitude oscillatory shear as a way to classify the complex fluids. *Journal of non-newtonian fluid mechanics*, **107**, 51–65.

Iavicoli, I., Leso, V., Fontana, L. & Bergamaschi, A. (2011) Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of in vitro mammalian studies. *European review for medical and pharmacological sciences*, **15**, 481.

Ibanescu, C., Danu, M., Nanu, A., Lungu, M. & Simionescu, B.C. (2010) Stability of disperse systems estimated using rheological oscillatory shear tests. *Academia Romana. Rev. Roum. Chim*, **55**, 933–940.

Invitrogen. (2008) CellTracker™ Probes for Long-Term Tracing of Living Cells.

Isomaa, B. & Lilius, H. (1995) The urgent need for in vitro tests in ecotoxicology. *Toxicology in vitro*, **9**, 821–825.

Jacobasch, H.-J., Simon, F. & Weidenhammer, P. (1998) Adsorption of ions onto polymer surfaces and its influence on zeta potential and adhesion phenomena. *Colloid and Polymer Science*, **276**, 434–442.

Jacobs, J.F., Poel, I. & Osseweijer, P. (2010) Sunscreens with Titanium Dioxide (TiO2) Nano-Particles: A Societal Experiment. *NanoEthics*, **4**, 103–113.

Jha, A.N., Cheung, V.V., Foulkes, M.E., Hill, S.J. & Depledge, M.H. (2000) Detection of genotoxins in the marine environment: adoption and evaluation of an integrated approach using the embryo-larval stages of the marine mussel, Mytilus edulis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **464**, 213–228.

Jha, A.N., Hagger, J.A. & Hill, S.J. (2000) Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, Mytilus edulis. *Environmental Molecular Mutagen*, **35**, 343–350.

Jiang, J., Oberdörster, G. & Biswas, P. (2009) Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, **11**, 77–89.

Jiang, J., Oberdörster, G., Elder, A., Gelein, R., Mercer, P. & Biswas, P. (2008) Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? *Nanotoxicology*, **2**, 33–42.

Jin, C.-Y., Zhu, B.-S., Wang, X.-F. & Lu, Q.-H. (2008) Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. *Chemical Research in Toxicology*, **21**, 1871–1877.

Ju-Nam, Y. & Lead, J.R. (2008) Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, **400**, 396–414.

Kabalnov, A.S. & Shchukin, E.D. (1992) Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Advances in colloid and interface science*, **38**, 69–97.

Kamber, M., Fluckiger-Isler, S., Engelhardt, G., Jaeckh, R. & Zeiger, E. (2009) Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity. *Mutagenesis*, **24**, 359–366.

Kango, S., Kalia, S., Celli, A., Njuguna, J., Habibi, Y. & Kumar, R. (2013) Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. *Progress in Polymer Science*, **38**, 1232–1261.

Keck, C. & Müller, R.H. (2008) Size analysis of submicron particles by laser diffractometry—90% of the published measurements are false. *International journal of pharmaceutics*, **355**, 150–163.

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A. & Suh, S. (2013) Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, **15**, 1692.

Kim, T.K., Lee, M.N., Lee, S.H., Park, Y.C., Jung, C.K. & Boo, J.-H. (2005) Development of surface coating technology of TiO2 powder and improvement of photocatalytic activity by surface modification. *Thin Solid Films*, **475**, 171–177.

Kim, H.M., Oh, G.T., Hong, D.H., Kim, M.S., Kang, J.S., Park, S.M. & Han, S.B. (1997) MDR-1 gene expression is a minor factor in determining the multidrug resistance phenotype of MCF7/ADR and KB-V1 cells. *FEBS letters*, **412**, 201–206.

Kippax, P. (2005) Appraisal of the Laser Diffraction Particle-Sizing. *Pharmaceutical Technology*.

Kluck, Bossy-Wetzel, Green & Newmeyer. (1997) The Release of Cytochrome c from Mitochondria: A Primary Site for Bcl-2 Regulation of Apoptosis. *Science*, **275**, 1132–1136.

Kobo. (2012) Triethoxycaprylylsilane treatment. *Technical Literature*, **ref 11S-002**.

Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishikawa, T., Naito, Y. & Yoshikawa, T. (2010) Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **6**, 570–574.

Korhonen, M., Lehtonen, J., Hellen, L., Hirvonen, J. & Yliruusi, J. (2002) Rheological properties of three component creams containing sorbitan monoesters as surfactants. *International journal of pharmaceutics*, **247**, 103–114.

Korhonen, M., Niskanen, H., Kiesvaara, J. & Yliruusi, J. (2000) Determination of optimal combination of surfactants in creams using rheology measurements. *International journal of pharmaceutics*, **197**, 143–151.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P. & Green, D.R. (2008) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation*, **16**, 3–11.

Kroll, A., Pillukat, M.H., Hahn, D. & Schnekenburger, J. (2009) Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **72**, 370–377.

La Situation Du Cancer En France En 2012. (2012) Institut National du Cancer.

Labib, M. & Williams, R. (1984) The Use of Zeta-Potential Measurements in Organic Solvents to Determine the Donor-Acceptor Properties of Solid Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, **97**.

Labille, J., Feng, J., Botta, C., Borschneck, D., Sammut, M., Cabie, M., Auffan, M., Rose, J. & Bottero, J.Y. (2010) Aging of TiO2 nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environmental Pollution*, 3482–3489.

Lacroix & Leclercq. (2004) Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Research and Treatment*, **83**, 249–289.

Lance, M.R., Washington, C. & Davis, S.S. (1995) Structure and toxicity of amphotericin B/triglyceride emulsion formulations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **36**, 119–128.

Langenfeld, A., Schmitt, V. & Stébé, M.-J. (1999) Rheological Behavior of Fluorinated Highly Concentrated Reverse Emulsions with Temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, **218**, 522–528.

Lapied, E., Nahmani, J.Y., Moudilou, E., Chaurand, P., Labille, J., Rose, J., Exbrayat, J.M., Oughton, D.H. & Joner, E.J. (2011) Ecotoxicological effects of an aged TiO2 nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm Lumbricus terrestris after exposure through water, food and soil. *Environment international*, **37**, 1105–1110.

Latva-Nirva, Dahms, Jung & Fibrieg. (2009) Ultrafine titanium dioxide nanoparticles and dispersions thereof.

Launer, P. (1987) Analysis of organosilicon compounds: spectra-structure correlations. *Silicone Compounds Register and Review* B. Arkles et al Petrarch Systems.

Legrand, Bour, Jacob, Capiomont, Martial, Marc, Wudtke, Kretzmer, Demangel, Duval & Hache. (1992) Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. *Journal of Biotechnology*, **25**, 231–243.

Legrand, J., Chamerois, M., Placin, F., Poirier, J.E., Bibette, J. & Leal-Calderon, F. (2005) Solid Colloidal Particles Inducing Coalescence in Bitumen-in-Water Emulsions. *Langmuir*, **21**, 64–70.

Levenson, A.S. & Jordan, V.C. (1997) MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer research*, **57**, 3071–3078.

Lewicka, A., Benedetto, A.F., Benoit, D.N., Yu, W.W., Fortner, J.D. & Colvin, V.L. (2011) The structure, composition, and dimensions of TiO2 and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens. *Journal of Nanoparticle Research*, **13**, 3607–3617.

Li, Z., Hou, B., Xu, Y., Wu, D. & Sun, Y. (2005) Hydrothermal synthesis, characterization, and photocatalytic performance of silica-modified titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **288**, 149–154.

Liao, D.L., Wu, G.S. & Liao, B.Q. (2009) Zeta potential of shape-controlled TiO2 nanoparticles with surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **348**, 270–275.

Lingwood, I.A., Chandrasekera, T.C., Kolz, J., Fridjonsson, E.O. & Johns, M.L. (2012) Emulsion droplet sizing using low-field NMR with chemical shift resolution and the block gradient pulse method. *Journal of Magnetic Resonance*, **214**, 281–288.

Liu, S., Xu, L., Zhang, T., Ren, G. & Yang, Z. (2010) Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells. *Toxicology*, **267**, 172–177.

Liufu, S., Xiao, H. & Li, Y. (2005) Adsorption of poly(acrylic acid) onto the surface of titanium dioxide and the colloidal stability of aqueous suspension. *Journal of Colloid and Interface Science*, **281**, 155–163.

Lodish, H., Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky & Darnell. (2005) *Biologie Moléculaire de La Cellule*. de boeck.

Lorenz, C., Tiede, K., Tear, S., Boxall, A., Von Goetz, N. & Hungerbühler, K. (2010) Imaging and characterization of engineered nanoparticles in sunscreens by electron microscopy, under wet and dry conditions. *International journal of occupational and environmental health*, **16**, 406–428.

Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T. & Dawson, K.A. (2008) Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 14265.

Macwan, D.P., Dave, P.N. & Chaturvedi, S. (2011) A review on nano-TiO 2 sol–gel type syntheses and its applications. *Journal of materials science*, **46**, 3669–3686.

Manaia, E.B., Kaminski, R.C.K., Soares, C.P., Meneau, F., Pulcinelli, S.H., Santilli, C.V. & Chiavacci, L.A. (2012) Liquid crystalline formulations containing modified surface TiO2 nanoparticles obtained by sol–gel process. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*.

Mandzy, N., Grulke, E. & Druffel, T. (2005) Breakage of TiO2 agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder Technology*, **160**, 121–126.

Marinova, K.G., Alargova, R.G., Denkov, N.D., Velev, O.D., Petsev, D.N., Ivanov, I.B. & Borwankar, R.P. (1996) Charging of oil-water interfaces due to spontaneous adsorption of hydroxyl ions. *Langmuir*, **12**, 2045–2051.

Masmoudi, H., Dréau, Y.L., Piccerelle, P. & Kister, J. (2005) The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *International journal of pharmaceutics*, **289**, 117–131.

Menzel, F., Reinert, T., Vogt, J. & Butz, T. (2004) Investigations of percutaneous uptake of ultrafine TiO< sub> 2</sub> particles at the high energy ion nanoprobe LIPSION. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, **219**, 82–86.

Merkus. (2009) *Particle Size Measurements: Fundamentals, Practice, Quality*, Springer.

Money, C., Braungardt, C.B., Jha, A.N., Worsfold, P.J. & Achterberg, E.P. (2011) Metal speciation and toxicity of Tamar Estuary water to larvae of the Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Marine Environmental Research*, **72**, 3–12.

Monga, J., Pandit, S., Chauhan, C.S. & Sharma, M. (2013) Cytotoxicity and apoptosis induction in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by (+)-cyanidan-3-ol. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **65**, 1091–1100.

Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O. & Zhang, L.W. (2009) Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and applied pharmacology*, **234**, 222–235.

Moore, M.N. (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment international*, **32**, 967–976.

De Morais, J.M., dos Santos, O.D.H., Delicato, T. & da Rocha-Filho, P.A. (2006) Characterization and Evaluation of Electrolyte Influence on Canola Oil/Water Nano-Emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **27**, 1009–1014.

More, B.D. (2007) Physical sunscreens: On the comeback trail. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, **73**, 80.

Mori, Y., Okastu, Y. & Tsujimoto, Y. (2001) Titanium dioxide nanoparticles produced in water-in-oil emulsion. *Journal of Nanoparticle Research*, **3**, 219–225.

Moyal, D., Chardon, A. & Kollias, N. (2000) UVA protection efficacy of sunscreens can be determined by thepersistent pigment darkening (PPD) method. *Photodematology, Photoimmunology & Photomedicine*, **16**, 250–255.

Mueller, N.C. & Nowack, B. (2008) Exposure Modeling of Engineered Nanoparticles in the Environment. *Environmental Science & Technology*, **42**, 4447–4453.

Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A.M., Schlager, J.J. & Hussain, S.M. (2008) Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological sciences*, **101**, 239–253.

Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen. (2010) Environmental Protection Agency, United States.

Nasu, A. & Otsubo, Y. (2008) Effects of polymeric dispersants on the rheology and UV-protecting properties of complex suspensions of titanium dioxides and zinc oxides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **326**, 92–97.

Nearn, Redshaw & Burgess. (1996) Titanium Dioxide-based Sunscreen compositions.

Nel, A. (2006) Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, **311**, 622–627.

Newman, M.D., Stotland, M. & Ellis, J.I. (2009) The safety of nanosized particles in titanium dioxide-and zinc oxide-based sunscreens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **61**, 685–692.

Nguyen, T., Clare, B., Guo, W. & Martinac, B. (2005) The effects of parabens on the mechanosensitive channels of E. coli. *European Biophysics Journal*, **34**, 389–395.

Nischwitz, V. & Goenaga-Infante, H. (2012) Improved sample preparation and quality control for the characterisation of titanium dioxide nanoparticles in sunscreens using flow field flow fractionation on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **27**, 1084–1092.

Oberdörster, G. (2001) Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **74**, 1–8.

Oberdörster, G., Oberdörster, E. & Oberdörster, J. (2005) Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*, **113**, 823–839.

Occupational Exposure to Titanium Dioxide. (2011) National Institute for Occupational Safety and Health.

OECD Guideline 487 for the testing of chemicals - In Vitro Micronucleus Test. (2004)

Ohshima, H. (2012) Electrophoretic mobility of charged particles. *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces: Fundamentals and Applications in Nano-, Bio-, and Environmental Sciences* Wiley.

Okuda-Shimazaki, J., Takaku, S., Kanehira, K., Sonezaki, S. & Taniguchi, A. (2010) Effects of Titanium Dioxide Nanoparticle Aggregate Size on Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 2383–2392.

Van Oss, C.J. (1993) Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **78**, 1–49.

Pal, R. (2004) Effect of droplet size on the rheology of emulsions. *Materials, Interfaces, and Electrochemical Phenomena*, **42**, 3181–3190.

Palomäki, J., Karisola, P., Pylkkänen, L., Savolainen, K. & Alenius, H. (2010) Engineered nanomaterials cause cytotoxicity and activation on mouse antigen presenting cells. *Toxicology*, **267**, 125–131.

Pasquier, J. (2011) *Mécanismes et Résistance Multidrogue Par Transfert Extragénétique de La P-Glycoprotéine et Modulation Du Volume Cellulaire*. Université du Havre.

Pasquier, J., Galas, L., Boulange-Lecomte, C., Rioult, D., Bultelle, F., Magal, P., Webb, G. & Le Foll, F. (2012) Different Modalities of Intercellular Membrane Exchanges Mediate Cell-to-cell P-glycoprotein Transfers in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 7374–7387.

Pasquier, J., Magal, P., Boulangé-Lecomte, C., Webb, G. & Le Foll, F. (2011) Consequences of cell-to-cell P-glycoprotein transfer on acquired multidrug resistance in breast cancer: a cell population dynamics model. *Biology direct*, **6**, 5.

Pellegrino, P., Videen, G. & Pinnick, R.G. (1997) Quantitative light-scattering angular correlations of conglomerate particles. *Applied optics*, **36**, 7672–7677.

Petrazzuoli, M. (2000) Advances in Sunscreens. *Curr Probl Dermatol*, **12**, 287–290.

Pichot, R., Spyropoulos, F. & Norton, I.T. (2010) O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: The effect of surfactant type and concentration. *Journal of colloid and interface science*, **352**, 128–135.

Pluchery, O. & Carrière, M. (2011) *Nanoparticules D'or*. Techniques de l'Ingénieur.

Pohjala, L., Tammela, P., Samanta, S.K., Yli-Kauhaluoma, J. & Vuorela, P. (2007) Assessing the data quality in predictive toxicology using a panel of cell lines and cytotoxicity assays. *Analytical Biochemistry*, **362**, 221–228.

Popov, A., Priezzhev, A., Lademann, J. & Myllylä, R. (2005) TiO2 nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **38**, 2564–2570.

Quillardet, P. & Hofnung, M. (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, **147**, 65–78.

Rambhau, D., Phadke & Dorle. (1977) Evaluation of O/W emulsion stability through zeta potential-I. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **28**, 183–196.

RAPPORT Afsset «Nanomatériaux et Sécurité Au Travail ». (2008)

Rapport D'évaluation de La Sécurité Des Produits Cosmétiques Destinés Aux Enfants de Moins de Trois Ans. (2010) Afssaps.

Ravera, F., Ferrari, M., Liggieri, L., Loglio, G., Santini, E. & Zanobini, A. (2007) Liquid–liquid interfacial properties of mixed nanoparticle–surfactant systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*.

Recommandation de la commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux. (2011) *Journal officiel de l'Union européenne*.

Recommandations Aux Fabricants Ou Aux Responsables de La Mise Sur Le Marché Relatives À L'évaluation de La Sécurité Pour La Santé Humaine D'un Ingrédient Ou D'une Combinaison D'ingrédients À Usage Cosmétique. Afssaps.

Reeves, J.F., Davies, S.J., Dodd, N.J.F. & Jha, A.N. (2008) Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **640**, 113–122.

Règlement (CE) N° 1223/2009 du Parlement européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques. (2009) *Journal officiel del'Union européenne*, 59–208.

Ricaud, M. & Witschger, O. (2012) *Les Nanomatériaux. Définitions, Risques Toxicologiques, Caractérisation de L'exposition Professionnelle et Mesures de Prévention*. INRS.

Ridley, M.K., Hackley, V.A. & Machesky, M.L. (2006) Characterization and surface-reactivity of nanocrystalline anatase in aqueous solutions. *Langmuir*, **22**, 10972–10982.

Riefler, N., Schuh, R. & Wriedt, T. (2007) Investigation of a measurement technique to estimate concentration and size of inclusions in droplets. *Measurement Science and Technology*, **18**, 2209–2218.

Rieger, M. (1991) Stability testing of macroemulsions (to predict shelf life). *Cosmetics and Toiletries*.

Rieger, M. & Rhein, L.D. (1997) *Surfactants in Cosmetics*.

Roche. (2006) Cell proliferation reagent WST-1.

Rodriguez Rojas, M.P. (2007) *Emulsification En Cuve Agitée: Rôle Du Protocole Opératoire Sur l'Inversion de Phase Catastrophique*.

Roduner, E. (2006) Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, **35**, 583.

Roland, I. (2003) Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *International Journal of Pharmaceutics*, **263**, 85–94.

Rothen-Rutishauser, B., Mühlfeld, C., Blank, Musso & Gehr. (2007) Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model - Springer. *Particle and Fibre Toxicology*.

Sadrieh, Wokovich, Gopee & Haines. (2010) Lack of Significant Dermal Penetration of Titanium Dioxide from Sunscreen Formulations Containing Nano- and Submicron-Size TiO2 Particles. *Toxicological sciences*, **115**, 156–166.

Sager, T.M. & Castranova, V. (2009) Surface area of particle administered versus mass in determining the pulmonary toxicity of ultrafine and fine carbon black: comparison to ultrafine titanium dioxide. *Part Fibre Toxicol*, **6**, 15.

Salager, J.L. (2000) Emulsion Properties and Related Know-how to Attain Them. *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions: Second Edition, Revised and Expanded* Drugs and the Pharmaceutical Science., Francoise Nielloud, Gilberte Marti-Mestres.

Sanchez, M.C., Berjano, M., Guerrero, A., Brito, E. & Galllegos, C. (1998) Evolution of the microstructure and rheology of O/W emulsions during the emulsification process. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **76**, 479–485.

Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P.A., Liu, Y., West, J.L., Ausman, K.D., Warheit, D.B. & Colvin, V.L. (2006) Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological sciences*, **92**, 174.

SCCNFP. (2000) *Opinion of the Scientific Commitee on Cosmetic Producs and Non-Food Products Intended for Consumers Concerning Titanium Dioxide*. Office for Official Publications of the European Communities.

Schlossman, D., Shao, Y. & Orr, C. Self-dispersible coated metal oxide powder, and process for production and use.

Schramm, G. (1998) *A Practical Approach to Rheology and Rhometry*, Gebrueder Haake.

Serpone, N., Dondi, D. & Albini, A. (2007) Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica chimica acta*, **360**, 794–802.

Shinoda, K. & Arai, H. (1964) The Correlation between Phase Inversion Temperature in Emulsion and Cloud Point in Solution of Nonionic Emulsifier. *The Journal of Physical Chemistry*, **68**, 3485–3490.

Siddiquey, I.A., Ukaji, E., Furusawa, T., Sato, M. & Suzuki, N. (2007) The effects of organic surface treatment by methacryloxypropyltrimethoxysilane on the photostability of TiO2. *Materials Chemistry and Physics*, **105**, 162–168.

Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'Hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C. & Carrière, M. (2008) In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology*, **253**, 137–146.

Singh, S., Shi, T., Duffin, R., Albrecht, C., Vanberlo, D., Hohr, D., Fubini, B., Martra, G., Fenoglio, I. & Borm, P. (2007) Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO2: Role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **222**, 141–151.

Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J. & Novak, S. (2011) Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology and Oncology*, **45**, 227–247.

Smijs, T.G. & Pavel, S. (2011) Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, Science and Applications*, **4**, 95–112.

Solans, C., Esquena, J. & Azemar, N. (2003) Highly concentrated (gel) emulsions, versatile reaction media. *Current opinion in colloid & interface science*, **8**, 156–163.

Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. (1973) A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **51**, 1409–1416.

Soundararajan, V. & Sreenivasan, S. (2012) Cytotoxicity of methanol extracts of Elaeis guineensis on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 826–829.

Stiller, S., Gers-Barlag, H., Lergenmueller, M., Pfl\ücker, F., Schulz, J., Wittern, K.P. & Daniels, R. (2004) Investigation of the stability in emulsions stabilized with different surface modified titanium dioxides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **232**, 261–267.

Sunkel, J.M. & Berg, J.C. (1996) The Stability Behavior of Sol-Emulsion Systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, **179**, 618–624.

Suttiponparnit, K., Jiang, J., Sahu, M., Suvachittanont, S., Charinpanitkul, T. & Biswas, P. (2011) Role of surface area, primary particle size, and crystal phase on titanium dioxide nanoparticle dispersion properties. *Nanoscale Research Letters*, **6**, 27.

Sze, A., Erickson, D., Ren, L. & Li, D. (2003) Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *Journal of Colloid and Interface Science*, **261**, 402–410.

Tabilo-Munizaga, G. & Barbosa-Cánovas, G.V. (2005) Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, **67**, 147–156.

Tadros, T.F. (1994) Fundamental principles of emulsion rheology and their applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **91**, 39–55.

Tadros, T.F. (2004) Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. *Advances in colloid and interface science*, **108**, 227–258.

Tadros, T.F. (2010) *Rheology of Dispersions - Principles and Applications*. Wiley - VCH.

Tamburic & Slobodanka. (2009) The Aging of Polymer-stabillized creams: a rheological viewpoint. *Beginning cosmetic chemistry: practical knowledge for the cosmetic industry* Allured books, Carol Stream, IL.

Tan Hsiao, W. (2009) *Rheology and Stability of Olive Oil Cream Emulsion Stabilized by Sucrose Fatty Acid Esters Nonionic Surfactants*. Kuala Lumpur.

Tayade, R.J., Surolia, P.K., Kulkarni, R.G. & Jasra, R.V. (2007) Photocatalytic degradation of dyes and organic contaminants in water using nanocrystalline anatase and rutile TiO2. *Science and Technology of Advanced Materials*, **8**, 455–462.

Taylor, P. (1998) Ostwald ripening in emulsions. *Advances in colloid and interface science*, **75**, 107–163.

Tedetti, M. & Sempéré, R. (2006) Penetration of Ultraviolet Radiation in the Marine Environment. A Review. *Photochemistry and Photobiology*, **82**, 389.

Tedja, R., Marquis, C., Lim, M. & Amal, R. (2011) Biological impacts of TiO2 on human lung cell lines A549 and H1299: particle size distribution effects. *Journal of Nanoparticle Research*, **13**, 3801–3813.

The scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers. (2003) *Opinion Concerning Zinc Oxide*.

Theogaraj, E., Riley, S., Hughes, L., Maier, M. & Kirkland, D. (2007) An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **634**, 205–219.

Thomas, D.N., Judd, S.J. & Fawcett, N. (1999) Flocculation modelling: a review. *Water Research*, **33**, 1579–1592.

Tiano, Armeni, Venditti & Barucca. (2010) Modified TiO2 particles differentially affect human skin fibroblasts exposed to UVA light. *Free Radical Biology & Medicine*, **49**.

Tiede, K., Hassellöv, M., Breitbarth, E., Chaudhry, Q. & Boxall, A.B.A. (2008) Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, **1216**, 503–509.

Turkoglu, M. & Yener, S. (1997) Design and in vivo evaluation of ultrafine inorganic-oxide-containing-sunscreen formulations. *International journal of cosmetic science*, **19**, 193–201.

Van der Tuuk Opedal, N., Sorland, G. & Sjöblom, J. (2009) Methods for Droplet Size Distribution Determination of Water-in-oil Emulsions using Low-Field NMR.

Twentyman, P.R. & Luscombe, M. (1987) A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British journal of cancer*, **56**, 279.

Uchino, T., Ikarashi & Nishimura. (2011) Effects of coating materials and size of titanium dioxide particles on their cytotoxicity and penetration into the cellular membrane. *The Journal of Toxicological Sciences*, **36**, 95–100.

Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M. & Utsumi, H. (2002) Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO2–UVA treatment. *Toxicology in vitro*, **16**, 629–635.

Valant, J., Iavicoli, I. & Drobne, D. (2011) The importance of a validated standard methodology to define in vitro toxicity of nano-TiO2. *Protoplasma*, **249**.

Vashisth, C., Whitby, C.P., Fornasiero, D. & Ralston, J. (2010) Interfacial displacement of nanoparticles by surfactant molecules in emulsions. *Journal of colloid and interface science*, **349**, 537–543.

Vevers, W.F. & Jha, A.N. (2008) Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO2) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology*, **17**, 410–420.

Virkutyte, J., Al-Abed, S.R. & Dionysiou, D.D. (2012) Depletion of the protective aluminum hydroxide coating in TiO2-based sunscreens by swimming pool water ingredients. *Chemical Engineering Journal*, **191**, 95–103.

Wang, J., Li, R., Zhang, Z., Sun, W., Wang, X., Xu, R., Xing, Z. & Zhang, X. (2007) Degradation of Hazardous Dyes in Wastewater using Nanometer Mixed Crystal TiO2 Powders under Visible Light Irradiation. *Water, Air, and Soil Pollution*, **189**, 225–237.

Warheit, D.B., Brock, W.J., Lee, K.P., Webb, T.R. & Reed, K.L. (2005) Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO2 particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. *Toxicological Sciences*, **88**, 514–524.

Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L. & Sayes, C.M. (2007) Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO2 particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology letters*, **171**, 99–110.

Warheit, D.B., Reed, K.L. & Webb, T.R. (2003) Pulmonary toxicity studies in rats with triethoxyoctylsilane (OTES)-coated, pigment-grade titanium dioxide particles: bridging studies to predict inhalation hazard. *Experimental Lung Research*, **29**, 593–606.

Weyenberg, W., Filev, P., Van den Plas, D., Vandervoort, J., De Smet, K., Sollie, P. & Ludwig, A. (2007) Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *International journal of pharmaceutics*, **337**, 291–298.

Wiench, K., Landsiedel, R., Ma-Hock, L., Hisgen, V., Radke, K., Zok, S., Schulte, S. & van Ravenzwaay, B. (2007) *Aquatic Fate and Toxicity of Nanoparticles: Agglomeration, Sedimentation and Effects on Daphnia Magna*. Retrieved from www. sustainability. basf. com/basfcorp/img/sustainability/dialog/Wiench_SOT_OekoNano_Poster. pdf.

Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S. & Landsiedel, R. (2009) Acute and chronic effects of nano-and non-nano-scale TiO2 and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate Daphnia magna. *Chemosphere*, **76**, 1356–1365.

Wiesner, M.R., Lowry, G.V., Alvarez, P., Dionysiou, D. & Biswas, P. (2006) Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental science & technology*, **40**, 4336–4345.

Wokovich, A., Tyner, K., Doub, W., Sadrieh, N. & Buhse, L.F. (2009) Particle size determination of sunscreens formulated with various forms of titanium dioxide. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **35**, 1180–1189.

Wörle-Knirsch, J.M., Pulskamp, K. & Krug, H.F. (2006) Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. *Nano Letters*, **6**, 1261–1268.

Wyllie, Morris, Smith & Dunlop. (1984) Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *The Journal of Pathology*, **142**, 67–77.

Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I. & Nel, A.E. (2008) Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. *ACS Nano*, **2**, 2121–2134.

XP ISO/TS 80004-1. (2013)

Yan, N., Gray, M.R. & Masliyah, J.H. (2001) On water-in-oil emulsions stabilized by fine solids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **193**, 97–107.

Yan, Y., Pal, R. & Masliyah, J. (1991) Rheology of oil-in-water emulsions with added solids. *Chemical engineering science*, **46**, 985–994.

Yang, A., Cardona, D.L. & Barile, F.A. (2002) In VitroCytotoxicity Testing with Fluorescence-Based Assays in Cultured Human Lung and Dermal Cells. *Cell biology and toxicology*, **18**, 97–108.

Yang, Liu, Bhalla, Kim, Ibrado, Cai & Peng. Prevention of Apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrome c from Mitochondria Blocked. *Science*, **275**, 1129–1132.

Yeagle, P.L. (2009) Cell Membrane Features. *Encyclopedia of Life Sciences* (ed John Wiley & Sons, Ltd), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

Zanatta, C.F., Ugartondo, V., Mitjans, M., Rocha-Filho, P.A. & Vinardell, M.P. (2008) Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (Mauritia flexuosa) assessed by the neutral red release test. *Food and Chemical Toxicology*, **46**, 2776–2781.

Zeyons, O. (2008) *Etudes Des Interactions Physicochimiques et Biologiques Entre Des Nanoparticules Manufacturées et Des Bactéries de L'environnement.* Université Paris VI - Pierre et Marie Curie.

Zhao, J., Milanova, M., Warmoeskerken, M.M.C.G. & Dutschk, V. (2012) Surface modification of TiO2 nanoparticles with silane coupling agents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **413**, 273–279.

Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (2010) Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. *Experimental Cell Research*, **316**, 1374–1383.

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y. & Chen, Y. (2010) Trophic transfer of TiO2 nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. *Chemosphere*, **79**, 928–933.

Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y. & Lang, Y. (2008) Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **43**, 278–284.

Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E. & Stammati, A. (2004) Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicology in Vitro*, **18**, 153–163.

Annexes

International Journal of Pharmaceutics 461 (2014) 89–96

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Effects of aging on structure and stability of TiO_2 nanoparticle-containing oil-in-water emulsions

Manon Rossano[a,b], Nicolas Hucher[a,*], Céline Picard[a], Daniel Colletta[a], Frank Le Foll[b], Michel Grisel[a]

[a] URCOM, EA 3221, FR CNRS 3038, University of Le Havre, 25 rue Philippe Lebon B.P. 540, 76058 Le Havre Cedex, France
[b] LEMA, EA 3222, University of Le Havre, 25 rue Philippe Lebon B.P. 540, 76058 Le Havre Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 July 2013
Received in revised form
14 November 2013
Accepted 18 November 2013
Available online 26 November 2013

Keywords:
Titanium dioxide nanoparticle
Sunscreen
Particle size measurement
Rheology
Destabilization
Coating

Chemical compounds studied in this article:
Titanium dioxide (PubChem CID 26042)
Alumina (PubChem CID 14769)
Triethoxycaprylylsilane (PubChem CID 76262)
Isopropyl titanium triisostearate (PubChem CID 162941)

ABSTRACT

Formulations incorporating different cosmetic grade TiO_2 nanoparticles were developed according to a self-produced protocol on the basis of typical sunscreen cream oil-in-water emulsions. Role of nanoparticles and, more specifically, the impact of two different lipophilic surface treatments on microstructure and stability of the formulations were assessed. Aging of formulations was performed under classical conditions at room temperature or under accelerated conditions at 50 °C, with or without TiO_2, and was characterized by several tools such as rheology, microscopy, and particle size measurements. Changes in emulsion stability and aggregation state of nanoparticles were followed over time. Destabilization phenomena were identified: under accelerated aging, the formulation without nanoparticles underwent a coalescence occurrence whereas the formulation incorporating nanoparticles was subjected to aggregation of the colloidal particles. Besides, TiO_2 nanoparticles strongly affected the particle–droplets interactions and thus modified the emulsion microstructure with a coating-dependent effect: destabilization mechanisms occur more rapidly with alumina (and) triethoxycaprylylsilane (coating 1) TiO_2 nanoparticles as compared to alumina (and) isopropyl titanium triisostearate (and) triethoxycaprylylsilane crosspolymer (coating 2) nanoparticles.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A nanomaterial is defined by the European commission (Commission Recommendation of 18 October 2011 on the "Definition of Nanomaterial," Official Journal of the European Union, 2011, sec. L 275/38) as "a natural material formed accidentally or manufactured, containing not bonded particles, in an aggregate or agglomerate form, and where at least 50% of the particles in number size distribution have one or several dimensions of between 1 nm and 100 nm". In March 2011, a nanotechnology consumer products inventory reported a list of more than 1000 goods, including 33 sunscreens ("Nanotechnology – Project on Emerging Nanotechnologies"). Nano-sized TiO_2 is the most used inorganic filter in the cosmetic industry, and is incorporated as UV mineral sunscreen because this mineral provides effective protection from solar radiation (Serpone et al., 2007), together with a moderate skin covering effect related to their nanoscale size (Popov et al., 2005).

Raw TiO_2 nanoparticles have hydrophilic surfaces consisting in polar hydroxyl groups. Thus, surface treatment is used in cosmetic industry to improve both the compatibility and the performance of the particles. The most common treatments for nanoscale titanium dioxide cosmetic grade are:

- A grafting of aluminum oxide $Al(OH)_3$ or Al_2O_3 which reduces the photocatalytic activity and production of derived reactive oxygen species observed when TiO_2 is exposed to UV (Dunford et al., 1997);
- A lipophilic surface treatment in order to improve the dispersion of nanoparticles in the oily phase of the emulsion, such as dimethicone, stearic acid or silane components.

Assumptions on the locations of coatings have been issued (Lewicka et al., 2011): the lipophilic layer would overlap that of $Al(OH)_3$, which itself covers the nanoparticle.

* Corresponding author. Tel.: +33 232744399; fax: +33 232744391.
E-mail address: nicolas.hucher@univ-lehavre.fr (N. Hucher).

0378-5173/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.039

Table 1
Nanoparticles INCI name and composition depending on the coating used.

Name	INCI name	Composition (% w/w)
Coating 1	Titanium dioxide	73.5–82
	(And) Alumina	12.5–17.5
	(And) Triethoxycaprylylsilane	6–8
Coating 2	Titanium dioxide	73.5–82
	(And) Alumina	12.5–17.5
	(And) Isopropyl titanium	3–4
	Triisostearate/Triethoxycaprylylsilane crosspolymer	3–4

TiO_2 based sunscreen emulsions have been until now poorly investigated (Botta et al., 2011; Labille et al., 2010; Lewicka et al., 2011). Recently, aging of commercial sunscreens has been studied in order to assess the alteration of the nanoparticles used in cosmetic formulations (Botta et al., 2011). However, as all previous investigations were based on commercial creams, authors could not state exactly on the role of the nanoparticle species by themselves. The originality of the present work lies in the production of a non commercial formulation, but similar to one, containing cosmetic grade nanoparticles. As a consequence, for the first time, characterization of the system was performed by using an emulsion where each ingredient was identified, obtained using a fully controlled process, and as a consequence, it was possible to understand the contribution of nanoparticles themselves.

From a general point of view, colloidal residues containing TiO_2 nanoparticles from personal care products may be released into aquatic environment (Botta et al., 2011). Indeed, destabilization mechanisms of such systems are important to understand, in order to optimize formulation processes, to adapt the duration of use of products or to correlate physicochemical properties with potential toxicity. Thus a detailed characterization and identification of a nanomaterial is an essential requirement for risk assessment during its entire life cycle (Johnston et al., 2009).

Herein, we have developed three specific formulations consisting in an oil-in-water emulsion without nanoparticles and "derived" emulsions containing TiO_2 nanoparticles with two different coatings. A characterization was then performed at both initial state and during aging. Rheology, microscopy and particle size measurements were used to point out distinct features of the emulsions. Dynamic viscoelastic measurements provided information on the sample structure and more deeply on the intermolecular and interparticle forces in the material. Microscopy and particle size determination gave information on size distribution of the colloidal particles in the emulsion. Finally, combining the different results led to a better understanding of the role of the nanoparticles in the destabilization mechanisms.

2. Experimental section

2.1. Chemicals and reference materials

Purified water, with a resistivity of 15 mΩ cm, was used for all experiments, emulsions preparation and particle size analysis.

TiO_2 nanoparticles with two different coatings (see Table 1) have been used in the present study: *alumina* (and) *triethoxycaprylylsilane*, named coating 1, *alumina* (and) *isopropyl titanium triisostearate* (and) *triethoxycaprylylsilane crosspolymer* named coating 2. Samples were kindly given by Kobo Products, France. According to the manufacturer, the caprylylsilyl group is chemically bonded to the pigment and the primary particle size of the particle is given to be 10 nm (Kobo, 2012).

Ingredients were chosen to achieve an oil-in-water emulsion, close to a commercial sunscreen formulation. This formula was deliberately optimized in order to allow an easy nanoparticles incorporation procedure, and also with a view to study toxicity afterwards. The formulation without nanoparticles is called F-0, and those with nanoparticles are F-N1 for the coating 1 and F-N2 for the coating 2, respectively. All the ingredients used for the formulations and their content in both formulations are listed in Table 2.

2.2. Emulsion preparation

This protocol has been developed in order to obtain similar emulsions whether the nanoparticles are added or not.

2.2.1. Emulsion without nanoparticles

The emulsion was prepared according to the following optimized procedure:

The gelling agent was first sprinkled in water and left without stirring for 20 min. This mixture and the phase A were then heated separately at 80 °C under mechanical stirring to get homogenization. When both phases were at 80 °C, phase A was added to the aqueous phase under stirring at 11,000 rpm for 1 min 30 with a rotor-stator type homogenizer (Ultra-Turrax, stator diameter 25 mm, rotor diameter 18 mm, *IKA*). Then the mixture was left cooling down under mechanical stirring at 500 rpm with mixer (Turbotest, radial flow turbine of 55 mm diameter, *VMI Rayneri*), and triethanolamine was immediately added (before the temperature attained 50 °C) to reach a final pH of 6.6 corresponding to polymer neutralization. The mixer speed was then increased to 1000 rpm, for 15 min thus making the cream becoming more consistent. Once at 40 °C, the mixture was cooled down using a cold water bath, until 30 °C was reached while continuously stirring. The preservative was added below 30 °C, and the mixture was stirred for 5 additional minutes. The cream was then put under vacuum in order to remove the air bubbles incorporated during process.

2.2.2. Nanoparticle dispersion

To improve the dispersion of nanoparticles in the emulsion, a paste of TiO_2 nanoparticles was prepared by mixing with spatula 40% (w/w) titanium dioxide with 60% (w/w) cetearylethylhexanoate. This paste was then grounded on a three-cylinder mill until a fine dispersion was obtained, controlled by optical microscopy for homogeneity. Typically, the dispersion with coating 1 needed to be grounded once, and the one with coating 2 required grounding for three times. The resulting paste was used to prepare the emulsion with nanoparticles.

2.2.3. Emulsion with nanoparticles

The previous protocol described above for emulsion preparation remains roughly the same except when phase A was added to the aqueous phase under stirring at 11,000 rpm for 1 min; then the nanoparticle dispersion was immediately incorporated under stirring during one more minute under vigorous stirring. In order to get a final percentage of 5% of nanoparticles in the emulsion, the effective amount of cetearylethylhexanoate necessary to get a right dispersion had to be previously calculated.

2.3. Monitoring stability and aging process

In order to test the stability of the three emulsions over time, two batches of each emulsion were stored for 3 months at:

- Room temperature 20 ± 2 °C, in plastic opaque flasks,
- High temperature 50 ± 1 °C, in closed glass flasks in a heating ventilated oven (Heraues *Thermo Scientific*).

Table 2
Ingredients used in formulations F-0, F-N1 and F-N2 with their compositions, functions and suppliers.

	F-0	F-N			
	Content (% w/w)		Products – INCI name	Function	Supplier
Phase A	2.75	2.75	Steareth 2	Surfactant	Croda (UK)
	1.75	1.75	Steareth 21	Surfactant	Croda (UK)
	2	2	Paraffin	Emollient	Baërlocher (France)
	0.2	0.2	Beeswax	Emollient	Baërlocher (France)
	20	20	Cetearyl ethylhexanoate	Emollient	Stéarinerie Dubois (France)
Phase B	0.1	0.1	Acrylates/C10–30 alkyl acrylate crosspolymer	Polymer gelling agent	Lubrizol (Belgium)
	0.1	0.1	Triethanolamin	Additive	BASF (Germany)
	0.5	0.5	PhenoxyethanolMethylparabenEthylparabenPropylparaben	Preservative	Jan Dekker (Nederland)
	Qs	Qs	Deionised water		
	0	5	See Table 1	Nanoparticles	Kobo Products (USA)

Storage at 50 °C enabled to accelerate the aging process and speeded up the mechanism of destabilization of the emulsion. At each storage temperature, samplings for analysis were made at different time after emulsification: t_0 + 24 h, t_0 + 72 h, t_0 + 7 days, t_0 + 14 days, t_0 + 21 days, t_0 + 28 days, t_0 + 43 days and t_0 + 65 days. The different analyses described below were performed on each sampling.

2.4. Particle size measurement

Particle size analysis was performed using a laser diffractometer Mastersizer 2000 (*Malvern Instruments*, UK). The complex refractive index of the material to be measured was required. The real part of the refractive index has been determined by refractometric measurements. Considering previous experiments which gave the more relevant results, optical properties of the sample were thus defined as follow:

- For F-0: refractive index 1.450 and absorption 0.1;
- For F-N1 and F-N2: refractive index 1.458 and absorption 0.1;

The calculation model used was the general purpose model, with spherical particle shape.

Approximately 0.1 g of emulsion was diluted in 600 mL of distilled water. The mixture was dispersed using ultrasonic waves for 2 min, until an obscuration rate of 10–20% was obtained. Background and sample were measured for 10 s, each sample being measured in triplicate.

2.5. Rheology

Rheological properties were carried out on a controlled-stress rheometer (AR 2000, *TA Instruments*) using a cone–plate acrylic geometry (diameter: 40 mm, nominal cone angle: 0.59°, truncation: 27 μm). Because of the presence of solid nanoparticles aggregates in emulsions F-N1 and F-N2, preliminary tests were performed on both emulsions with different measuring systems (plate–plate and cone–plate) in order to determine the right experimental conditions. Strain sweeps were carried out at 25 °C, as controlled by Peltier effect, with imposed strain ranging from 0.01 to 100% at a fixed frequency of 1 Hz. This measurement permitted to evidencing the linear viscoelastic plateau corresponding to constant viscoelastic parameters whatever the applied strain. Measurements were performed in triplicate for each batch.

The rheological parameters measured are listed below:

tan(δ) where δ is the phase angle of the stress with respect to the strain;
G'', the loss (or viscous) modulus, $G'' = G^* \sin\delta$;
G', the storage (or elastic) modulus, $G' = G^* \cos\delta$;
γ_c, the critical strain, corresponds to the value of the strain percentage when G' reaches 90% of its initial value, as determined within the linear viscoelastic region.

2.6. Microscopic measurements

Microstructure visualization, droplet sizes of the emulsions and nanoparticle sizes of the dispersion and their distribution in the emulsions were qualitatively and, when possible, quantitatively determined at a magnification of ×200, using an optical microscope (*DMLP/DC300*, *Leica Microsystems*) equipped with a camera and the software IM1000.

3. Results and discussion

3.1. Formulation process

In the present work, we developed lab-scale formulations without or with nanoparticles, as detailed in Experimental section. The corresponding specific step-by-step process aiming at producing such formulations similar to commercial products is described in Fig. 1.

Three emulsions with identical formulation were obtained, including or not nanoparticles: a raw emulsion (F-0) and emulsions with alumina and triethoxycaprylylsilane-coated nanoparticles (F-N1) and with alumina, isopropyl titanium triisostearate and triethoxycaprylylsilane crosspolymer-coated nanoparticles (F-N2). Primary nanoparticle size given by the supplier was 10 nm (Kobo, 2012). This value corresponds to the size of the crystals obtained after the manufacturing process. In powder form, the crystals are known to aggregate, inducing global sizes larger than 1 μm (Aldous and Kent, 2013). Therefore, the milling step (step n°2, Fig. 1) of nanoparticles dispersion enabled an optimal dispersion of nanoparticles in the final formulation (Delrieu and Shao, 2013). As an example, results of particle size analysis for coating 2 dispersion, showed that 36% of the resulting particles are smaller than 1 μm while 10% are larger than 10 μm (details not shown). The way of adding the nanoparticles paste was also an important parameter; the dispersion quality was better when the paste was incorporated after the emulsifying step.

3.2. Initial state and microstructure of the emulsions

3.2.1. Emulsion without nanoparticles

Our first criterion for characterization of the emulsion quality was the droplet size distribution. Fig. 2a presents this distribution for emulsion F-0 as measured 72 h after preparation. It appears as a polydisperse, bimodal distribution centered on two main sizes, 0.2 μm and 2.5 μm. Approximately 58% of the droplets were smaller than 2.5 μm. Only 0.4% of the droplets were larger than

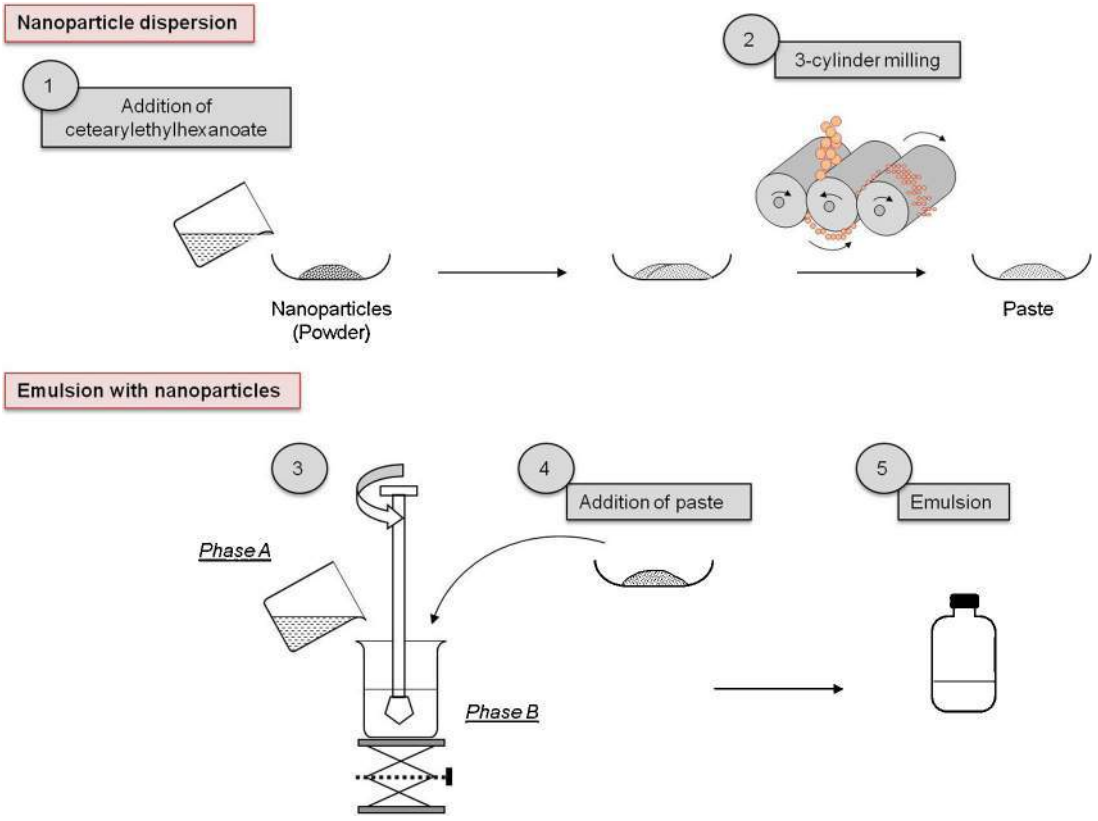


Fig. 1. Step-by-step process of formulations containing nanoparticles. A paste of TiO_2 nanoparticles is prepared with cetearylethylhexanoate (step 1). This paste is then ground on a three-cylinder mill until a fine dispersion is obtained (step 2), and controlled by optical microscopy. When both phases of the emulsion are at 80 °C, phase B is added to the aqueous phase under stirring (step 3) and the nanoparticle dispersion is immediately incorporated under stirring during (step 4). The emulsion with nanoparticles is obtained (step 5).

10 μm. The mean diameter by surface area to volume, commonly used to represent the finesse of an emulsion (Abismail et al., 1999), is 1.33 μm, providing additional evidence that this emulsion is mainly made up of small droplets. The corresponding optical micrograph presented on Fig. 2b clearly confirms the major presence of fine droplets. However, care is required for such an interpretation of particle size results, as analysis demands large dilution of emulsion sample in water followed by ultrasonic treatment. Such a preparation procedure might be unrepresentative of the initial droplets size distribution in the bulk emulsion. Therefore, the above results would rather reflect the dispersion ability of the emulsion in a diluted medium.

An emulsion is generally regarded as a viscoelastic material that has both solid and viscous liquid properties; both behaviors were measured through dynamic oscillatory tests within the linear viscoelastic plateau. Fig. 3 shows the results of the strain sweep test for F-0. G', G'' and $\tan(\delta)$, remain constant, as far as the maximum strain amplitude remains below a critical value γ_c corresponding to the limit of the linear viscoelastic region (strain below 3% for this example). In this region, the only measurement of G', G'' and γ_c was sufficiently discriminating to provide valid identification of the sample. For F-0, the elastic modulus G' is much greater than the viscous modulus G'' and $\tan(\delta)$ remains below 1, thus illustrating a predominant elastic behavior (Tabilo-Munizaga and Barbosa-Cánovas, 2005). Beyond this domain, moduli sharply change as the emulsion structure progressively disrupts. When submitted to an increasing strain, the emulsion structure resists against deformation up to the critical strain γ_c, where G' starts decreasing, and G'' increases, simultaneously. This behavior is interpreted as a weak strain overshoot (Hyun et al., 2002) and clearly illustrates the emulsion's structure breaking down under strain. The gel structure is related to the aqueous phase gelling agent used in the present emulsion, namely C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer. Above the crossing point ($G' = G''$), the material behaves more and more markedly as a liquid.

3.2.2. *Emulsion with nanoparticles: coating 1*

Fig. 2a indicates that F-N1 displays broader polydisperse distribution as compared to F-0. In addition, a new population of particles with larger sizes is observed. 43% of the colloidal particles are smaller than 2.5 μm while 24% are larger than 10 μm. The curve reflects the distribution of both the droplets of the emulsion and the nanoparticles *per se*. As mentioned in Section 2.1, our results indicate that the larger sizes in the emulsion F-N1 are mainly due to nanoparticles aggregates. The optical micrographs Fig. 2c and d clearly confirm the presence of dark objects corresponding to aggregates larger than 10 μm and homogeneously dispersed in the presence of many smaller droplets and particles. During emulsification, presence of particles and surfactants might lead to a competitive adsorption onto the oil droplet surfaces. In addition, surfactant molecules may partially adsorbed onto particle surface, thus modifying their wettability, and consequently affecting the emulsifiers efficiency (Binks et al., 2007). The work of (Pichot et al., 2010) shows that at high surfactant concentration, the particles are completely displaced from the interface to the hydrophilic continuous medium and that the stability is only achieved by the presence of a minimum amount of surfactants. In the present work, the surfactant-particles system together with the concentration ranges used are different from those utilized by Pichot et al. Although a high surfactant concentration was used,

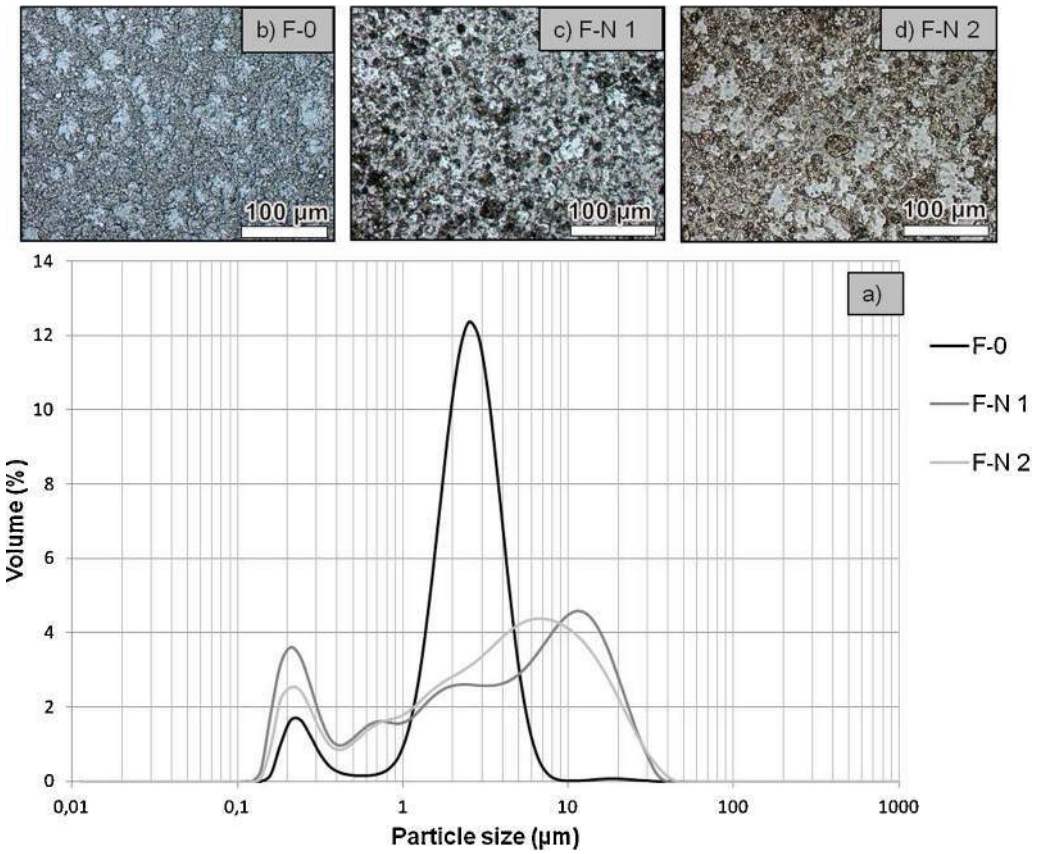


Fig. 2. Initial particle size volume distribution of F-0, F-N1 and F-N2.
Optical micrograph of F-0 (a), F-N1 (b) and F-N2 (c) taken at ×200, represents droplets and nanoparticles distribution of the emulsion at 72 h after emulsion preparation at room temperature. Particle size volume distribution (d) is performed on a particle size analyzer, at 72 h after emulsion preparation

the introduction of particles was performed after the emulsification process. Moreover, TiO_2 particles used in this study were hydrophobic and dispersed in the non-continuous oil phase. As a consequence, the whole process enabled surfactants species to reach the water–oil interface before particles did. At the initial state, droplets of the emulsions with or without nanoparticles were probably of similar size. As greater droplets sizes (>2.5 µm) were observed for F-N1, an important competition between surfactants molecules and hydrophobic particles may be considered, inducing a partial coalescence phenomenon.

Fig. 3 illustrates that F-N1 presents a predominant elastic behavior similar to F-0. However, the presence of nanoparticles significantly affected the viscoelastic properties of this emulsion with a decrease of G' and G''. This is attributed to the increase in the oil droplets size resulting from coalescence, as classically described (Tadros, 2010). Another observation is that G'' of F-N1

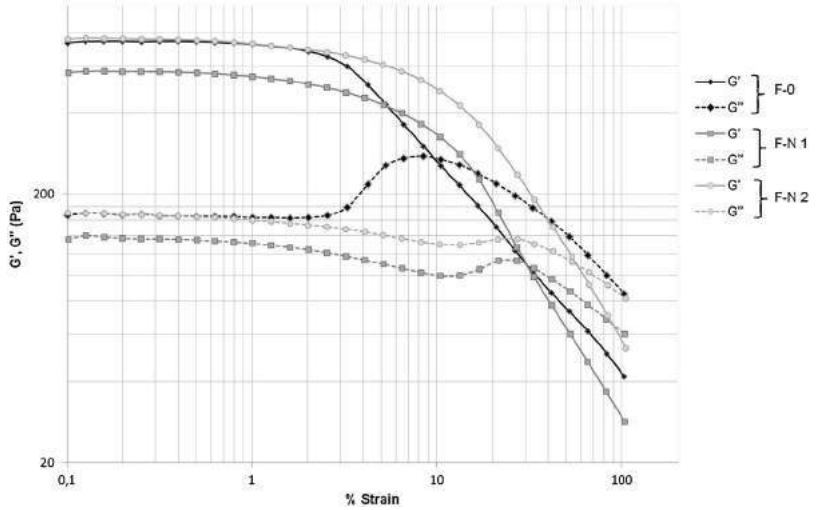


Fig. 3. Dynamic strain sweep test of F-0, F-N1, and F-N2 at a frequency of 1 Hz, at 25 °C: G' and G'' as a function of applied strain from 0.1 to 100%.

Table 3
Viscoelastic functions values of G' (Pa), γ_c (%) and tan(δ) in the linear region of F-0, F-N1, F-N2 stored at room temperature at 72 h after preparation.

Room temperature, 72 h	F-0	F-N1	F-N2
G' (Pa)	742 ± 2.7	567 ± 4.0	756 ± 8.4
γ_c (%)	2.2 ± 0.66	2.0 ± 0.01	2.6 ± 0.24
tan(δ)	0.226 ± 0.002	0.241 ± 0.001	0.223 ± 0.001

shows weaker strains overshoot than F-0, thus indicating that the presence of nanoparticles weakened the network structure of the emulsion and prevented the droplets network structuring.

3.2.3. Emulsion with nanoparticles: coating 2

Emulsion incorporating nanoparticles with coating 2 shows the same initial colloidal particles size distribution than for the coating 1 (Fig. 2a–d). This demonstrates that the protocol enabled to produce comparable emulsions, whatever was the coating used.

Again, as for F-N1, nanoparticles with coating 2 affected in the same way the final structure of the emulsion by weakening the strain overshoot.

Interestingly, the decrease of rheological parameters described for F-N1 is no more observed for F-N2, as the moduli remain equal to F-0 within the linear region (Table 3). This suggests a major role of particle coating on the viscoelastic properties of emulsions. As the coating 1 was made of short alkyl chains (C8) grafted on an alumina surface, electrostatic interactions with the oil phase components were probably superior to steric effects. On the opposite, with a hybrid coating as coating 2 (See Table 1), steric effects occurred predominantly. The reduction in G' may result from a change in particle–particle interaction, that can be estimated by the computation of cohesive energy ($E_c = 1/2G'\gamma_c^2$) according to Tadros (2004). High E_c reflects stronger particle–particle interaction giving rise to a more flocculated state. Both emulsions showed very similar droplet size distribution so that quantitative comparison between both systems could be assessed. E_c values are 2292 Pa and 4955 Pa for F-N1 and F-N2, respectively.

At the initial state, those differences are coating-dependent rather than due to the presence of nanoparticles by themselves. However, such systems are known as thermodynamically unstable, evolving to the physical separation of the aqueous and oil phases. Such instability may occur more or less rapidly through different mechanisms of destabilization, which could be influenced by initial interactions between components.

3.3. Stability at room temperature

Aging experiments were conducted on the three emulsions (F-0, F-N1 and F-N2) at room temperature over 65 days.

3.3.1. Formulation without nanoparticles

Results reported in Table 4 indicate no variation for the main rheological parameters (G', G'' and tan(δ)) measured on the plateau. This may be explained by the small droplet size and the highly packed structure evidenced for this emulsion at initial state (Fig. 2b). However, the slight increases of both γ_c (Table 4) and droplet sizes (Table 5) over time are characteristic of an evolution towards coalescence. This could be explained by greater inter-droplet interaction forces occurring in such highly packed emulsion system (Tan Hsiao, 2009).

3.3.2. Formulation with nanoparticles

F-N1 and F-N2 show greater variations of rheological parameters with a decrease of G' by −29 and −39% respectively. A slight increase of tan(δ) together with a drop of γ_c is also observed, thus indicating that the emulsions become less elastic (Table 4). As

Table 4
Viscoelastic functions values of G' (Pa), γ_c (%) and tan(δ) in the linear region of F-0, F-N1 and F-N2 stored at room temperature and at 50 °C from 24 h after emulsion preparation until 65 days.

Stored at room temperature											Stored at 50 °C										
F-0									Δ		F-0									Δ	
Days	1	3	7	14	21	28	43	65			Days	1	3	7	14	21	28	43	65		
G'	726 ± 6.9	742 ± 2.7	715 ± 5.1	677 ± 7.3	662 ± 9.1	669 ± 35	675 ± 11	718 ± 20	−3.2%		G'	548 ± 5.2	482 ± 4.0	474 ± 8.3	312 ± 2.3	259 ± 6.4	276 ± 8.9			−56.4%	
tan(δ)	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.23 ± 0.01	3.6%		tan(δ)	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.33 ± 0.01			27.00%	
γ_c	1.91 ± 0.45	2.16 ± 0.66	2.32 ± 0.19	2.08 ± 0.20	2.02 ± 0.27	2.37 ± 0.37	2.62 ± 0.06	3.13 ± 0.35	45.1%		γ_c	1.95 ± 0.60	2.20 ± 0.12	2.33 ± 0.43	2.70 ± 0.13	3.07 ± 0.41	2.35 ± 0.33			20.2%	
									Δ											Δ	
F-N1											F-N1										
Days	1	3	7	14	21	28	43	65			Days	1	3	7	14	21	28	43	65		
G'	526 ± 5.2	567 ± 4.0	552 ± 8.3	440 ± 2.3	414 ± 6.4	424 ± 8.9	411 ± 2.9	402 ± 7.1	−29.1%		G'	424 ± 47	289 ± 14	448 ± 31	1049 ± 53	1103 ± −651				160.1%	
tan(δ)	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	16.2%		tan(δ)	0.33 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.24 ± 0.14				−27.2%	
γ_c	1.76 ± 0.19	2.01 ± 0.01	2.08 ± 0.08	2.03 ± 0.01	2.02 ± 0.01	2.14 ± 0.09	1.88 ± 0.10	1.77 ± 0.05	−12.1%		γ_c	1.68 ± 0.18	1.51 ± 0.07	1.25 ± 0.04	0.87 ± 0.04	0.57 ± 0.06				−66.00%	
									Δ											Δ	
F-N2											F-N2										
Days	1	3	7	14	21	28	43	65			Days	1	3	7	14	21	28	43	65		
G'	792 ± 39	756 ± 8.4	792 ± 5.2	680 ± 2.5	639 ± 9.2	529 ± 19	460 ± 47	300 ± 4.1	−39.3%		G'	605 ± 30	585 ± 80	711 ± 87	636 ± 69	574 ± 102	991 ± 172	852 ± 27	1500 ± 135	40.8%	
tan(δ)	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.29 ± 0.01	8.4%		tan(δ)	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.31 ± 0.01	12.9%	
γ_c	2.09 ± 0.47	2.56 ± 0.24	2.76 ± 0.31	2.65 ± 0.16	2.76 ± 0.16	2.29 ± 0.34	2.39 ± 0.36	1.83 ± 0.04	−10.5%		γ_c	1.94 ± 0.08	1.85 ± 0.44	1.49 ± 0.31	1.15 ± 0.31	0.79 ± 0.05	1.08 ± 0.06	0.51 ± 0.06	0.40 ± 0.16	−79.6%	

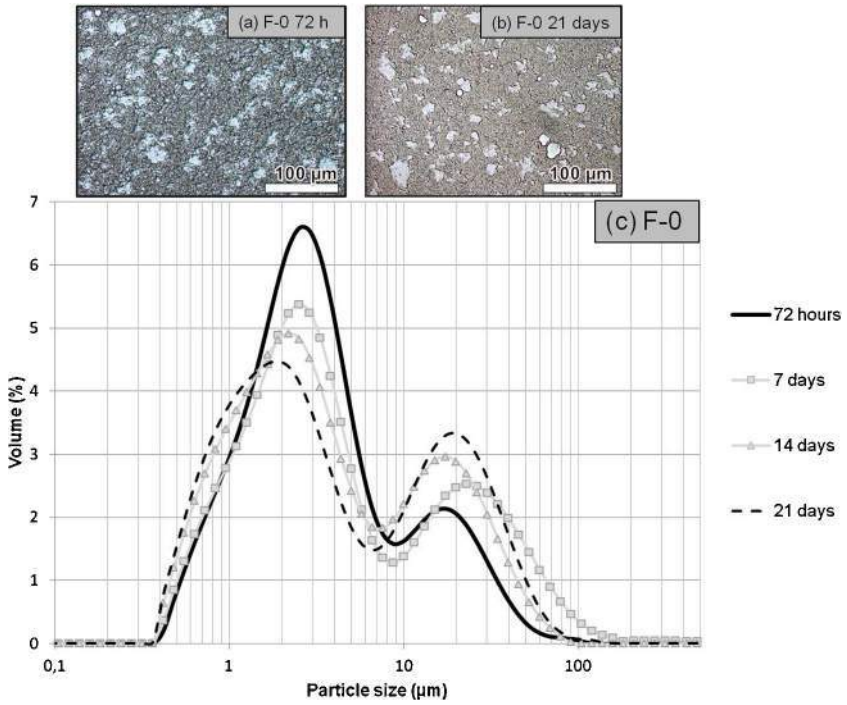


Fig. 4. Optical micrograph taken at ×200 of F-0 aged at 50 °C, 72 h after emulsion preparation (a) and after 21 days (b). Particle size volume distribution (c) over time from 72 h until 21 days of F-0 aged at 50 °C.

for F-0, formulations with nanoparticles display a time-dependent increase of the average particle size.

To summarize, on the basis of rheological properties evolution, one can consider that the formulation developed without nanoparticles is relatively stable during 3 months, while the emulsions containing nanoparticles markedly destabilize.

3.4. Stability under accelerated aging

For accelerated aging conditions, as far as the temperature remains reasonable, the temperature stress applied speeds up, without altering, the mechanisms of deterioration operating at room temperature (Masmoudi et al., 2005). Aging experiments were conducted on F-0, F-N1 and F-N2 at 50 °C over 65 days.

Thus, observations performed on emulsions stored at 50 °C evidenced destabilization processes, as significant changes for all rheological parameters were observed up to the creaming phenomena of the emulsion; for this reason F-N1 is followed over time for 21 days corresponding to the macroscopic creaming of the product.

3.4.1. Formulation without nanoparticles

F-0 becomes less elastic with time (Table 4); the elastic modulus G' decreases by 56% after 28 days, thus illustrating a marked destabilization of the emulsion. This is mainly the consequence of droplets coalescence (Tadros, 2004). This result is consistent with the microscopic observation that clearly evidences the occurrence of larger droplets aggregates. The formation of larger droplets enhanced the creaming rate of the droplets, thus increasing the phase separation occurrence. At 28 days, the linear viscoelastic plateau is no more reached, even at the lowest strain amplitude. Thus, after this time, physicochemical investigations were stopped.

Particle size measurements and optical micrographs (Table 6 and Fig. 4) unambiguously confirm the hypothesis of coalescence occurrence for F-0 stored at 50 °C since an increase of larger sizes of the droplets was observed.

3.4.2. Formulation with nanoparticles

For F-N1, the storage at 50 °C first induced a significant decrease of G' and γ_c, interpreted as the consequence of droplets coalescence. Afterwards, a sharp increase of G' is observed and interpreted as a result of nanoparticles aggregation (Tadros, 2004). Particle size measurements confirm an increase of the mean size and a shift to larger sizes (Table 6). In addition, an inhomogeneous distribution with different sizes of particles was observed on micrographs after 72 h (Fig. 5a). At 22 days, three different phases of the system were observed: solid particles and highly aggregated particles well separated from the emulsion consisting of polydisperse oil droplets in the aqueous continuous phase (Fig. 5b).

Obviously, the destabilization mechanisms were mainly controlled by the particles behavior in the emulsion. The aggregation

Table 5
Percentage of size distribution of colloidal particles smaller than 2.5 µm and bigger than 10 µm for F-0, F-N1, and F-N2 aged 72 h and 65 days, stored at room temperature.

Room temperature	72 h		65 days	
%	<2.5 µm	>10 µm	<2.5 µm	>10 µm
F-0	58	0.4	48	1.7
F-N1	43	24	36	34
F-N2	39	20	40	26

Table 6
Percentage of size distribution of colloidal particles smaller than 2.5 µm and bigger than 10 µm for F-0, F-N1, and F-N2 aged 72 h, 21 days and 65 days, stored at 50 °C.

50 °C	72 h		21 days		65 days	
%	<2.5 µm	>10 µm	<2.5 µm	>10 µm	<2.5 µm	>10 µm
F-0	49	17	51	31	49	31
F-N1	45	19	39	31	45	31
F-N2	45	19	45	26	38	36

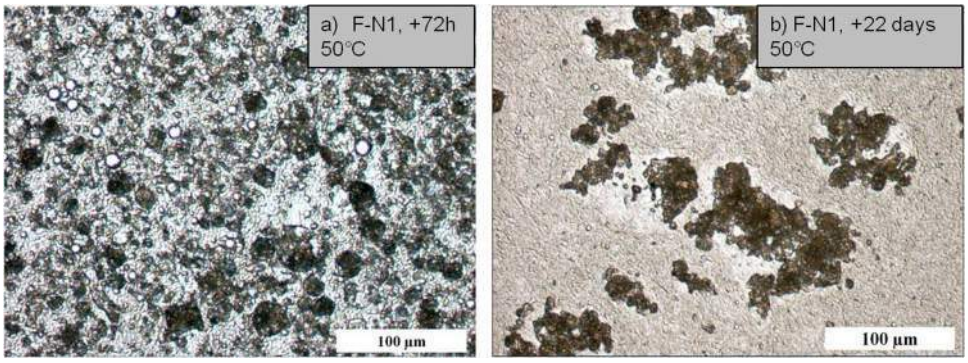


Fig. 5. Optical micrograph taken at ×200 of F-N1 aged at 50 °C, 72 h after emulsion preparation (a) and aged at 50 °C after 22 days (b).

might result from the strong attractive interactions between TiO_2 particles as repulsion forces did not dominate anymore. Moreover, when the solids were much larger than the oil droplets, the emulsion acted as a continuous phase towards the solids, and the interaction between the solids and the oil droplets became negligible (Masmoudi et al., 2005).

As for initial state and during room temperature aging, G' values for F-N2 are higher than for F-N1. Evolution of rheological parameters and particle sizes are similar but delayed for F-N2 (Table 4). The fact that F-N2 was less fluid when compared to F-N1 might explain that the diffusion of nanoparticles in the emulsion was slower and therefore the aggregation phenomenon arose later. These observations point out general coating-dependent effects.

4. Conclusion

The impact of two TiO_2 nanoparticles, differing from their surface coating, in a cosmetic oil-in-water emulsion has been investigated. To this end, O/W emulsions have been developed at lab-scale, and the physicochemical behavior of the emulsions, with and without nanoparticles, has been examined at initial state and during aging. The whole results demonstrate that the presence of nanoparticle in O/W systems does not only affect the characteristics of emulsions at initial state, but also markedly governs its evolution over time. Particle size measurements, rheological properties and microscopic observations allowed evidencing that the presence of nanoparticles affected the initial microstructure of the emulsion by modifying the oil droplet size distribution. Indeed, the nature of the particle's coating *alumina* (and) *triethoxycaprylylsilane* (coating 1), and *alumina* (and) *isopropyl titanium triisostearate* (and) *triethoxycaprylylsilane crosspolymer* (coating 2) respectively, strongly affected the particle–droplets interactions and thus modified the emulsion microstructure in terms of particle aggregation and rheological properties. During accelerated aging, it is obvious that the destabilization phenomena of the emulsions were mainly related to the nanoparticles. Oil droplets coalescence was observed without nanoparticles whereas nanoparticles aggregation was evidenced in the presence of TiO_2. In the presence of nanoparticles, the kinetic of destabilization appeared coating-dependant but the mechanism remained unchanged. As we did not work with commercial sunscreens, unlike studies that focused on similar destabilization mechanisms but in an environmental context (Botta et al., 2011), our knowledge of the emulsion process and our control of the ingredients enabled us to clarify the role of nanoparticles in such a formulation. In all cases, nanoparticles coating appears of primary importance as it governs the emulsion properties at both initial and aged times. Further investigations are in progress to characterize coated nano-sized TiO_2/emulsion interactions and nanoparticle surface modifications during aging. These results will allow us to perform and fully interpret the role of nanoparticles in a coming *in vitro* toxicological risk assessment.

References

Abismail, B., Canselier, J.P., Wilhelm, A.M., Delmas, H., Gourdon, C., 1999. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. Ultrason. Sonochem. 6, 75–83.

Aldous, G., Kent, P., 2013. Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Sunscreen Formulations: A Study of the Post Production Particle Size Distribution of Particles in a Range of Commercial Emulsion Variants, http://www.hamiltonlabs.com.au/webdata/resources/files/Hamilton_Sunscreen_Nanoparticles_Paper.pdf. Last access: 19/07/2013.

Binks, B.P., Desforges, A., Duff, D.G., 2007. Synergistic stabilization of emulsions by a mixture of surface-active nanoparticles and surfactant. Langmuir 23, 1098–1106.

Botta, C., Labille, J., Auffan, M., Borschneck, D., Miche, H., Cabié, M., Masion, A., Rose, J., Bottero, J.Y., 2011. TiO_2-based nanoparticles released in water from commercialized sunscreens in a life-cycle perspective: structures and quantities. Environ. Pollut. 159, 1543–1550.

Delrieu, P., Shao, Y., 2013. Particle Size Measurement of Attenuation Grade Titanium Dioxide in Dispersion and in Sunscreen Lotion. Kobo Products, http://www.koboproductsinc.com/Downloads/PS-Measurement-Poster-V40.pdf. Last access: 19/07/2013.

Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., 1997. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. FEBS Lett. 418, 87–90.

Hyun, K., Kim, S.H., Ahn, K.H., Lee, S.J., 2002. Large amplitude oscillatory shear as a way to classify the complex fluids. J. Non-newtonian Fluid Mech. 107, 51–65.

Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V., 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of tio2 particulates the contribution of physicochemical characteristics. Part. Fibre Toxicol. 6, 1–27.

Kobo, 2012. Triethoxycaprylylsilane Treatment Technical Literature ref 11S-002.

Labille, J., Feng, J., Botta, C., Borschneck, D., Sammut, M., Cabie, M., Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., 2010. Aging of TiO_2 nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. Environ. Pollut. 158, 3482–3489.

Lewicka, Z.A., Benedetto, A.F., Benoit, D.N., Yu, W.W., Fortner, J.D., Colvin, V.L., 2011. The structure, composition, and dimensions of TiO2 and ZnO nanomaterials in commercial sunscreens. J. Nanopart. Res. 13, 3607–3617.

Masmoudi, H., Dréau, Y.L., Piccerelle, P., Kister, J., 2005. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. Int. J. Pharm. 289, 117–131.

Nanotechnology, 2013. Project on Emerging Nanotechnologies, http://www.nanotechproject.org/. Last access: 19/07/2013.

Pichot, R., Spyropoulos, F., Norton, I.T., 2010. O/W emulsions stabilised by both low molecular weight surfactants and colloidal particles: the effect of surfactant type and concentration? J. Colloid Interface Sci. 352, 128–135.

Popov, A., Priezzhev, A., Lademann, J., Myllylä, R., 2005. TiO_2 nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in Sunscreens. J. Phys. D: Appl. Phys. 38, 2564–2570.

Serpone, N., Dondi, D., Albini, A., 2007. Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare products. Inorg. Chim. Acta 360, 794–802.

Tabilo-Munizaga, G., Barbosa-Cánovas, G.V., 2005. Rheology for the food industry. J. Food Eng. 67, 147–156.

Tadros, T., 2004. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. Adv. Colloid Interface Sci. 108–109, 227–258.

Tadros, T., 2010. Rheology of Dispersions – Principles and Applications. Wiley – VCH.

Tan Hsiao, W., 2009. Rheology and Stability of Olive Oil Cream Emulsion Stabilized by Sucrose Fatty Acid Esters Nonionic Surfactants. Faculty of Science, University of Malaya, M.C.S. Dissertation.

Utilisation des nanoparticules de TiO_2 en formulation cosmétique
Impact sur la santé humaine et l'environnement

Le dioxyde de titane, composé minéral très utilisé dans les produits cosmétiques de protection solaire, est depuis peu incorporé sous forme de nanoparticules, ce qui suscite des interrogations sur les risques sanitaires induits. Nous avons élaboré un protocole d'émulsions huile-dans-eau permettant l'incorporation de nanoparticules de TiO_2 à différents pourcentages (2,5-10%) et présentant deux traitements de surface hydrophobes distincts : un coating *hybride isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane* et un coating *triethoxycaprylylsilane*. L'incorporation des nanoparticules permet de conserver la structure microscopique de l'émulsion et dans le même de temps de renforcer les propriétés rhéologiques. Les analyses physico-chimiques ont montré que l'état de floculation initial des émulsions est coating-dépendant. A 50°C, les émulsions se déstabilisent au cours du temps jusqu'à une agrégation très marquée des nanoparticules, et ce moins rapidement pour le coating hybride. Les formulations avec et sans nanoparticules sont légèrement cytotoxiques, avec un effet plus marqué pour les fortes concentrations en TiO_2 et après vieillissement de 40 jours à hautes températures. Nous avons démontré que l'état de surface des nanoparticules extraites des formulations est modifié au cours du vieillissement par une adsorption de certains constituants de l'émulsion à la surface des nanoparticules. Ces nanoparticules modifiées sont plus cytotoxiques que les nanoparticules brutes. Les mécanismes de vieillissement induisent donc la libération de résidus de nanomatériaux plus toxiques que leur état initial, et pourraient conduire à un risque sanitaire pour l'homme l'environnement.

Mots-clefs : Emulsion, dioxyde de titane, caractérisation physico-chimique, déstabilisation, vieillissement, nanoparticules de grade cosmétique, traitement de surface, cytotoxicité, adsorption

Use of TiO_2 nanoparticles in cosmetic formulations
Impact on human health and environment

Titanium dioxide, the most commonly used mineral compound in cosmetic sunscreen products, has recently been incorporated in the form of nanoparticles, which raises health issues. We have developed a protocol of oil-in-water emulsions that enables the incorporation of different amount (2.5-10%) of TiO_2 nanoparticles coated with two distinct hydrophobic surface treatments: an *isopropyl titanium triisostearate / triethoxycaprylylsilane* hybrid coating and a *triethoxycaprylylsilane* coating. The incorporation of nanoparticles preserves the microscopic structure of the emulsion while enhancing the rheological properties. Physico-chemical analyses showed that the initial state of flocculation of the emulsions is coating-dependant. At 50°C, emulsions destabilize over time until a strong aggregation of nanoparticles, in a delayed way for the hybrid coating. Formulations with and without nanoparticles appear slightly cytotoxic, with an enhanced effect for high amount of TiO_2 and for a 40 days aging at high temperatures. We have shown that the surface of nanoparticles extracted from the formulations has been modified during aging, due to an adsorption of chemicals of the emulsion to the nanoparticle surface. Such modified nanoparticles become more cytotoxic if compared to raw nanoparticles. Aging mechanisms can therefore release nanomaterials residues with an increased toxic activity compared to their initial state, and thus could lead to health hazard for humans and for the environment.

Keywords: emulsion, titanium dioxide, physico-chemical characterization, destabilization, aging, cosmetic grade nanoparticles, coating, cytotoxicity, adsorption