

Université de Montréal

Agents actifs toxiques dans les produits éclaircissants et leurs impacts sur le microbiome cutané humain

Par

Mètogbé Honoré Gbetoh

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences biologiques

Avril 2016

© Mètogbé Honoré Gbetoh, 2016

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Agents actifs toxiques dans les produits éclaircissants et leurs impacts sur le microbiome
cutané humain**

Présenté par :

Mètogbé Honoré Gbetoh

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jesse Shapiro, président-rapporteur

Marc Amyot, directeur de recherche

Dolors Planas, membre du jury

Résumé

Les produits cosmétiques sont des substances utilisées pour entretenir ou modifier l'aspect des parties superficielles du corps humain (telles que la peau, les ongles ou les cheveux). Dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie et dans certaines communautés africaines immigrantes, plusieurs femmes et parfois des hommes utilisent des produits contenant des agents actifs tels que le mercure, l'hydroquinone et le propionate de clobétasol pour éclaircir leur peau. Ces principaux agents sont toxiques et leur présence dans les cosmétiques est réglementée, voire interdite, dans plusieurs pays. Dans notre étude, nous avons déterminé les concentrations de ces ingrédients dans plusieurs produits utilisés en Afrique de l'Ouest et au Canada. Nous avons également exploré l'effet de ces produits sur le microbiome cutané. Nos résultats révèlent que 68 à 84% des crèmes et 7.5 à 65% des savons dépassent les normes lorsqu'on considère l'interdiction de mercure, d'hydroquinone et de propionate de clobétasol et les concentrations déclarées sur les étiquettes ne sont pas souvent fiables. Selon la diversité de Shannon, il semble y avoir plus d'équitabilité, et donc moins de dominance dans le groupe des femmes utilisant les crèmes éclaircissantes que dans le groupe des femmes qui ne les utilisent pas. Par ailleurs, nous n'avons pas trouvé de différences significatives au niveau du microbiome cutané du groupe avec crèmes et sans crèmes au niveau du phylum et du genre. Cependant, d'autres méthodes plus approfondies avec plus d'échantillonnage pourraient révéler à des échelles plus fines (espèces, souches, etc.) l'effet de ces produits sur le microbiome cutané.

Mots-clés : crèmes, savons, peau, toxiques, microbiome

Abstract

Cosmetics are substances used to maintain or change the appearance of external parts of the human body (such as skin, nails or hair). In many countries of Africa and Asia and in some immigrant African communities, many women and sometimes men use products containing active agents such as mercury, hydroquinone and clobetasol propionate to lighten their skin. These main active agents are toxic and their presence in cosmetics is regulated or even banned in several countries. In our study, we determined the concentrations of these ingredients in many products used in West Africa and Canada. In addition, we also explored the effect of these products on the skin microbiome. Our results reveal that 68 to 84% of cream and 7.5 to 65% of soaps exceed the standards when considering mercury, hydroquinone and clobetasol propionate ban in lightening products and concentrations of the three compounds declared on labels of soaps and creams usually did not correspond to concentrations actually measured. According to Shannon diversity index, there seems to be more evenness, less dominance in group of African women with creams than in those without cream. Moreover, we have not found significant differences in the skin microbiome of the group with creams and the one without creams at the phylum and genus level. However, additional detailed studies with more sampling methods could reveal at finer scales (species, strains, etc.) the effect of these products on the human skin microbiome.

Keywords: creams, soaps, skin, toxics, microbiome

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et des abréviations.....	ix
Remerciements.....	x
Chapitre 1 : Introduction générale.....	11
1.1 Contexte de l'étude.....	11
1.2. Les produits éclaircissants la peau.....	12
1.2.1 Définition.....	12
1.2.2. Utilisation.....	12
1.3. Les agents actifs contenus dans les produits éclaircissants.....	13
1.3.1 Le mercure.....	13
1.3.2 L'hydroquinone.....	14
1.3.3. Le propionate de clobétasol.....	15
1.3.4. Règlementation.....	16
1.4. Les mécanismes d'action des produits éclaircissants la peau.....	18
1.4.1. Rappels sur la structure et les fonctions de la peau.....	18
1.4.2. Synthèse et transfert de la mélanine.....	19
1.4.3. Cibles d'inhibition des agents actifs éclaircissants.....	19
1.5. Les produits éclaircissants et le microbiome cutané.....	21
1.5.1 Définition du microbiome cutané.....	21
1.5.2. Rôle du microbiome cutané.....	22
1.5.3. Facteurs susceptibles de contrôler le microbiome cutané.....	22
1.6. Objectifs de l'étude.....	25
1.7. Organisation du mémoire.....	27

Chapitre 2: Mercury, hydroquinone and clobetasol propionate in skin lightening products in West Africa and Canada	29
2.1. Abstract	30
2.2. Introduction	30
2.3. Materials and Methods	34
2.3.1. Sampling of skin lightening personal care products	34
2.3.2. Mercury analyses	35
2.3.3. Hydroquinone analyses	36
2.3.4. Clobetasol Propionate analyses	36
2.3.5. Determination of impurities	37
2.3.6. Statistical analyses	37
2.4. Results	38
2.4.1. Concentrations of active ingredients in soaps and creams	38
2.4.2. Accuracy of labeling information	40
2.5. Discussion	42
2.5.1. Are concentrations of toxic ingredients found in skin-lightening products of concern?	42
2.5.2. Are labels of skin-lightening product accurate?	44
2.6. Conclusion	45
2.7. Tables	46
2.8. Figures	48
2.9. Acknowledgements	51
Chapitre 3 : Crèmes éclaircissantes et microbiome cutané des femmes d'origine africaine vivant au Canada	52
3.1. Résumé	53
3.2. Introduction	54
3.3. Matériels et Méthodes	57
3.3.1. Prélèvement et recrutement des participantes	57
3.3.2. Extraction de l'ADN	59
3.3.3. Amplification de la PCR	60

3.3.4. Analyses statistiques	62
3.4. Résultats et Discussion	63
3.4.1. Abondance relative (niveau phylum et genre) :	64
3.4.2. Diversité Alpha	66
3.4.3. Diversité Bêta.....	67
3.5. Conclusion	69
3.6. Figures.....	71
3.7. Remerciements.....	74
Chapitre 4: Conclusion	75
Bibliographie.....	79
Annexes A. Informations supplémentaires du chapitre 2	i

Liste des tableaux

Table II.I. Frequencies of exceedance of regulatory guidelines for all ingredients tested according to different standards and considering the ban of non-prescription products. Definition of categories: considering bans: Exceedance frequency of all ingredients considering the ban of a toxic ingredient in non-prescription products; not considering bans: Exceedance frequency of all ingredients considering the thresholds used for products available with a medical prescription.....	46
Table II.II. Concentration of mercury, hydroquinone and clobetasol propionate in lightening products purchased from various countries.	47
Table A.I. Kruskal–Wallis nonparametric and Tukey's multiple comparisons tests on concentrations of active ingredients in products from West Africa and Canada.....	i
Table A.II. Acceptable impurities in the case of banned substances*.....	ii
Table A.III. Threshold values, for different regulations, when considering acceptable impurities.	v
Table A.IV. Frequencies of exceedance of guidelines by more than one ingredient in a given product.	vi
Table A.V. Percentage of products (creams or soaps) exceeding regulatory guidelines for Hg, of HQ or of PC published in other studies.....	vii

Liste des figures

Figure 1.1. Schéma simplifié illustrant la synthèse de la mélanine	20
Figure 2.1. Boxplot showing (in $\mu\text{g Hg/kg}$) minimum, median, maximum concentrations and 25 th , 75 th of \log_{10} (Hg) for mercury in soap (a) and cream (b) in different countries in West Africa and Canada. Dotted line represents the US FDA threshold of 1 $\mu\text{g Hg /g}$. Boxplot showing (in %, w/w) minimum, median, maximum values and 25 th , 75 th of % (w/w) for hydroquinone in cream (c) in different countries in West Africa and Canada. Dotted line represents the US FDA threshold of 2% hydroquinone, w/w. Boxplot showing (in % w/w) minimum, median, maximum values and 25 th , 75 th of % (w/w) for clobetasol propionate in cream (d) in different countries in West Africa and Canada. Dotted line represents the US FDA threshold of 0.05% clobetasol propionate, w/w. Solid lines represent acceptable impurity thresholds (see section 2.3.5.).....	48
Figure 2.2. Histograms showing (a) the number of creams and soaps bought by country and (b) frequencies of exceeded toxicity thresholds by country, using US FDA standards not considering bans of PC.	49
Figure 2.3. Scatter plot showing correlations between mercury concentrations observed on the labels and mercury concentrations measured in creams and soap (a) ; Scatter plot showing correlations between hydroquinone concentrations observed on packaging of the labels and hydroquinone concentrations measured in creams (b) ; Scatter plot showing correlations between clobetasol propionate concentrations observed on packaging of the labels and clobetasol propionate concentrations measured in creams (c) . The gray area represents a margin of $\pm 10\%$ confidence around the declared value.....	50
Figure 3.1. Distribution relative des phylums et genres principaux dans les échantillons des femmes d'origine africaine, séparés selon les groupes « crèmes blanchissantes » et « sans crèmes blanchissantes ».....	71
Figure 3.2. Diversité alpha, selon trois métriques (# d'OTUs, chao1 et Shannon) au sein des échantillons de femmes d'origine africaine avec ou sans crèmes éclaircissantes.	72
Figure 3.3. Analyses en composantes principales des échantillons de femmes d'origine africaine avec ou sans crèmes éclaircissantes.....	73

Figure A.1. Determination of acceptable impurities in cases Hg is banned in creams..... iii
Figure A.2. Determination of acceptable impurities in cases Hg is banned in soaps iii
Figure A.3. Determination of acceptable impurities in cases HQ is banned in creams..... iv

Liste des sigles et des abréviations

ACP : analyses en composantes principales

EU : Union Européenne

FDA US : agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

Hg : mercure

Hg²⁺ : mercure divalent

HgT : mercure total

HPLC : *high performance liquid chromatography* (chromatographie liquide haute performance)

HQ : hydroquinone

OTUs : *operational taxonomic units* (unités taxonomiques opérationnelles)

PC : propionate de clobétasol

PCR : *polymerase chain reaction* (Réaction de polymérisation en chaîne)

Remerciements

Ce projet a été réalisé grâce au soutien financier du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) du Canada et celui de la Banque Islamique de Développement (BID) sous la supervision du Professeur Marc Amyot. Marc est un professeur passionné, et vraiment patient, qui apporte tout le soutien nécessaire à ses étudiants. Je tiens à le remercier pour tout le soutien qu'il m'a accordé lors de ma maîtrise sans lequel ce travail ne serait pas terminé.

Je tiens également à remercier Dominic Bélanger pour m'avoir initié sur des appareils à la fine pointe et pour toute son aide au laboratoire. Je dis un grand merci à tous les membres finissants et actuels du laboratoire Amyot avec qui j'ai passé de très bons moments. Je dis aussi un merci spécial à Catherine Girard, l'accro du microbiome. Merci à vous tous!

Je remercie enfin ma famille, mes parents, mes amis et toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont aidé lors de ma maîtrise. Merci à vous!

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1 Contexte de l'étude

Les produits cosmétiques sont des substances utilisées pour entretenir ou modifier l'aspect des parties superficielles du corps humain (telles que la peau, les ongles ou les cheveux). Dans certains pays d'Afrique et d'Asie et dans certaines communautés africaines immigrantes, une proportion importante de la population adulte féminine utilise régulièrement certains produits cosmétiques pour éclaircir leur peau. Ces produits agissent sur la peau grâce à des agents actifs puissants tels que le mercure, l'hydroquinone ou le propionate de clobétasol. Cependant, la littérature actuelle contient peu de données sur l'influence directe ou indirecte de ces ingrédients actifs sur la communauté microbienne cutanée. Dans notre projet de maîtrise, nous nous sommes particulièrement focalisés sur les produits éclaircissants utilisés par les femmes dans certains pays d'Afrique de l'Ouest et au Canada, afin de caractériser de façon exhaustive la concentration des principaux agents actifs toxiques que l'on retrouve dans ces produits et d'étudier leurs effets sur la microflore cutanée des personnes qui les utilisent.

Dans cette introduction, nous allons successivement faire une revue de littérature sur les principaux agents toxiques que l'on retrouve dans les produits éclaircissants. Par la suite, nous allons faire quelques rappels sur la peau, sa fonction et les mécanismes par lesquels les produits éclaircissants agissent sur la formation et le transfert de la mélanine. Finalement, nous parlerons du microbiome cutané et des différents facteurs susceptibles de l'influencer.

1.2. Les produits éclaircissants la peau

1.2.1 Définition

Les produits éclaircissants la peau sont des produits utilisés généralement par les femmes de façon volontaire dans plusieurs pays pour diminuer la pigmentation mélanique de la peau. Les propriétés de ces produits auraient été découvertes fortuitement chez des ouvriers afro-américains travaillant dans l'industrie du caoutchouc aux USA. Les premières études portant sur ces produits ont été réalisées par Barr et al. (1972) à Nairobi. Par la suite, ces études ont été renforcées au Mali puis au Sénégal par Mahé et al. (1993) et par Mahé et al. (2004). Les produits utilisés pour blanchir la peau sont nombreux et peuvent être de différentes formes: crèmes, gels, lotions ou savons. Il peut aussi s'agir de crèmes médicamenteuses détournées de leur usage médical premier, ou bien de mélanges de produits d'usage courant (Hecquet, 2006).

1.2.2. Utilisation

Une proportion importante de femmes et parfois d'hommes utilise les produits pour éclaircir la peau dans plusieurs pays à travers le monde. Cependant, ces produits sont particulièrement utilisés dans les pays d'Afrique (Afrique du Sud, Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Congo, Kenya, Mali, Nigéria, Sénégal, Tanzanie, Togo, Zimbabwe), d'Asie (Inde, Philippines, Hong Kong, Vietnam, Malaisie) et au sein des communautés immigrantes d'origine Africaine (France, Belgique, Italie). Des études rapportent également leur utilisation au Moyen Orient (Arabie Saoudite), dans la région des Caraïbes et en Amérique du Nord. Selon des études menées dans certains pays d'Afrique de l'Ouest, l'utilisation des produits pour éclaircir la peau

prend une proportion de plus en plus élevée (entre 26 à 67% de la population adulte féminine) (Dadzie and Petit, 2009). C'est une pratique qui a été rapportée pour la première fois en Afrique de l'Ouest par Marchand and N'Diaye (1975) puis au Mali et au Togo par Mahé et al. (1993). Elle est appelée « *xessal* » au Sénégal, « *tchaTcho* » au Mali, « *Boju* » au Bénin. La composition des produits utilisés (ingrédients actifs des produits), pourtant de différentes natures, n'est pas forcément connue des utilisateurs.

1.3. Les agents actifs contenus dans les produits éclaircissants

Plusieurs études ont montré que le mercure, l'hydroquinone, et les corticostéroïdes (tels que le propionate de clobétasol) sont les ingrédients actifs couramment rencontrés dans les produits destinés à éclaircir la peau (Maneli et al., 2015, Al-Saleh et al., 2012, Nam et al., 2011, Del Giudice et al., 2003).

1.3.1 Le mercure

Le mercure inorganique est la forme de mercure couramment retrouvée dans les produits éclaircissants. C'est un polluant toxique pouvant traverser la barrière cutanée. Lorsqu'il est en contact avec la peau, il entre en compétition avec le cuivre, inhibe l'activité de la tyrosinase et supprime la synthèse de la mélanine (Engler, 2005). Bien que l'absorption percutanée du mercure soit relativement faible, les utilisateurs peuvent être exposés au mercure inorganique après une utilisation prolongée. L'absorption percutanée du mercure dépend non seulement de l'anatomie et de la physiologie de la peau, mais aussi de l'hydratation du stratum corneum (la couche la plus superficielle de l'épiderme), de la concentration et du temps d'absorption (Palmer et al., 2000a). Baranowska - dutkiewicz (1982) avaient indiqué qu'une grande quantité de

mercure peut traverser la barrière cutanée après application d'une solution de chlorure mercurique (HgCl_2). Cette étude a été confirmée par Chan (2011). L'étude réalisée par Daian et al. (1995), indiquait également que l'absorption épidermique du mercure inorganique pour une exposition de 30 heures cesse et devient stationnaire au bout de 12 heures. Le mercure inorganique se concentre principalement dans les reins en particulier dans les régions tubulaires où des lésions sont observées après des applications cutanées répétées. L'exposition prolongée à de faibles doses de mercure peut provoquer des effets neurotoxiques, la protéinurie et le syndrome néphrotique (Al-Saleh et al., 2005, Engler, 2005).

1.3.2 L'hydroquinone

L'hydroquinone semble être l'un des ingrédients actifs les plus utilisés actuellement dans les produits éclaircissants (Dadzie and Petit, 2009, Mahe et al., 2007, Petit et al., 2006). C'est un métabolite majeur du benzène qui peut induire des effets hémato-toxique et cancérigène (Enguita and Leitao, 2013). C'est un produit ubiquitaire largement répandu dans l'environnement du fait de son utilisation industrielle et humaine (Enguita and Leitao, 2013, McGregor, 2007). Il est naturellement présent dans de nombreuses plantes, dans le caféier, le théier ainsi que dans la bière et le vin (Enguita and Leitao, 2013). Son effet dépigmentant a été découvert par hasard chez des ouvriers afro-américains travaillant dans l'industrie de caoutchouc aux États-Unis vers les années 1960 (Hecquet, 2006). Ce composé phénolique a été également utilisé comme agent éclaircissant pour le traitement de certaines affections bénignes de la peau comme le mélasma, l'hyperpigmentation post-inflammatoire et d'autres troubles de l'hyperpigmentation (Parvez et al., 2006). Son absorption percutanée augmente en présence de l'alcool. In vitro, il traverse la peau du rat deux fois plus rapidement que le stratum corneum

humain (McGregor, 2007). Après absorption, l'hydroquinone se distribue largement dans les tissus et est métabolisée dans le foie et le tractus gastro-intestinal en 1-4 benzoquinone et d'autres composées oxydés tels que le 1,2,4-benzotriol observé dans les urines de rat (Kooyers and Westerhof, 2005). Son utilisation dans les produits éclaircissants est réglementée dans plusieurs pays.

1.3.3. Le propionate de clobétasol

Les crèmes corticostéroïdiennes sont normalement des médicaments utilisés pour traiter les affections de la peau (Dadzie and Petit, 2009). Le propionate de clobétasol appartient à la classe des médicaments topiques (crèmes ou pommades appliquées sur la peau) appelés corticostéroïdes (ou stéroïdes) permettant de traiter les affections cutanées telles que l'eczéma ou le psoriasis. En fait, les corticostéroïdes semblent imiter la cortisone (hormone présente naturellement dans l'organisme), mais le mécanisme par lequel ils jouent leur rôle anti-inflammatoire est un peu complexe et n'est pas encore clairement connu (Wiedersberg et al., 2008). Toutefois, la dépigmentation est l'un des effets secondaires de l'utilisation de ces crèmes corticostéroïdiennes. C'est pourquoi elles sont quelques fois détournées de leur usage normal et utilisées pour blanchir la peau dans plusieurs pays au monde notamment les pays d'Afrique de l'Ouest.

1.3.4. Règlements

Plusieurs instances de réglementation nationale et internationale se sont essentiellement basées sur les résultats d'effets toxiques des ingrédients actifs tels que le mercure, l'hydroquinone et le propionate de clobétasol pour limiter la concentration de ces ingrédients dans les produits cosmétiques. Ces législations varient parfois d'un pays à l'autre ou d'une région à une autre.

Dans le cas des produits à hydroquinone, ces derniers sont officiellement interdits dans l'Union Européenne depuis janvier 2001 (EU, 2009) mais plusieurs études rapportent qu'ils sont encore en vente libre avec des concentrations parfois élevées. Au niveau américain, la US FDA avait proposé en 1982 une monographie indiquant que les produits sans prescription (OTC; «*over the counter*») éclaircissants la peau contenant 1,5 à 2% d'hydroquinone étaient reconnus comme généralement efficaces et sans danger. Après avoir considéré les nouvelles données disponibles sur l'innocuité de l'hydroquinone, elle a par la suite publié une autre proposition en 2006 retirant par précaution et non par certitude celle de 1982 qui reconnaît 1,5 à 2% dans les OTC à hydroquinone (US FDA, 2016). Cette nouvelle décision de US FDA n'a pas été acceptée par les dermatologues évoquant l'efficacité de même que les nombreux avantages à utiliser ces produits et la rareté aux USA de l'ochronose exogène qui est une affection liée à une utilisation prolongée des produits à base d'hydroquinone et très répandus en Afrique où l'hydroquinone est utilisée souvent à fortes concentrations (Levitt, 2007, US FDA, 2009). Puisque les données disponibles sont insuffisantes pour permettre de déterminer les risques de ces produits sur l'humain, ils sont encore actuellement en vente libre aux USA et la concentration de 2% (que

nous avons utilisée dans cette étude) semble un modèle de norme utilisée encore dans plusieurs pays africains (Ivory Coast, 2015, Maneli et al., 2015, Agorku et al., 2016).

Quant au mercure, il est totalement interdit non seulement dans les cosmétiques vendus dans l'Union Européenne mais aussi dans les produits éclaircissants vendus dans certains pays en développement comme la Côte d'Ivoire (EU, 2009, Ivory Coast, 2015). Par ailleurs, Santé Canada autorise jusqu'à 1 µg/g de mercure dans les produits cosmétiques comme impuretés acceptables (Hc-sc.gc.ca, 2016) . La US FDA des États-Unis autorise jusqu'à 1 µg/g de mercure dans les produits cosmétiques vendus aux États-Unis (US FDA, 2016).

Enfin, la plupart de ces réglementations considèrent que les crèmes à propionate de clobétasol sont normalement des crèmes médicamenteuses et devraient être vendues sous prescription médicale à une concentration maximale de 0,05%. Ces différences entre les législations indiquent donc clairement les différences entre les standards et nous permettent également de remarquer que certaines législations sont plus strictes que d'autres.

1.4. Les mécanismes d'action des produits éclaircissants la peau

1.4.1. Rappels sur la structure et les fonctions de la peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain. Elle a une surface d'environ 2 m² et une masse d'environ 5 kilogrammes. Son épaisseur moyenne est de 2 à 3 millimètres. Elle varie de 1 mm au niveau des paupières à 4 mm au niveau des paumes et des plantes des pieds (Dréno, 2008). Elle assure une fonction de protection des tissus et des organes internes contre la plupart des agressions extérieures, physiques, chimiques, électromagnétiques (rayons solaires) et infectieuses. Elle joue également un rôle de thermorégulation et d'échanges (entrée et sortie de l'eau grâce à sa perméabilité, élimination de la sueur). Par sa fonction sensorielle, la peau est le siège du toucher et permet une adaptation au milieu environnant. C'est un organe jouant également des fonctions métaboliques, dont la synthèse de la vitamine D sous l'influence des rayonnements ultraviolets (Dréno, 2008). Sur le plan structural, elle est constituée d'une partie superficielle externe qui constitue l'épiderme et d'une partie interne qui constitue le derme et l'hypoderme. L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié (constitué de plusieurs assises cellulaires et de couches aplaties) composé essentiellement de kératinocytes (80%), de mélanocytes (5 à 10%), de cellules de Langerhans (3 à 8%) et de cellules de Merkel (2 à 5 %). La pigmentation de la peau a lieu dans des cellules spécialisées appelées mélanocytes qui sont localisées, chez l'adulte, dans la couche basale de l'épiderme (Yamaguchi et al., 2007). Ce sont des cellules de grande taille contenant des mélanosomes, organites intracellulaires responsables de la synthèse de la mélanine.

1.4.2. Synthèse et transfert de la mélanine

La mélanine est un mélange de polymères hétérogènes qui déterminent la couleur de la peau humaine, des cheveux et des yeux (Dréno, 2008). La mélanogenèse est le processus biologique par lequel se font la synthèse, la distribution et le transfert des mélanines dans l'épiderme. La mélanine est synthétisée dans les mélanocytes, précisément dans les mélanosomes (Delevoe et al., 2011a). Les mélanosomes dérivent des mélanoblastes qui sont des cellules indifférenciées précurseurs des mélanocytes. On distingue deux types de mélanines: **les eumélanines**, brunes ou noires, présentes chez tous les mammifères, qui sont des molécules très polymérisées, contenant peu de soufre; et **les phaeomélanines**, jaune-orange, qui contiennent beaucoup de soufre dérivant de la cystéine et moins polymérisées (Dréno, 2008). Les mélanocytes possèdent des expansions cytoplasmiques appelées « dendrites mégalocytaires » qui leur permettent de rentrer en contact avec les kératinocytes de la couche épineuse. Chaque mélanocyte est en relation avec environ 40 kératinocytes, formant ainsi une « unité épidermique de mélanisation » (Delevoe et al., 2011b).

1.4.3. Cibles d'inhibition des agents actifs éclaircissants

Selon plusieurs auteurs, l'inhibition de la tyrosinase (enzyme contenant du cuivre) suffirait à inhiber la mélanogenèse (Parvez et al., 2006). Cependant, le processus de la pigmentation est un peu complexe et il est difficile de s'attaquer clairement à une seule étape (Parvez et al., 2006). En effet, la pigmentation peut être inhibée soit en utilisant des inhibiteurs de la mélanogenèse (depuis l'initiation de la mélanogenèse jusqu'à l'élimination du pigment)

ou soit en utilisant des inhibiteurs de la tyrosinase. La plupart des composés soufrés sont des inhibiteurs de la mélanogénèse. Ils réagissent avec la DOPAquinone pour former des produits incolores, ce qui ralentit le rythme de production de la mélanine. Par contre, les composés phénoliques ont une forte affinité pour la tyrosinase (Parvez et al., 2006). C'est le cas de l'hydroquinone.

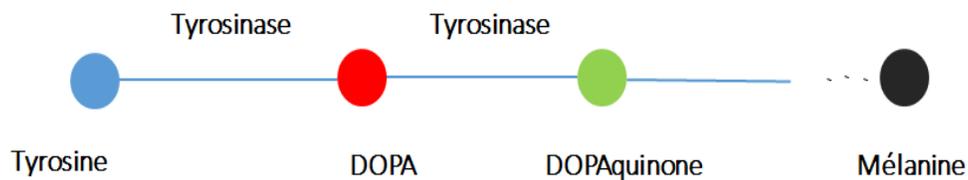


Figure 1.1. Schéma simplifié illustrant la synthèse de la mélanine

En fait, l'hydroquinone est un agent actif efficace qui se lie de manière réversible à la tyrosinase et réduit sa capacité catalytique. Ainsi, à la place de la tyrosine qui devrait être transformée en mélanine, l'hydroquinone est métabolisée en quinones et radicaux libres. Ces derniers s'attaqueraient aux membranes des mélanocytes qu'elles déstabilisent, exerçant ainsi une activité mélanotoxique. Quant au mercure, il entre en compétition avec le cuivre nécessaire au déclenchement de l'activité de la tyrosinase et se combine à la structure protéique de cette enzyme (Engler, 2005). Il a ainsi une action inhibitrice sur la synthèse de la DOPA puis de la DOPA-quinone. Les crèmes corticostéroïdiennes ont des propriétés anti-inflammatoires, antiprurigineuses, et vasoconstrictrices. Les mécanismes de l'activité anti-inflammatoire des crèmes corticostéroïdes topiques sont en général peu clairs. Cependant, il semble que ces molécules ont une forte affinité pour les récepteurs spécifiques des kératinocytes et des

mélanocytes causant par la suite un effet dépigmentant (Roguedas-Contios and Garcia-Le Gal, 2005). Ils peuvent avoir de nombreux effets néfastes sur la santé des utilisateurs (Fanny et al., 2014, Sene et al., 2008, Mahe et al., 2007). On remarque donc que le but des agents actifs contenus dans les produits éclaircissants est soit d'inhiber la mélanogenèse, soit d'inhiber la tyrosinase qui sont toutes deux importantes dans la pigmentation de la peau. Toutefois, l'impact potentiel de ces ingrédients sur les bactéries de la peau pourtant importantes pour notre santé est souvent négligé. Dans la suite de notre introduction, nous nous attarderons sur la littérature existante sur la peau et son microbiome.

1.5. Les produits éclaircissants et le microbiome cutané

1.5.1 Définition du microbiome cutané

Le microbiome est «l'aire biotique» (aire de vie) du microbiote. Le microbiote désignant les espèces autrefois groupées sous le terme «microflore», c'est-à-dire celles qui prédominent et/ou sont durablement adaptées à la surface et à l'intérieur d'un organisme vivant. Récemment, des études utilisant les techniques indépendantes de la culture avaient montré que seulement 1 % de la communauté microbienne de la peau était connue ou isolée dans les conditions standards de laboratoire. Ce qui veut dire qu'il reste encore environ 99% de bactéries qu'on n'a jamais cultivées ou isolées sur la peau tout simplement parce qu'il est difficile de reproduire l'habitat naturel de ces microorganismes. Ces études ont montré que la plupart de ces microorganismes vivant à la surface de la peau cohabitent avec nous et jouent une multitude de rôles pour notre santé. Le microbiome de la peau est une véritable mosaïque de microorganismes qu'on retrouve partout sur la surface de la peau (Mokni and Abdelhak, 2014, Zeeuwen et al., 2013, Kong, 2011).

On y trouve des bactéries, des virus et même des levures. Les microorganismes commensaux vivant sur la peau peuvent faire partie d'une microflore résidante ou transitoire. Les microorganismes résidants se développent normalement sur la peau alors que les microorganismes transitoires y sont présents temporairement (Zeeuwen et al., 2013). Habituellement, les microorganismes transitoires ne se fixent pas fermement sur la surface de la peau (Zeeuwen et al., 2012). La plupart sont présents sur l'épiderme squameux superficiel, colonisant les cellules mortes ou étroitement associées aux glandes sébacées et sudoripares (Zeeuwen et al., 2012). Les excréments de ces glandes fournissent de l'eau, des acides aminés, de l'urée, des électrolytes, et des acides spécifiques servant d'éléments nutritifs pour ces bactéries (Scharschmidt and Fischbach, 2013, Roth and James, 1988).

1.5.2. Rôle du microbiome cutané

Le microbiome de la peau peut jouer plusieurs rôles pour notre santé et pour la santé de la peau. Il peut par exemple jouer un rôle de barrière en s'associant avec l'hôte pour lutter contre l'entrée de pathogènes. Il semble également jouer un rôle crucial dans le développement du système immunitaire. Il ne cause ni maladie, ni dysfonctionnement, dans les conditions normales (Sanford and Gallo, 2013).

1.5.3. Facteurs susceptibles de contrôler le microbiome cutané

Une multitude de facteurs peuvent contrôler l'équilibre microbien à la surface de la peau (Oh et al., 2014, Findley et al., 2013, Grice and Segre, 2012, Preti and Leyden, 2010, Schreml et al., 2010, Grice et al., 2009, Fierer et al., 2008, Roth and James, 1988). Ces facteurs peuvent limiter le type de microorganismes à un site spécifique de la peau d'un individu à un autre,

l'abondance de ces microorganismes, ou encore la vie de ces microorganismes. Ils peuvent aussi être bénéfiques ou néfastes pour les microorganismes de la microflore cutanée. Même s'il est difficile de prédire les mécanismes précis d'interaction de ces facteurs avec le microbiome de la peau, il est connu que le pH, l'hydratation, l'humidité, la génétique de l'hôte, le volume total de sébum et de sueur, le statut hormonal, ainsi que la distribution des glandes sudoripares eccrines (glandes intervenant dans la sécrétion et la réabsorption d'électrolytes) sont des facteurs pouvant contrôler les bactéries à la surface de la peau (Schreml et al., 2010, Roth and James, 1988).

Le pH moyen d'une peau normale est légèrement acide (4-5). Il peut varier d'une région de la peau à une autre avec par exemple un pH de 4,6 au niveau du front et un pH de 7 entre les orteils (Lambers et al., 2006). Cette variation physiologique du pH cutané peut avoir une influence sur la répartition des bactéries à la surface de la peau (Schreml et al., 2010). Il a été également montré que les régions corporelles les plus humides présentent des densités bactériennes importantes et sont généralement liées à un pH plus élevé (Roth and James, 1988). La faible humidité cutanée de la peau pourrait limiter la croissance de certains microorganismes, en particulier des bactéries à Gram négatif, sur une peau intacte. Selon Roth and James (1988), la sueur provenant des glandes apocrines et eccrines contient des protéines inhibitrices telles le lysozyme, une enzyme capable d'hydrolyser les parois cellulaires des bactéries à Gram positif et négatif. Les glandes sudoripares apocrines sont des annexes cutanées produisant et excréant un soluté riche en protéines, alors que les glandes sudoripares eccrines interviennent beaucoup plus dans la sécrétion et la réabsorption d'électrolytes. Il a été montré que les sites hydratés de la peau supportent une large densité de microorganismes et que le degré d'hydratation est corrélé à la densité et à l'activité de la grande eccrine (Roth and James, 1988). Plusieurs autres

substances peuvent contrôler les bactéries à la surface de la peau (Zeeuwen et al., 2012, Roth and James, 1988). Par exemple, les glandes sébacées sécrètent des lipides complexes qui peuvent être dégradés partiellement par les enzymes de certaines bactéries Gram positifs (*Propionibacterium acnes*). Ces bactéries peuvent changer les lipides secrétés en acides gras insaturés tel l'acide oléique qui ont une forte activité antimicrobienne sur les bactéries Gram négatives et les mycètes (Callewaert et al., 2014).

Le microbiome de la peau peut aussi être influencé par plusieurs facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques, la nature des vêtements portés ou encore l'utilisation des produits cosmétiques (Romano-Bertrand et al., 2015, Staudinger et al., 2011, Holland and Bojar, 2002). Ces produits peuvent directement ou indirectement influencer la microflore normale de la peau et par conséquent déplacer l'équilibre microbien à la surface de la peau. Nous pouvons imaginer plusieurs scénarios qui pourraient se produire dans le microbiome de la peau après une application des produits éclaircissants. Le premier scénario pourrait être une introduction dans le microbiome cutané des microorganismes contenu dans les produits éclaircissants. Ce scénario est très peu probable du fait de la réglementation dans plusieurs pays sur les bonnes pratiques de fabrication de ces produits. Par contre, il est important de noter que ces produits ne sont pas complètement stériles. Le deuxième scénario qui pourrait se produire dans le microbiome cutané est l'activation des agents de conservation contenus dans les produits éclaircissants une fois en contact avec les microorganismes de la peau. En effet, les agents de conservation qui normalement ont pour rôle de prolonger la durée de conservation des produits éclaircissants peuvent devenir actifs une fois appliqués sur la peau. Le troisième scénario qui pourrait se produire dans le microbiome cutané est l'interaction des ingrédients actifs contenus dans ces produits avec le microbiome cutané. Ces ingrédients actifs pouvant être

de différentes natures dans les produits éclaircissants (mercure, hydroquinone, propionate de clobétasol, etc.) peuvent interagir avec les facteurs contrôlant l'équilibre microbien cutané. Dans ce cas, le microbiome de la peau peut être affecté au cours de l'utilisation de ces produits. Jusqu'à ce jour, les mécanismes précis d'interaction de ces ingrédients actifs sur les facteurs contrôlant l'équilibre microbien cutané n'ont jamais été étudiés. Toutefois, il est important de noter qu'une utilisation à long terme des produits contenant des ingrédients actifs toxiques peut être néfaste pour les bactéries de la peau et par conséquent pour la santé de l'hôte (Bousslimani et al., 2015). Ce projet peut significativement améliorer la documentation de la contamination des crèmes éclaircissantes. Il sera également le premier à étudier comment les ingrédients actifs contenus dans les produits éclaircissants peuvent directement ou indirectement influencer le microbiome cutané des personnes utilisant ces produits pour blanchir la peau.

1.6. Objectifs de l'étude

Cette étude avait pour objectif général de contribuer à l'avancement des connaissances sur les effets de l'utilisation des produits éclaircissants sur la santé des personnes qui les utilisent. De façon plus précise, l'étude visait à caractériser les principaux agents actifs que l'on retrouve dans une grande variété de produits éclaircissants dans plusieurs pays d'Afrique et au Canada, et à étudier leur influence sur la communauté microbienne cutanée. Puisque les produits cosmétiques sont directement appliqués sur la peau, et que la peau est supposée jouer un rôle important pour la santé de notre santé à travers son système de défense immunitaire et à travers son microbiome, on peut penser que l'usage de cosmétiques contenant des agents actifs toxiques tels que le mercure, l'hydroquinone ou le propionate de clobétasol nous poserait des problèmes

de santé. Ce travail tente d'élucider l'impact potentiel de ces ingrédients et de comprendre les mécanismes par lesquels le mercure, l'hydroquinone ou le propionate de clobétasol peuvent directement ou indirectement influencer la communauté microbienne de la peau des femmes africaines vivant dans la ville de Montréal (Canada) et utilisant les produits éclaircissants. Nous avons aussi inclus dans cette étude une population témoin composée de femmes d'origine Africaine vivant à Montréal (Canada) et n'utilisant pas les produits éclaircissants. Globalement, deux grands objectifs ont été poursuivis lors de ce projet de maîtrise:

Le premier objectif était de déterminer les concentrations en mercure, en hydroquinone et en propionate de clobétasol dans une grande variété de produits éclaircissants utilisés par les femmes dans les pays d'Afrique de l'Ouest et au Canada. Nous avons également comparé nos résultats aux normes ou critères de différentes législations puisque ces dernières changent selon les pays ou selon les régions. Toujours dans ce premier volet de notre projet, nous nous sommes intéressés aussi à l'exactitude des concentrations des ingrédients actifs déclarées sur les étiquettes des produits éclaircissants afin de vérifier si celles-ci informent correctement ou non les utilisatrices.

Notre deuxième objectif était de caractériser le microbiome cutané des personnes utilisant les produits éclaircissants versus celui des personnes qui ne les utilisent pas afin d'explorer si l'usage de ces produits a un impact significatif ou non sur la communauté microbienne cutanée. Nous nous sommes concentrés sur les femmes d'origine africaine utilisant ou non ces produits éclaircissants et vivants dans la ville de Montréal (Canada). Plus spécifiquement, nous avons comparé le microbiome cutané de femmes africaines utilisant des produits éclaircissants au microbiome cutané de femmes africaines qui n'en utilisent pas. Notre hypothèse de départ était que ces deux microbiomes seraient significativement différents.

1.7. Organisation du mémoire

Les chapitres deux et trois suivants seront présentés sous forme d'articles scientifiques. Dans le chapitre deux, le premier article traite de la contamination des crèmes éclaircissantes, des différences entre les législations et de la fiabilité des étiquettes des produits. Le deuxième article qui se trouve dans le chapitre trois, s'intéresse aux effets des produits éclaircissants sur le microbiome cutané. Enfin, le chapitre quatre est une conclusion générale dans laquelle nous avons abordé les recherches futures à faire quant à l'effet des crèmes éclaircissantes sur le microbiome cutané.

Contributions des auteurs dans la rédaction des articles des chapitres deux et trois.

Chapitre 2. Mercury, hydroquinone and clobetasol propionate in skin lightening products in West Africa and Canada.

Article soumis dans la revue : *Environmental Research*.

M.H. Gbetoh : Conception du projet d'étude; échantillonnage; analyses en laboratoire; traitements des données; rédaction initiale et finale.

M. Amyot : Conception du projet d'étude et rédaction finale.

Chapitre 3. Crèmes éclaircissantes et microbiome cutané des femmes d'origine africaine vivant au Canada.

Article en préparation pour soumission.

M.H. Gbetoh (copremier auteur): Conception du projet d'étude; échantillonnage; analyses en laboratoire; analyses des données; rédaction initiale et finale.

C. Girard (copremier auteur): Conception du projet d'étude; analyses des données; rédaction initiale et finale.

M. Amyot : Conception du projet d'étude; rédaction finale.

Chapitre 2: Mercury, hydroquinone and clobetasol propionate in skin lightening products in West Africa and Canada

Auteurs: Mètogbé Honoré Gbetoh et Marc Amyot

Article publié dans la revue: *Environmental Research* :

Environmental Research (2016), pp. 403-410

DOI: 10.1016/j.envres.2016.06.030

2.1. Abstract

Skin lightening products are types of cosmetics (creams, gels, lotions and soaps) applied voluntarily on skin. Several of these products contain a variety of active ingredients that are highly toxic. Among those toxic agents, the present study focuses on mercury, hydroquinone, and clobetasol propionate. Out of the 93 lightening soaps and 98 creams purchased in large city markets in sub-Saharan West Africa and in small ethnic shops in Canada, 68 - 84% of all creams and 7.5- 65% of all soaps exceeded regulatory guidelines for at least one active ingredient when considering different regulations. Mercury was found in high concentrations mainly in soaps, while hydroquinone and clobetasol propionate concentrations exceeded US FDA standards in some creams for all countries included in our study. Concentrations of the three compounds declared on labels of soaps and creams usually did not correspond to concentrations actually measured, particularly for mercury and hydroquinone. Overall, our results indicate that most studied skin-lightening products are potentially toxic and that product labels are frequently inaccurate with respect to the presence of toxic agents.

2.2. Introduction

Skin lightening products are types of cosmetics sold as creams, gels, lotions and soaps that are applied voluntarily on skin. In many African and Asian countries, and in many large cities worldwide where communities from these countries reside, the use of skin lightening products is becoming increasingly popular (Lewis et al., 2012, Uram et al., 2010, Mahe et al., 2007, Petit et al., 2006). Previous studies conducted in major cities of some West African countries have shown that a significant proportion (between 26% and 67%) of adult females

used these products daily to lighten their skin (Dadzie and Petit, 2009). Several of these products claim to contain a variety of active ingredients that are highly toxic (Bocca et al., 2014, Al-Saleh et al., 2012, Mahe et al., 2007). Among those toxic agents, the present study focuses on mercury, hydroquinone, and clobetasol propionate. We selected these three ingredients amongst others because they are amongst the most toxic and most used agents in lightening products, and they are often subject to regulations (Groupe Thématique 'Peau Noire' de la Société Française de Dermatologie, 2011, Dadzie and Petit, 2009, Del Giudice et al., 2003).

Inorganic mercury (e.g. mercurous chloride, ammoniated mercury, mercurous oxides or mercuric chloride) is the form of mercury commonly found in skin lightening products (Olumide et al., 2008, Palmer et al., 2000b). It is a very toxic element that can inhibit melanin production by competing with copper in tyrosinase, resulting in the appearance of paler skin (Engler, 2005, Denton et al., 1952). Its cutaneous absorption is carried out either through the epidermis or through sweat glands, sebaceous glands or hair follicles, and significant dermal absorption can occur depending on different factors such as hydration of the stratum corneum and the frequency of application of these products on the skin. Urinary excretion is the major route of elimination (Chan, 2011, Copan et al., 2015, Sin and Tsang, 2003). Inorganic Hg concentrates mainly in the kidney, in particular in the tubular region where lesions have been observed after acute oral intake of Hg^{2+} salts (Al-Saleh et al., 2005). With repeated applications, the cumulative effect of prolonged low-dose exposure may lead to nephrotoxic effects, proteinuria and nephritis (Al-Saleh et al., 2005, Engler, 2005). The central nervous system can also be affected by inorganic Hg under certain conditions. In fact, although penetration of the blood-brain barrier by inorganic

mercury is poor, prolonged exposure can result in central nervous system accumulation and neurotoxicity (Copan et al., 2015, Chan, 2011).

Hydroquinone is a major benzene metabolite widely used in skin lightening products. It is a well-known hepatotoxic and carcinogenic agent (Enguita and Leitao, 2013). In contact with skin, hydroquinone acts as an alternate substrate of tyrosinase. In the place of tyrosine, which should be transformed into melanin, hydroquinone metabolizes into quinones and free radicals. These radicals can then attack melanocyte membranes exerting a cytotoxic effect (Gillbro and Olsson, 2011).

Creams containing clobetasol propionate are drug products that are normally sold in several countries to treat various skin conditions. These products are unfortunately diverted from their normal use and used by women for skin whitening. They have anti-inflammatory, antipruritic, and vasoconstrictive properties and are known to reduce production of the arachidonic acid and of prostaglandin (Hammarstrom et al., 1977). The mechanism by which the topical steroids lighten the skin, in general, is unclear (Dadzie and Petit, 2009). However, it seems that these molecules have a strong affinity for the specific receptors for the keratinocytes and the melanocytes causing a depigmenting effect (Roguedas-Contios and Garcia-Le Gal, 2005). They may have many adverse effects on user health (Fanny et al., 2014, Sene et al., 2008, Mahe et al., 2007).

Several safety standards have been established for these toxic agents by international and national organizations. In the case of hydroquinone products, they are officially banned in Canada and the European Union (EU, 2009, Hc-sc.gc.ca, 2015) but are still allowed in the

United States and several countries of West Africa at a concentration up to 1.5-2% (US FDA, 2016, Ivory Coast, 2015). However, mercury is banned in lightening products sold in the European Union and of Ivory Coast but allowed in cosmetics sold in Canada and the United States in concentrations up to 1 µg/g (Hc-sc.gc.ca, 2016, US FDA, 2016). Finally, most regulations consider that the standard limit of clobetasol propionate in dermatological preparations is 0.05% (US FDA, w/w) when it is sold with prescription.

The production, distribution and sale of these products normally regulated in several countries is nevertheless carried by informal channels making difficult the compliance with recommended standards (Bocca et al., 2014, Glenn, 2008). Many of these products are readily available on streets, markets, and in non-pharmaceutical shops in West Africa and North American cities with West African communities where control of these products by local health authorities remains difficult (Hamann et al., 2014, Adepoju-Bello et al., 2012, Peregrino et al., 2011, Glenn, 2008, Voegborlo et al., 2008). Because these products are popular and can pose many problems on user's health, it is important to establish if these standard limits are respected in skin lightening products sold in countries around the world, especially in West Africa where there are several cases of adverse effects associated with topical application of these products such as nephropathy and exogenous ochronose (Levitt, 2007, US FDA, 2009).

In this study, we focused on two geographical regions where females use these products and we determined mercury, hydroquinone, and clobetasol propionate in a wide variety of skin lightening creams and soaps. Specifically, we collected products from various local markets in West Africa and in Montreal (Canada), a large North American city with an important West African population. In Africa, we focused on Benin, Ivory Coast, Mali and Senegal. Our main

objective was to determine the concentrations of different active ingredients commonly found in skin lightening products in West Africa and Canada, and to compare them with regulatory guidelines. We further tested if concentrations of active ingredients stated on product labels are accurate and therefore correctly inform the consumers on the risk associated with the product.

2.3. Materials and Methods

2.3.1. Sampling of skin lightening personal care products

A total of 191 skin-lightening creams and soaps (98 creams and 93 soaps) commonly used by women were purchased from the local markets of West Africa and Canada. In West Africa, we collected the products in the largest markets of the cities of Cotonou (Benin) in August 2013, and Bamako (Mali), Dakar (Senegal) and Abidjan (Ivory Coast) in August-September 2014. In Canada, we bought imported products in June 2013 in a dozen of small ethnic beauty shops located in the city of Montreal. Most of the products analysed were imported from different countries of Asia (Malaysia, Thailand and India), EU (France, Italy, UK and Germany), and of North America (USA, Dominican Republic), whereas some are locally imported from Africa (Democratic Republic of the Congo, Ivory Coast).

We analyzed mercury in all soaps and creams of all countries, namely in 6 soaps and 18 creams purchased in Benin, in 27 soaps and 25 creams purchased in Ivory Coast, in 20 soaps and 12 creams purchased in Mali, in 23 soaps and 25 creams purchased in Senegal and in 17 soaps and 18 creams purchased in Montreal, Canada (**Figure 2.2a**).

We measured hydroquinone in all creams of all countries. Similarly, we measured clobetasol propionate in all creams except those containing hydroquinone exceeding 2%

because we did not expect the simultaneous presence of hydroquinone and clobetasol propionate in the same cream at high concentrations. We did not measure hydroquinone or clobetasol propionate in soaps because these ingredients are not expected in lightening soaps (Groupe Thématique 'Peau Noire' de la Société Française de Dermatologie, 2011).

2.3.2. Mercury analyses

Cream and soap samples were analyzed using an automatic MERCURY SP-3D analyzer (Nippon Instruments, Osaka, Japan) in accordance with USEPA method 7473. After combustion at 700°C, mercury was converted catalytically to elemental mercury. Following dual gold amalgamation, the quantity of mercury was measured by cold vapor atomic absorption at a wavelength of 253.7 nm. Between 10 to 100 mg of soap and cream samples were placed on a layer of an additive (mixture of sodium carbonate and calcium hydroxide; EMD Chemicals, NJ, USA) in a ceramic boat as suggested by the supplier. The sample was then covered with a layer of the same additive. A layer of aluminum oxide (Al_2O_3 ; Acros Organics) was placed over the sodium carbonate–calcium hydroxide layer. The aluminum oxide layer was covered with another layer of the additive. The boat was then transferred manually into the ceramic thermal decomposition tube. After feeding the samples, all operations from the sample decomposition to the mercury detection were automatically carried out with SP-3D mercury analyzer system. Reference materials (Tort-2, 270 ± 60 ng/g; Dorm-4, 410 ± 55 ng/g; National Research Council of Canada, Ottawa, Canada) were analyzed every 10 samples to ensure reproducibility and to assess analytical quality. The analyses were accepted when measurements of certified reference materials were in the certified range. Mean concentrations of certified materials were 284 ± 1 (n = 5) and 383 ± 2 (n = 9) for Tort-2 and Dorm-4, respectively. The instrument detection limit (IDL) is 0.01 ng/g.

2.3.3. Hydroquinone analyses

To extract hydroquinone, we accurately weighed 0.050 g of skin lightening cream and added 10 mL of ethanol. Samples were incubated in a water bath for 20 min at 50°C, and let to cool down before analysis (Al-Saleh et al., 2012). We determined hydroquinone by a high-performance liquid chromatography (HPLC) method slightly modified from Al-Saleh et al. (2012) (HPLC with a UV-DAD detector, Agilent 1200, Santa Clara, US). Briefly, 1 mL of each sample was filtered through a 0.45 µm syringe filter and 20 µL were injected into the HPLC. Hydroquinone was separated on 5-µm particle 4.6 x 150 mm, Zorbax eclipse XDB-C18 column. Isocratic system was used with a mobile phase (90:10 water: acetonitrile) prepared daily and degassed prior to use. Detection was done at a wavelength of 289 nm. Retention time was 2.7 min and total run time was 6 min. A stock solution of 1 mg mL⁻¹ hydroquinone was prepared in methanol. Working calibration curves were prepared by spiking 0.05 g of cream with different volumes of stock solution. Hydroquinone standard was purchased from Sigma-Aldrich ≥ 99% (Saint Louis, US). The analytical recoveries were 102%, 101%, 98% and 98% with RSDs of 1.5%, 0.58%, 1.53% and 2%, respectively for four spiked cream samples.

2.3.4. Clobetasol Propionate analyses

Clobetasol propionate (CP) was analyzed according to Nam et al. (2011). Briefly, approximately 2 g of cream was mixed to attain a homogeneous mixture, and 1 g was accurately weighed into a 10 mL volumetric flask. It was then diluted with 10 mL acetonitrile, shaken vigorously and precipitated by centrifugation, filtered through a 0.45 µm syringe filter, and transferred into a 1-mL vial. Instrumental and analytical conditions were the same as described by Nam et al. (2011) using HPLC with UV-DAD detector (Agilent 1200, Santa Clara, US). Separation was carried out on ZORBAX1 Eclipse XDB-C18, a 5 mm C18 column (150 mm x

4.6 mm, Agilent Technologies, USA), with a flow rate of 1 mL min⁻¹, column temperature of 27°C, injection volume of 10 µl, and a total running time of 25 min. HPLC method for separation of standards and samples were modified from Nam et al. (2011) as follows. The elution was carried out using mobile phases A (0.1% phosphoric acid in water) and B (acetonitrile) at 240 nm. UV scan mode, which ranged from 210 to 400, was used. Standards and samples were separated with solution B. The calibration curve was prepared for clobetasol propionate obtained from Sigma Aldrich ≥ 98% (FLUKA, US) by adding suitable amounts of standard stock solution to blank samples in triplicate. The analytical recoveries were 100%, 99% and 99% with RSDs of 1.5%, 2.1%, and 1.5% respectively for tree spiked cream samples.

2.3.5. Determination of impurities

Mercury and hydroquinone are naturally occurring agents. They are banned in some countries but regulations do not directly consider natural impurities. It is important to assess if the concentrations that we measured resulted from acceptable impurities or voluntary addition by the manufacturer. We plotted all measured mercury and hydroquinone concentrations in decreasing order (**Suppl. Info: Fig. A.1 to A.3.**). We drew a line at the breaking point where levels started to depart rapidly from background concentrations, and considered that levels below this point constituted acceptable impurities (**Table A.II**). Products with such acceptable impurities were considered as not contravening to the ban.

2.3.6. Statistical analyses

Statistical analyses were done with R 2.15.0. Differences between concentrations of active ingredients in products from West Africa and Canada were assessed using Kruskal–Wallis nonparametric tests followed by Tukey's multiple comparisons test (Scherrer,

1984). Log₁₀ transformation was used to perform boxplot for mercury in soap and cream because of some extreme values. A statistical probability level of $p < 0.05$ was considered statistically significant for all comparisons. We also calculated the proportions of products (soaps or creams) that exceeded regulatory limits.

2.4. Results

2.4.1. Concentrations of active ingredients in soaps and creams

2.4.1.1. Mercury concentrations in soaps and creams

We analyzed mercury in 93 lightening soaps and 98 creams. Levels of mercury in soaps ranged from 5.45×10^{-5} to 8370 $\mu\text{g/g}$ with a mean of 349 $\mu\text{g/g}$ (**Figure 2.1a**). Median mercury concentrations in soaps from Benin, Ivory Coast and Canada were higher than those from Senegal and Mali. Maximum soap mercury concentrations in one country in West Africa (Benin) were ~8000-times higher than the US FDA limit. When considering mercury ban in lightening products with a threshold impurity limit of 0.6 $\mu\text{g/kg}$ (see section 2.5.), we observed that all soaps purchased in Benin and Canada exceeded guidelines. Overall, 65.6% (61/93) of all soaps analyzed from all countries exceed 0.6 $\mu\text{g/kg}$. Kruskal–Wallis test on mercury concentration in soaps revealed significant differences among mercury concentrations in soaps by country (**Table A.I**). According to subsequent Tukey HSD posthoc tests, mercury concentrations in soaps purchased from Benin were significantly greater than in those purchased in other countries.

In creams, levels of mercury ranged from 4.8×10^{-5} to 0.914 $\mu\text{g/g}$ and were all below the US FDA standard limit (1 $\mu\text{g/g}$). All mercury concentrations in creams from Benin and Canada exceeded the impurity threshold of 0.6 $\mu\text{g/kg}$, with mercury concentrations in creams from

Benin (between 1.80×10^{-3} and 4.25×10^{-2} $\mu\text{g/g}$) higher than in those from Canada (between 6.37×10^{-4} and 9.85×10^{-3} $\mu\text{g/g}$) except for one cream purchased in Canada that had a high concentration of mercury (0.914 $\mu\text{g/g}$). Creams purchased in Ivory Coast, Mali and Senegal had mercury concentrations below 0.6 $\mu\text{g/kg}$ except for two creams from Senegal (**Figure 2.1b**).

2.4.1.2. Hydroquinone concentrations in creams

Among the 98 skin-lightening creams, levels of hydroquinone in creams ranged from 0 to 6% (w/w) with a mean of 1.2% (w/w). Median in Mali was ~2-times higher than the US FDA limit of 2% (w/w) (**Figure 2.1c**). Levels of hydroquinone in creams bought in Mali were significantly higher than creams bought in Ivory Coast, Senegal and Canada (**Table A.I**) Tukey's post hoc test; $P < 0.05$). In Benin and Mali, hydroquinone concentrations exceeded US FDA standards in over 44% of creams (**Figure 2.2b**). When considering European Union legislation that bans hydroquinone in skin lightening creams, we observe that 38% (37/98) of all creams analyzed exceed 0.5% (w/w) which was defined as the acceptable impurity threshold (**Table I; Table A.II**).

2.4.1.3. Clobetasol propionate concentrations in cream

Creams containing clobetasol propionate at 0.05% (w/w) are drug products and are banned from sale without medical prescription. In our study, when considering the bans of these products, clobetasol propionate was detected in 39% (38/98) of creams with a mean of 0.0265% (w/w). However, 20% (20/98) of creams exceeded US FDA standards limits of 0.05%, (w/w) when we ignored their ban.

Levels of clobetasol propionate in creams bought in Senegal were significantly higher than in creams bought in Mali and Canada (**Table A.I**, Tukey's post hoc test; $P < 0.05$). The median in Senegal was ~2-times higher than in Benin (**Figure 2.1d**). Exceedance of US FDA limits (when creams are supposedly sold with medical prescription) was more common in creams purchased from West African countries than in those purchased in Canada, with 22.5% of creams exceeding 0.05% w/w limit in West Africa (5-50% depending on the country), compared to 11% in Canada (**Figure 2.2b**).

2.4.2. Accuracy of labeling information

In order to verify if concentrations of active ingredients listed on the labels are similar to those measured, we have selected soaps and creams for which manufacturers stated concentrations on the labels. For Hg, 2.6% (5/191) of products reported its presence on labels (between 1.2 and 2% mercury iodide, i.e. 5280 to 8800 $\mu\text{g/g}$); for hydroquinone, 17% of creams (17/98) listed concentrations of 1.2-2% on labels; for clobetasol propionate, 28% (27/98) of creams reported concentrations of 0.05% on the packaging.

For all three ingredients, we defined a gray area that represents a margin of $\pm 10\%$ confidence around the declared value. When considering this gray area, we observe on **Figure 2.3** that there was no relationship between concentrations mentioned on packaging and those measured by us in several products regardless of the country of purchase, indicating that labels inaccurately report concentrations of some potentially toxic ingredients (**Figure 2.3a, 2.3b & 2.3c**).

Regarding mercury, 5 soaps purchased from Ivory Coast and Canada report presence of this ingredient on their labels at concentrations between 1.2% and 2% mercury iodide. However, mercury concentrations that we measured in these products were below values

indicated on the labels (**figure 2.3a**). Moreover, we surprisingly measured high mercury concentrations (ranging from 8370 to 3520 $\mu\text{g/g}$) in 5 other soaps purchased from West Africa that did not indicate the presence of Hg on their packaging.

In the case of hydroquinone, several products stating concentration of 2% on their labels had concentrations up to 5.5%. Among these products, 82% of products (9 products of 11) purchased from West Africa (Benin and Mali) had concentrations of hydroquinone that exceeded by 2 fold the concentrations shown on labels (**Figure 2.3b**). When considering the gray area, 50% of products purchased from Canada had hydroquinone concentration similar to declared values, and 50% had levels 1.5-2 times higher than stated on the labels (**Figure 2.3b**).

For clobetasol propionate, products labelled as containing 0.05% clobetasol propionate had concentrations of up to 0.08%. 65% of products (15 products of 23) purchased from West Africa (Benin, Ivory Coast and Senegal) had levels exceeding those reported on labels. However, when considering the gray area, most of clobetasol propionate concentrations measured were around the declared value except products purchased from Senegal and one cream purchased from Canada (**Figure 2.3c**).

2.5. Discussion

2.5.1. Are concentrations of toxic ingredients found in skin-lightening products of concern?

In order to put our results in a broader context, we compared levels of toxic ingredients in skin-lightening products to limits imposed by four regulatory agencies, namely the US FDA, Health Canada, the Regulation (EC) 1223/2009 and the Directive 76/768/EEC of the European Union and the Ministry of Commerce of the Ivory Coast (**Table II.I**). In some cases, an ingredient was completely banned from sale without medical prescription; in these instances, all products containing the ingredient were considered as exceeding the limits; however, since Hg and hydroquinone are naturally occurring ingredients, we set a lower limit to distinguish between natural impurities and voluntary addition. A product was only considered as exceeding the limit in the case of banned substances if the ingredient exceeded the levels set for voluntary addition (**Table A.II**).

Using this approach, we determined that 68-84% of all creams exceeded safety limits of at least one of the three toxic ingredients (**Table II.I**). When ignoring the bans of some ingredients in products sold without prescription, 50-74% of creams exceeded the guidelines. We conclude that there is very important health risk associated with the sale of skin-lightening creams, since a large proportion of them exceeded national guidelines of multiple countries.

Whereas several studies have measured only one ingredient in lightening products (e.g. mercury), our approach of integrating simultaneously three types of toxic agents allowed for a more general appreciation of their health risks (see **Table A.V** in supplementary information for details about comparisons with guidelines by other authors).

The guidelines recommended by the US FDA to limit the presence of toxic agents in lightening products are used in many countries such as China and Mexico (Wang and Zhang, 2015, Peregrino et al., 2011). These standards are less stringent than those of the European Union that totally prohibit mercury, hydroquinone and clobetasol propionate in lightening products. They are also less stringent than those of some Western African countries such as the Ivory Coast that totally prohibit mercury and clobetasol propionate in lightening products. The stricter regulations of EU compared to US FDA led to 24% increase in the number of creams, and 58% of soaps exceeding standards.

This study shows that the problem of the presence of toxic active agents at high concentrations in lightening products arises in all the countries we studied. Other studies have also reported that many lightening products sold in certain countries such as Ivory Coast, Mali, Senegal, and other lightening products used in some Canadian immigrant communities, contain many toxic active agents (Hamann et al., 2014, Mistry et al., 2011, Uram et al., 2010, Ake et al., 2007, Mahe et al., 2007, Mahé et al., 2004, Del Giudice et al., 2003, Mahe et al., 2003, Mahé et al., 1993). Several of these studies have found very high concentrations of mercury in creams and soaps; notably, soaps purchased in Tanzania stand out for unknown reasons compared to those from other countries (**Table II.II**). Other studies are based on concentrations mentioned on packaging of products to show that hydroquinone and clobetasol propionate were also in high concentrations in a wide variety of creams sold in West Africa, including Mali and Senegal (Mahe et al., 2007, Mahe et al., 2003, Mahé et al., 1993).

Although we found low concentrations of mercury in creams (below 1 µg/g), our study clearly confirms the presence of mercury in soaps and hydroquinone and clobetasol propionate in lightening creams at high concentrations. We identify hydroquinone and clobetasol

propionate as key emerging toxic ingredients, although they are rarely analyzed when compared to Hg. We suggest that these two ingredients be prioritized for future research in countries where they are now documented to be prevalent in products, i.e. all countries included in this study.

We have never observed simultaneously high concentrations of three ingredients in the same product when considering US FDA limits (**Table A.IV**). These results are not consistent with a study conducted by Maneli et al. (2015) in South Africa that measured simultaneously mercury, hydroquinone and clobetasol propionate in two lightening products, although concentrations of hydroquinone and clobetasol propionate detected in these products were low compare to those of mercury. As all active agents can act on melanin formation and transfer, we do not expect to find more than one toxic agent in a given lightening product. However, this study was conducted in South Africa, while our products came from West Africa and Canada. It is possible that market pressures, constraints and controls are different in South Africa compared to West Africa.

2.5.2. Are labels of skin-lightening product accurate?

In order to verify the compliance of information mentioned on the labels of lightening products, we determined relationships between the concentrations of active ingredient stated on the labels of the products analyzed and the concentrations we measured. Overall, we found that most of manufacturers do not inform correctly consumers on the exact value of active ingredients. These observations suggest an insufficient control by local authorities of products sold in large markets in West Africa and small ethnic beauty shops in Canada. We suggest the strengthening of regulation and of control on cosmetic products in order to limit exposure of the population to toxic ingredients and to more accurately inform consumers about risk.

2.6. Conclusion

The results of our study confirm that mercury, hydroquinone and clobetasol propionate are still used in relatively high concentrations in skin lightening products. Soaps were more concentrated in mercury compared to creams which were much more concentrated in hydroquinone and clobetasol propionate. Several products which do not indicate the presence of mercury, hydroquinone and clobetasol propionate on their labels also had high concentrations of these ingredients. Because the levels of mercury, hydroquinone and clobetasol propionate detected in products often exceed regulatory guidelines, further study should be undertaken to better document the effect of these products on the health of consumers. With the recent advances in the relationships between microbiomes and human health, it would be particularly relevant to explore the effect of these personal care products on the skin microbiome, and how this can alter human health. The availability of contaminated products and their inaccurate labeling lead us to suggest that regulations should be more strictly enforced in countries where these products are sold.

2.7. Tables

Table II.I. Frequencies of exceedance of regulatory guidelines for all ingredients tested according to different standards and considering the ban of non-prescription products. Definition of categories: considering bans: Exceedance frequency of all ingredients considering the ban of a toxic ingredient in non-prescription products; not considering bans: Exceedance frequency of all ingredients considering the thresholds used for products available with a medical prescription.

Categories				For all creams	For all soaps	For all products (creams + soaps)	
US FDA limit	<i>considering bans</i>	For each ingredient	Hg	0 (0/98)	7.5 (7/93)		
			HQ	29.6 (29/98)	0 (0/93)		
			PC	38.7 (38/98)	0 (0/93)		
			For all ingredient ¹	Hg + HQ + PC	68.3 (67/98)	7.5 (7/93)	38.7 (74/191)
	<i>not considering bans</i>	For each ingredient	Hg	0 (0/98)	7.5 (7/93)		
			HQ	29.6 (29/98)	0 (0/93)		
			PC	20.4 (20/98)	0 (0/93)		
For all ingredient			Hg + HQ + PC	50 (49/98)	7.5 (7/93)	29.3 (56/191)	
Health Canada limit	<i>considering bans</i>	For each ingredient	Hg	0 (0/98)	7.5 (7/93)		
			HQ	37.7 (38/98)	0 (0/93)		
			PC	38.7(38/98)	0 (0/93)		
			For all ingredient	Hg + HQ + PC	74.4 (73/98)	7.5 (7/93)	41.8 (80/191)
	<i>not considering bans</i>	For each ingredient	Hg	0 (0/98)	7.5 (7/93)		
			HQ	38.7 (38/98)	0 (0/93)		
			PC	20.4 (20/98)	0 (0/93)		
For all ingredient			Hg + HQ + PC	58.1 (57/98)	7.5 (7/93)	33.5 (64/191)	
EU limit	<i>considering bans</i>	For each ingredient	Hg	38.7 (38/98)	65.6 (61/93)		
			HQ	37.7 (37/98)	0 (0/93)		
			PC	38.7 (38/98)	0 (0/93)		
			For all ingredient	Hg + HQ + PC	84.6 (83/98)	65.6 (61/93)	75.3 (144/191)
	<i>not considering bans</i>	For each ingredient	Hg	38.7 (38/98)	65.6 (61/93)		
			HQ	37.7 (37/98)	0 (0/93)		
			PC	20.4 (20/98)	0 (0/93)		
For all ingredient			Hg + HQ + PC	74.4 (73/98)	65.6 (61/93)	70.1 (134/191)	
Ivory Coast limit	<i>considering bans</i>	For each ingredient	Hg	38.7 (38/98)	65.6 (61/93)		
			HQ	29.6 (29/98)	0 (0/93)		
			PC	38.7 (38/98)	0 (0/93)		
			For all ingredient	Hg + HQ + PC	82.6 (81/98)	65.6 (61/93)	74.3 (142/191)
	<i>not considering bans</i>	For each ingredient	Hg	38.7 (38/98)	65.6 (61/93)		
			HQ	29.6 (29/98)	0 (0/93)		
			PC	20.4 (20/98)	0 (0/93)		
For all ingredient			Hg + HQ + PC	70.4 (69/98)	65.6 (61/93)	68 (130/191)	

¹ See **Annexe 3** for calculations of frequencies of exceeding regulatory guidelines for all ingredients tested according to different standards and considering the ban of non-prescription products.

Table II.II. Concentration of mercury, hydroquinone and clobetasol propionate in lightening products purchased from various countries.

Region/Country of products purchase	[Hg]soap (µg/g) (Range)	[Hg]cream (µg/g) (Range)	[HQ]cream (%w/w) (Range)	[PC]cream (%w/w) (Range)	References
Africa					
Benin	2.36x10 ⁻² - 8.37x10 ³	1.80x10 ⁻³ - 6.86x10 ⁻²	0-5.73	0-0.052	Our study
Ivory Coast	2.42x10 ⁻⁴ - 4.48x10 ³	6.30x10 ⁻⁵ - 3.39x10 ⁻⁴	0-3.95	0-0.081	Our study
Mali	5.45x10 ⁻⁵ - 6.65x10 ⁻³	4.80x10 ⁻⁵ - 4.13x10 ⁻⁴	0-6.02	0-0.009	Our study
Senegal	2.98x10 ⁻⁵ - 5.39x10 ⁻³	5.8x10 ⁻⁵ - 3.47x10 ⁻²	0-4.56	0-0.086	Our study
Nigeria		9 x10 ⁻³ – 2.07 x10 ⁻¹			(Adepoju-Bello et al., 2012)
Senegal		<7 x10 ⁻³			(Uram et al., 2010)
Kenya		<7 x10 ⁻³			(Uram et al., 2010)
Kenya	1.1x10 ⁻¹ – 7.4 x10 ³				(Harada et al., 2001)
Ghana		<7x10 ⁻³ -7.9 x10 ⁻²			(Voegborlo et al., 2008)
South Africa*	1.9x10 ³ ± 10.00	3x10 ¹ ± 8.68 – 2.3x10 ³ ± 6.67	< 2		(Maneli et al., 2015)
Tanzania	6.2x10 ³ -7.4 x10 ³	<7			(Glahder et al., 1999)
Middle East					
Saudi Arabia		6.3710 ⁻¹ – 2.745			(Alqadami et al., 2013)
Saudi Arabia		0 - 3.14x10 ³			(Al-Saleh et al., 2012)
Saudi Arabia		1.02 x10 ⁻¹ - 7.75 x10 ⁻¹			(Al-Saleh et al., 2005)
Saudi Arabia		0 – 5.65 x10 ³			(al-Saleh and al-Doush, 1997)
Saudi Arabia			0 - 4,186 ± 0.195		(Al-Saleh et al., 2012)
North America					
Canada	2.27x10 ⁻³ - 7.35x10 ⁻²	6.37 x 10 ⁻⁴ - 0.914	0 - 3.01	0 - 0.063	Our study
Mexico		<5 x10 ⁻³ - 8.78 x10 ² ±1.15 x10 ²			(Peregrino et al., 2011)
Mexico		<7 x10 ⁻³ -1.325 x10 ³			(Uram et al., 2010)
USA (Online)		1.044 ±121 – 9.603 x10 ³ ±1.14 x10 ²			(Hamann et al., 2014)
USA		1.354 x10 ¹ ±6.07 x10 ² – 3.291x10 ¹ ±2.127x10 ³			(Hamann et al., 2014)
USA	4.77-4.38x10 ²	3.37- 4.160 x10 ¹			(McKelvey et al., 2011)

*South Africa data is not reported as a range because mercury was detected in only one soap.

2.8. Figures

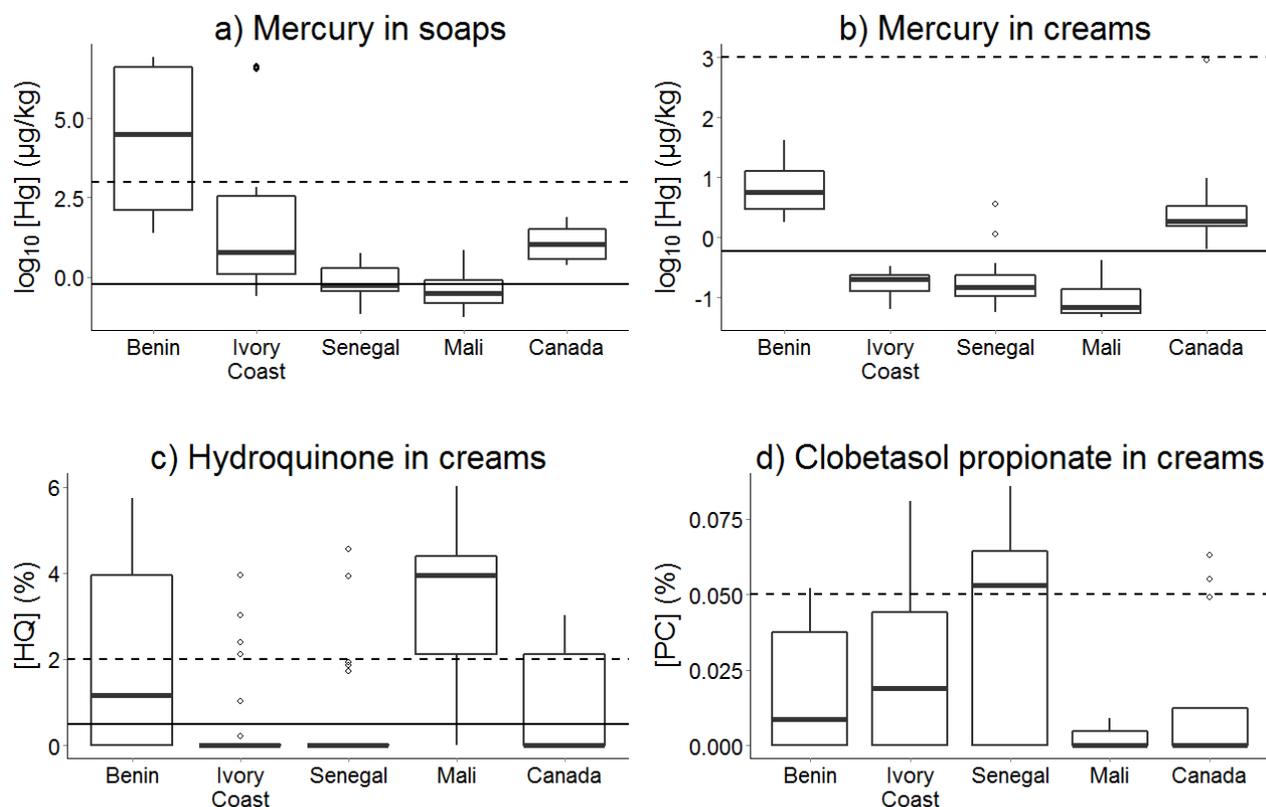


Figure 2.1. Boxplot showing (in $\mu\text{g Hg}/\text{kg}$) minimum, median, maximum concentrations and 25th, 75th of \log_{10} (Hg) for mercury in soap (a) and cream (b) in different countries in West Africa and Canada. Dotted line represents the US FDA threshold of 1 $\mu\text{g Hg}/\text{g}$. Boxplot showing (in %, w/w) minimum, median, maximum values and 25th, 75th of % (w/w) for hydroquinone in cream (c) in different countries in West Africa and Canada. Dotted line represents the US FDA threshold of 2% hydroquinone, w/w. Boxplot showing (in % w/w) minimum, median, maximum values and 25th, 75th of % (w/w) for clobetasol propionate in cream (d) in different countries in West Africa and Canada. Dotted line represents the US FDA threshold of 0.05% clobetasol propionate, w/w. Solid lines represent acceptable impurity thresholds (see section 2.3.5.).

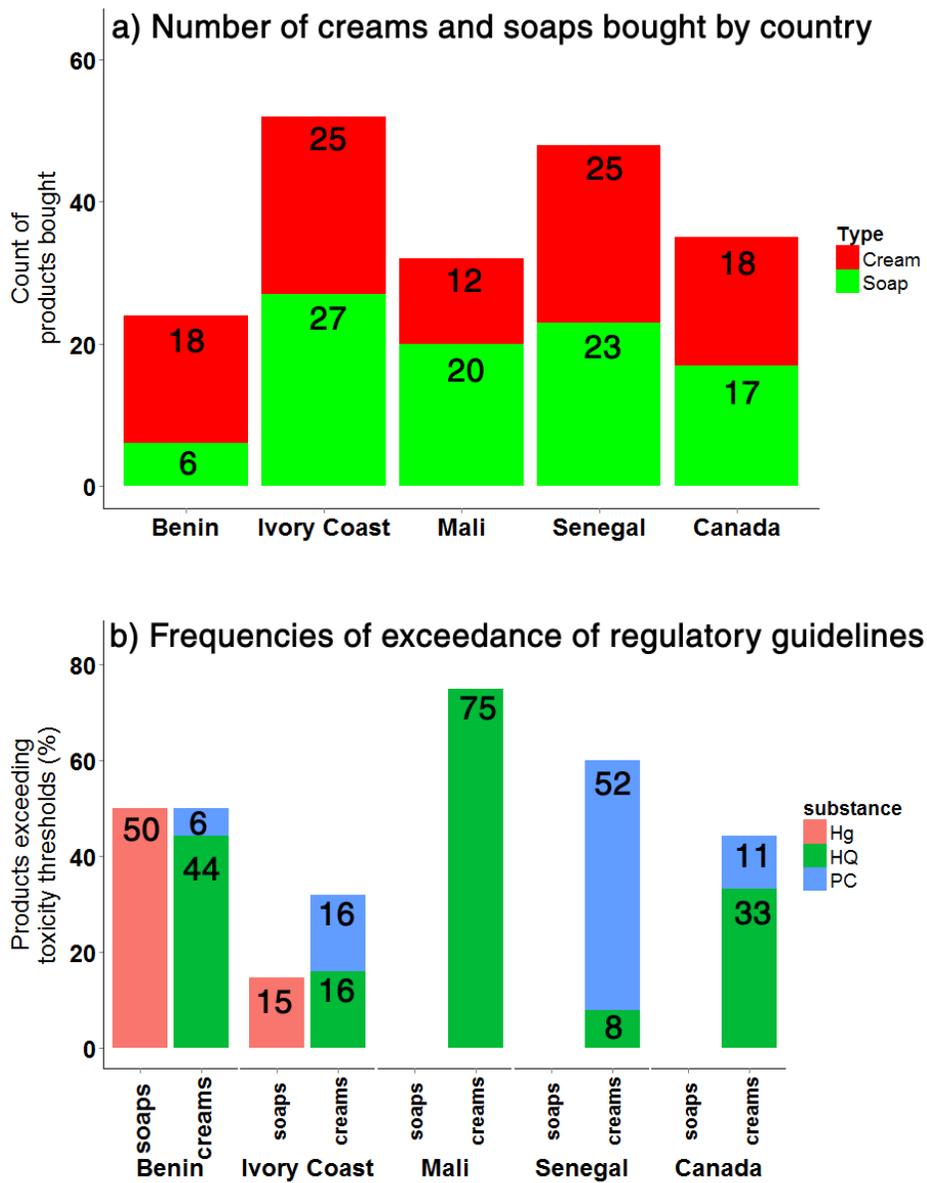


Figure 2.2. Histograms showing (a) the number of creams and soaps bought by country and (b) frequencies of exceeded toxicity thresholds by country, using US FDA standards not considering bans of PC.

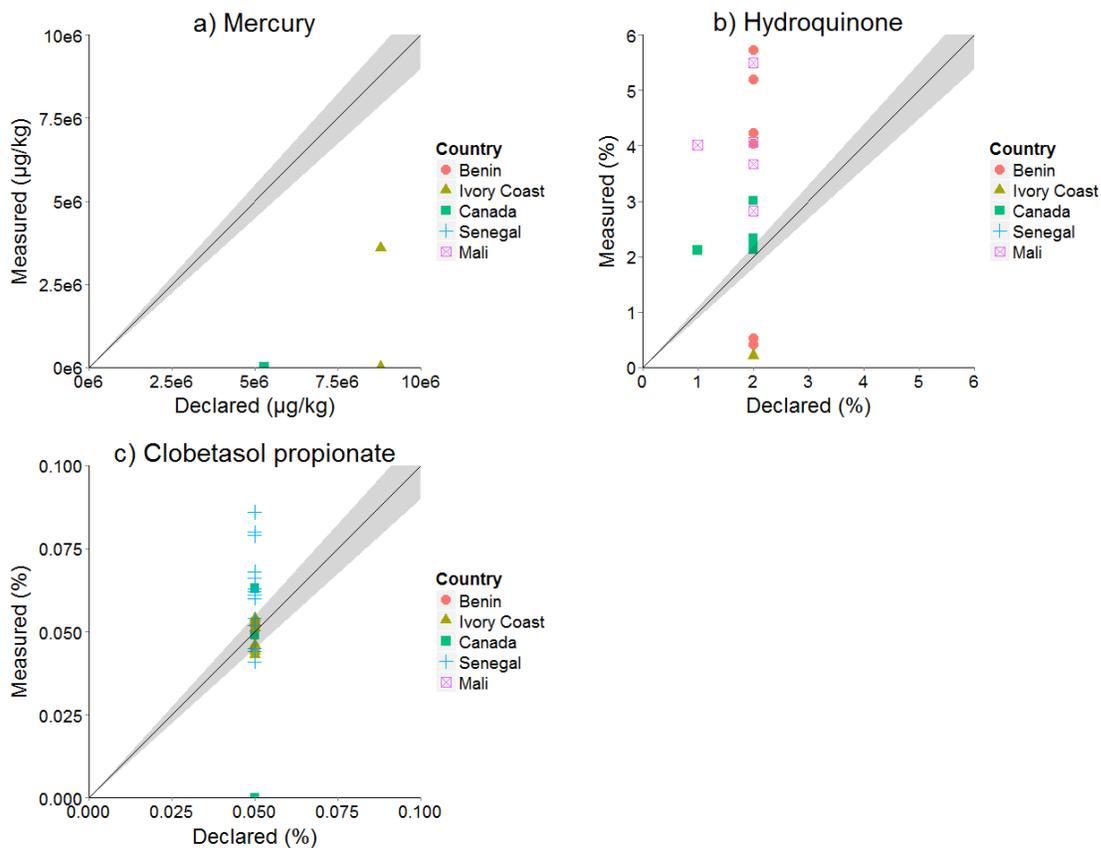


Figure 2.3. Scatter plot showing correlations between mercury concentrations observed on the labels and mercury concentrations measured in creams and soap **(a)**; Scatter plot showing correlations between hydroquinone concentrations observed on packaging of the labels and hydroquinone concentrations measured in creams **(b)**; Scatter plot showing correlations between clobetasol propionate concentrations observed on packaging of the labels and clobetasol propionate concentrations measured in creams **(c)**. The gray area represents a margin of $\pm 10\%$ confidence around the declared value.

2.9. Acknowledgements

This study was supported by an NSERC Discovery grant (#217099) and the Canada Research Chair in Global Change Ecotoxicology (# 950-230679) to MA. We thank Dominic Bélanger and Alexandre Poulain's lab for laboratory assistance and the anonymous reviewers for their comments on this work. MH.G. acknowledges financial support from Islamic Development Bank (IDB).

Chapitre 3 : Crèmes éclaircissantes et microbiome cutané des femmes d'origine africaine vivant au Canada

Auteurs: Mètogbé Honoré Gbetoh, Catherine Girard, et Marc Amyot

3.1. Résumé

L'utilisation des cosmétiques contenant des agents actifs éclaircissants la peau est une pratique de plus en plus répandue surtout au sein des communautés asiatique et à peau noire. Avec les progrès récents révélant les relations entre les microbiomes et la santé humaine et du fait des concentrations dépassant souvent les normes réglementaires de ces ingrédients dans plusieurs produits éclaircissants, il serait particulièrement intéressant d'explorer leurs effets sur le microbiome de la peau et comment ils peuvent altérer la santé humaine. Notre étude visait à déterminer l'impact potentiel de l'application de produits éclaircissants contenant des agents actifs toxiques sur le microbiome cutané des femmes d'origine africaine vivant dans la ville de Montréal (Canada). Au total, nous avons échantillonné le front de 37 volontaires africaines, en bonne santé, n'ayant pris aucun antibiotique sur la peau ni d'antibiotiques oraux et utilisant ou non les produits éclaircissants. Nous avons eu recours aux technologies de séquençage à haut débit se basant sur l'analyse comparative de l'ARNr 16S. Les résultats nous montrent qu'il n'y a pas de différences significatives observables au niveau du phylum et du genre dans les échantillons du groupe des femmes utilisant les crèmes éclaircissantes versus le groupe des femmes qui ne les utilisent pas. Cependant, l'indice de diversité de Shannon nous révèle que les taxons sont répartis de façon beaucoup plus équitable dans le groupe des femmes utilisant les crèmes, suggérant que les agents actifs toxiques contenus dans les produits éclaircissants ont un effet sur la communauté microbienne cutanée. D'autres études plus approfondies utilisant les approches métagénomiques seraient nécessaires afin de mieux caractériser l'effet de ces produits sur le microbiome de la peau.

3.2. Introduction

La peau est l'un des organes les plus étendus du corps humain et joue un rôle important contre l'infection et la pénétration d'agents infectieux (Zeeuwen et al., 2013). La peau humaine possède des microorganismes transitoires, résidants et opportunistes qui sont en équilibre dynamique avec les tissus de l'hôte (Mokni and Abdelhak, 2014, Schommer and Gallo, 2013). L'ensemble de la communauté microbienne vivant sur la peau humaine est collectivement appelé microbiome de la peau (Zeeuwen et al., 2013).

Le microbiome de la peau regroupe des espèces qui prédominent et/ou sont durablement adaptées à la surface de la peau. On y trouve des bactéries, des virus, et même les levures (Mokni and Abdelhak, 2014, Zeeuwen et al., 2013, Kong, 2011). Il varie d'un site à un autre sur la peau d'une même personne, et d'une personne à une autre pour un même site de la peau (Caporaso et al., 2011, Costello et al., 2009, Grice et al., 2009). Cette variabilité du microbiome implique l'existence de facteurs qui peuvent limiter soit le type de microorganismes, soit l'abondance de ces microorganismes, soit encore la vie de ces microorganismes (Costello et al., 2013, Pflughoeft and Versalovic, 2012, Costello et al., 2009, Fierer et al., 2008). Ces facteurs peuvent être bénéfiques ou néfastes pour les microorganismes normalement présents à la surface de la peau (Schommer and Gallo, 2013). Les mécanismes précis d'interaction de ces facteurs contrôlant l'équilibre microbien d'un site spécifique de la peau à un autre ne sont pas encore clairement connus.

Cependant, il semblerait que ces facteurs dépendent des régions topographiques du corps ayant des caractéristiques distinctes (pH, humidité, salinité, contenu en sébum), les facteurs intrinsèques (par exemple, le génotype, l'âge et le sexe) et des facteurs individuels dépendants extrinsèques tels que les activités quotidiennes, le mode de vie, la situation géographique, et

l'utilisation d'antibiotiques ou de cosmétiques (Oh et al., 2014, Findley et al., 2013, Meadow et al., 2013, Pflughoeft and Versalovic, 2012, Grice et al., 2009, Fierer et al., 2008, Gao et al., 2007, Roth and James, 1988). Le microbiome cutané humain est capable de jouer un rôle de barrière et de protéger son hôte contre l'entrée de pathogènes et la colonisation par des micro-organismes potentiellement pathogènes contribuant au développement du système immunitaire (Grice and Segre, 2012, Hooper et al., 2012). De tout ce qui précède, cela implique que le maintien de notre microbiome de la peau est bénéfique pour notre santé (Pflughoeft and Versalovic, 2012, Zeeuwen et al., 2013).

Or, dans de nombreux pays africains et asiatiques, et dans de nombreuses grandes villes du monde où les communautés de ces pays résident, l'utilisation des produits éclaircissants la peau est un phénomène social très répandu (Lewis et al., 2012, Mistry et al., 2011, Uram et al., 2010, Mahe et al., 2007, Petit et al., 2006). Une proportion importante de la population féminine adulte africaine, estimée entre 26% et 67%, utilise quotidiennement ces crèmes qui contiennent une large variété d'ingrédients actifs tels que le mercure, l'hydroquinone, et le propionate de clobétasol qui sont très toxiques (Dadzie and Petit, 2009). Le mercure inorganique est la forme de mercure que l'on retrouve dans les crèmes éclaircissantes. Il est extrêmement toxique pour les bactéries à cause de son affinité pour le groupe thiol (-SH) des protéines et autres ligands (cystéine, glutathion). Il est connu pour ses effets néphrologiques et neurotoxiques. L'hydroquinone est un métabolite majeur du benzène qui peut induire des effets hématotoxiques et cancérigènes. Le propionate de clobétasol est un composé chimique synthétique ressemblant aux hormones naturellement secrétées par la glande surrénale humaine et semble avoir un fort potentiel tératogène. Les produits éclaircissants contenant ces ingrédients sont en demande croissante dans le monde entier (Glenn, 2008).

Bien qu'ils soient conçus pour avoir d'autres effets spécifiques sur la peau, ils peuvent modifier l'abondance et la densité des microorganismes à la surface de la peau (Staudinger et al., 2011). En effet, il est probable que l'utilisation accrue d'un produit contenant des ingrédients toxiques tels que le mercure, l'hydroquinone et le propionate de clobétasol influence de manière significative le microbiome de la peau humaine et pose de sérieux problèmes de santé humaine. Par exemple, les ions mercuriques sont extrêmement toxiques pour les bactéries et peuvent inhiber la croissance de celles-ci. Dans les sites cutanés sébacés comme le front, certaines espèces bactériennes (exemple de *P. acnes*) possèdent dans leur génome une multitude de lipases qu'elles utilisent probablement pour acquérir des nutriments provenant des lipides riches en sébum (Brüggemann et al., 2004). Le carbone de l'hydroquinone (un composé retrouvé aussi naturellement dans l'environnement) peut être beaucoup plus accessible par rapport à celui du propionate de clobétasol (un composé purement synthétique) et peut potentiellement influencer le microbiome cutané puisque l'exploitation des ressources dans un habitat est un des facteurs fondamentaux déterminant l'abondance et la diversité des organismes (Gribbon et al., 1993). L'apport de ces ingrédients pourrait donc perturber les interactions (intra ou interspécifiques) au sein du microbiome.

En fait, les mécanismes par lesquels les ingrédients actifs contenus dans les crèmes éclaircissantes influenceraient le microbiome de la peau humaine n'ont jamais été étudiés. Dans ce contexte, il est nécessaire d'entreprendre des études sur ce sujet afin de prévenir l'effet de ces crèmes sur la santé humaine, car on sait que le microbiome de la peau contribue à la santé humaine (Sanford and Gallo, 2013) mais on ne sait pas si un changement dans le microbiome cutané du fait de l'utilisation des crèmes éclaircissantes a réellement des effets sur la santé de l'hôte.

Dans cette étude dans laquelle nous avons concentré notre attention sur les bactéries, nous avons exploré si l'usage de cosmétiques riches en mercure, en hydroquinone et en propionate de clobétasol pourrait affecter de manière significative la structure et la diversité de la communauté microbienne de la peau humaine. Nous nous sommes concentrés sur les femmes africaines utilisant ces produits et vivant dans la ville de Montréal (Canada). Nous avons également prélevé une population contrôle comprenant les femmes africaines n'utilisant pas les produits éclaircissants et vivant dans la ville de Montréal (Canada). Notre objectif était de comparer le microbiome cutané de femmes africaines utilisant des produits éclaircissants au microbiome cutané de femmes africaines qui n'en utilisent pas. Notre hypothèse de départ était que ces deux microbiomes seraient significativement différents. Nous avons émis cette hypothèse puisque nous avons pensé que les ingrédients actifs couramment présents dans les crèmes éclaircissantes influenceraient de façon significative le microbiome cutané des femmes qui utilisent ces produits versus celui des femmes qui ne les utilisent pas.

3.3. Matériels et Méthodes

3.3.1. Prélèvement et recrutement des participantes

37 femmes adultes africaines résidant au Canada depuis au moins 6 mois, volontaires et en bonne santé, âgées de 18 à 45 ans et n'ayant aucune maladie chronique de la peau, ont été recrutées dans la ville de Montréal. Aucune de ces femmes n'avait utilisé d'antibiotiques cutanés ou oraux depuis au moins 2 mois. Toutes les participantes ont fourni un consentement verbal après avoir pris connaissance des informations concernant le projet. Afin de minimiser l'effet du lavage, les sujets ont été invités à ne pas se laver avec quoi que ce soit, y compris l'eau, pour un

intervalle de 8h au moins avant l'échantillonnage (Grice et al., 2008) . L'étude a été approuvée par le Comité d'éthique de la Faculté des Arts et des Sciences de l'Université de Montréal. Deux types de groupes ont été recrutés.

Nous nous sommes basées sur les informations inscrites sur les emballages des crèmes afin de connaître les agents actifs contenus dans les produits habituellement utilisés par nos participantes.

Groupes	Sous-groupes	Total
Femmes africaines utilisant les produits	Celles utilisant les produits riches en mercure	2
	Celles utilisant les produits riches en hydroquinone	9
	Celles utilisant les produits riches en propionate de clobétasol	3
	Celles utilisant les produits riches en acide Kojique et en acide ascorbique	2
Femmes africaines n'utilisant pas les produits	Celles n'utilisant pas les produits éclaircissants	21
Total		37

Des échantillons provenant de ces différents groupes de personnes ont été prélevés au niveau du front à l'aide d'écouvillons stériles mouillés préalablement dans une solution stérile de Tween 20 (0,15M de NaCl et de 0,1% de Tween 20). Nous avons regroupé ensemble dans une catégorie nommée « autres ingrédients », les femmes utilisant les produits riches en acide

ascorbique et en acide kojique à des fins statistiques. Nous portions une paire de gants neufs lors de chaque prélèvement.

Le prélèvement consistait à tenir l'axe de la tige de l'écouvillon parallèlement à la surface de la peau, puis frotter l'écouvillon de l'avant en arrière sur une surface de 3x5cm du front environ 50 fois pour une durée de 60 secondes. La tête de chaque écouvillon (utilisé pour le prélèvement) a été coupée de façon aseptique dans un tube en polypropylène. Chaque échantillon a été immédiatement numéroté et déposé sur glace pour être acheminé au laboratoire. Tous les échantillons prélevés ont été conservés à -80°C jusqu'au jour de l'extraction de l'ADN (Blaser et al., 2013, Grice et al., 2009, Grice et al., 2008).

3.3.2. Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait en utilisant le kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA). Comme les bactéries Gram-positives sont plus résistantes à la lyse que les bactéries Gram-négatives (Grice et al., 2009), le protocole du fabricant pour l'isolement d'ADN génomique à partir de bactéries Gram positives a été suivi avec une légère modification. En bref, nous avons ajouté 180 µl d'une solution tampon de TE-Triton (20mM Tris à pH: 8.0; 2mM EDTA; 1,2% Triton X-100) au lysozyme fraîchement préparé dans chaque tube contenant les échantillons prélevés (tête d'écouvillon). Après avoir mélangé brièvement au vortex les échantillons, nous les avons incubés à 37°C pendant 30 min. Ensuite, nous avons ajouté des billes en acier inoxydable de 0,5 mm (Qiagen, Valencia, CA) préalablement stérilisées dans chaque tube contenant les échantillons. Nous avons de nouveau mélangé au vortex les tubes à vitesse maximale pendant 10 minutes avant de continuer avec les autres étapes recommandées par le fabricant (Li et al., 2014, Blaser et al., 2013, Staudinger et al., 2011, Grice et al., 2009, Grice et

al., 2008). Tous les échantillons d'ADN ont été mesurés au Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA) puis conservés à -20°C. La librairie PCR ainsi que le séquençage de nos échantillons ont été réalisés au centre de séquençage de Génome Québec.

3.3.3. Amplification de la PCR

Le gène de l'ARNr 16S est présent chez presque toutes les bactéries et contient des régions hautement conservées et des régions hypervariables, ce qui permet d'utiliser facilement la PCR pour la catégorisation phylogénétique. Dans ce projet, nous avons réalisé l'amplification par PCR des gènes de l'ARNr 16S (régions V1-V2) à partir d'ADN génomique en utilisant les amorces 27F et 338R:

27F-CS1 : ACACTGACGACATGGTTCTACAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG

338R-CS2 : TACGGTAGCAGAGACTTGGTCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

Nous avons choisi ces deux amorces parce qu'elles permettent d'avoir de meilleures informations sur la diversité taxonomique pour les échantillons de la peau (Kuczynski et al., 2012).

Pour chaque échantillon, les conditions étaient les suivantes: tampon 10X 2.5 µL + 18 mM de MgCl₂ (Roche Applied Science), 0.5 µL de mélange de dNTP (10 mM chacun; Invitrogen), 19.9 µL de chaque amorce (20 pM; IDT), 2 µl d'ADN génomique bactériens, et 0.1µL Taq Roche 5U/µl. Par la suite, la série de programme suivante a été déclenchée: 95°C pendant 5min, suivie par 27 cycles de 94°C pour 45 secondes, 55°C pour 60 secondes et 72°C pour 60 secondes, avec une extension finale de 10 min à 72°C.

Pour chaque échantillon, les conditions étaient les suivantes pour la deuxième PCR: tampon 10X 2 μ L + 3.6 mM de $MgCl_2$ (Roche Applied Science), 1 μ l de DMSO, 0.4 μ L de mélange de dNTP (10 mM chacun; Invitrogen), 0.1 μ L Taq Roche 5 U/ μ l, 9.9 μ l d'eau, 2 μ L du barcode Illumina (2uM barcode illumina batch4) et 1 μ l de 1/200^e de PCR1. Ensuite, la série de programme suivante a été déclenchée: 95°C pendant 10min, suivie par 15 cycles de 95°C pour 15secondes, 60°C pour 30 secondes et 72°C pour 1min, avec une extension finale de 3 min à 72°C.

Après la deuxième PCR (qui consiste à incorporer les barcodes Illumina) un dosage de l'ADN a été fait en utilisant le kit Quant-iT PicoGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA) sur les produits de la deuxième PCR afin de normaliser chacun des échantillons dans le pool (30 ng de chaque échantillons). Le pool est ensuite purifié avec des billes magnétiques Agencourt Ampure XP (Beckman), est dosé par Picogreen et/ou Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA) et est mis sur une puce BioAnalyzer High sensitivity (Agilent) afin de vérifier la taille des fragments (~ 331pb; taille attendue) dans le pool et de s'assurer que la purification a bien fonctionné. Tous les échantillons ont été amplifiés en duplicata. Nous avons inclus dans toutes les étapes de la PCR deux échantillons de contrôles de qualité dont un contrôle négatif (un blanc microbiome provenant du centre de séquençage de génome Québec) et un contrôle positif (échantillon de référence, de composition microbienne connue : HM-782D) afin de vérifier d'éventuelles contaminations des amplicons ou des échantillons d'ADN. Pour l'échantillon de contrôle négatif, l'amplification par PCR n'a pas généré de produit de PCR. Par contre, l'échantillon d'ADN de composition connue (HM-782D) a été amplifié et les données de séquences obtenues étaient conformes à celles des bases de données. La librairie purifiée a été séquencée sur un

MiSeq (Kit V2, Chemistry) avec la longueur du séquençage pairé (2x 250bp). La qualité de score pour le séquençage de chaque échantillon était supérieure ou égale à 30.

Les lectures pairées (lectures des deux côtés du segment d'ADN) ont été concaténées à l'aide du script Python **join_paired_ends.py** de la suite logicielle **QIIME**. Les bibliothèques de lectures ont été démultiplexées avec le script **split_libraries_fastq.py** en se basant sur l'identification de code-barre. Les séquences chimériques ont été identifiées en utilisant la méthode **usearch 61** avec le script **identify_chimeric_seqs.py**, puis retirées avec le script **filter_fasta.py**. Le séquençage des échantillons d'ADN bactérien a produit 3453210 lectures avec une moyenne de 63948.333 ± 8502.930 lectures par échantillon. Chaque échantillon a été raréfié et réduit à 30000 lectures à l'aide d'analyses ultérieures (sauf indication contraire, par exemple pour des analyses DESeq2). La détermination des OTUs (unités taxonomiques opérationnelles) les plus proches des échantillons a été effectuée avec **QIIME** (via le script **pick_closed_reference_otus.py**) à un niveau d'identité de 97%. Les OTUs ayant moins de 10 observations dans tous les échantillons ont été retirés de la table des OTUs (avec le script **filter_otus_from_otu_table.py**). Nous avons finalement obtenu un ensemble de données de 37 échantillons et de 1124 OTUs.

3.3.4. Analyses statistiques

Les mesures de la diversité alpha (diversité au sein d'un même échantillon) et de la diversité bêta (diversité entre échantillons) ont été réalisées avec **QIIME**, ainsi qu'avec le package *phyloseq* dans R. La diversité alpha a été déterminée en utilisant les trois métriques suivantes: nombre d'OTUs, *chao1* et Shannon. La métrique « nombre d'OTUs » permet d'évaluer la richesse en OTUs. La métrique *Chao1* prend en compte non seulement le nombre

d'OTUs mais également le nombre de taxons rares (singletons et doubletons). Ces deux premières métriques sont souvent utilisées pour mesurer la diversité alpha qualitative. L'indice de Shannon permet d'évaluer « l'équitabilité » de la communauté microbienne (*community evenness*). Un indice de Shannon élevé indique que les taxons présents dans la communauté sont nombreux ou ont des abondances similaires, tandis qu'un indice plus bas décrit une communauté avec peu de taxons ou des abondances déséquilibrées entre les taxons présents. Pour la diversité bêta, les analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées en utilisant la métrique de distance Unifrac, Bray-Curtis et JSD (Caporaso et al., 2010, Lozupone and Knight, 2008, Lozupone et al., 2007).

3.4. Résultats et Discussion

Notre étude visait à déterminer l'impact potentiel de l'application de produits éclaircissants sur le microbiome cutané humain. Le séquençage haut débit par la plate-forme Illumina a permis d'obtenir de l'information génétique (ADN). À partir donc de cet ADN, nous avons pu faire des assignations taxonomiques (OTUs). Avec l'abondance ou la distribution des OTUs, nous avons pu identifier les taxons les plus représentés dans les différents groupes. La comparaison de ces différents jeux de données de séquences par les outils statistiques appropriés nous a permis d'explorer l'effet des produits éclaircissants sur le microbiome cutané.

3.4.1. Abondance relative (niveau phylum et genre) :

La **figure 3.1** représente la distribution relative des phyla et genres principaux, séparés selon les groupes « crèmes blanchissantes » et « sans crèmes blanchissantes » chez les femmes africaines.

Les phyla dominants sont : *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, et *Bacteroidetes* dans tous les échantillons recueillis. Ces principaux phyla sont habituellement observés dans d'autres études portant sur le microbiome cutané du front et n'incluant pas les personnes utilisant des produits éclaircissants. De plus, les études réalisées par Staudinger et al. (2011) ont déterminé ces mêmes types de phyla dominant dans le microbiome du front des femmes utilisant des produits de maquillage. Même si la littérature ne nous renseigne pas sur des études portant spécifiquement sur le microbiome cutané des femmes utilisant les produits éclaircissants, elle nous permet de remarquer que les phyla dominant dans le microbiome du front ou dans celui d'autres sites cutanés (sites secs ou humides) sont généralement les mêmes (ou bien conservés) et varient parfois en abondance relative d'une personne à une autre et selon le site de peau considéré. Par exemple les études réalisées par (Grice et al., 2009) sur 20 différents sites de la peau (incluant les sites sébacés, les sites humides et les sites secs), ont permis d'observer globalement 19 phyla, mais les phyla dominant étaient *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, peu importe le type de site (riche en sébum, sec ou humide) considéré.

Par ailleurs, cinq genres *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, et *Micrococcus* sont présents dans tous les échantillons prélevés, aussi bien chez les femmes utilisant des produits éclaircissants que chez les femmes qui n'en utilisent pas. On remarque qu'il y a une variation de l'abondance relative des genres présents d'un individu à un autre, et les bactéries du genre *Propionibacterium* sont largement dominantes dans tous les

échantillons des personnes prélevées. En fait, le front est un environnement cutané caractérisé par peu d'organismes et ayant un degré de variabilité interindividuelle un peu moins important que les sites secs et humides de la peau (Staudinger et al., 2011, Costello et al., 2009, Grice et al., 2009). Il est dominé par les bactéries du genre *Propionibacterium* qui sont des bactéries Gram-positif, anaérobies facultatives et lipophiles capables de sécréter des protéines spécifiques leur permettant de bien s'adapter dans les milieux riches en lipides (Scharschmidt and Fischbach, 2013, Brüggemann et al., 2004). Les espèces *Propionibacterium acnes* sont celles qui prédominent dans ce milieu et semblent associées à une maladie de la peau appelée l'acné qui peut aussi apparaître ordinairement pendant la période pubertaire. Nos résultats nous indiquent donc que les genres présents sur le front sont conformes aux genres décrits dans la littérature, mais sont les mêmes dans les deux groupes considérés. À ce stade, nous ne pouvons donc pas observer de différences qualitatives entre le groupe des femmes qui utilisent des produits éclaircissants et le groupe des femmes qui n'en utilisent pas.

En fait, la variabilité interindividuelle observée semble normale puisqu'il est connu que l'abondance relative du microbiome de la peau est beaucoup plus variable d'une personne à une autre sur un même site prélevé du fait de plusieurs facteurs tels que la quantité de sébum, le pH de la peau, la production de sueur, le mode de vie et l'utilisation des produits cosmétiques (Bouslimani et al., 2015, Staudinger et al., 2011, Fierer et al., 2008, Holland and Bojar, 2002, Roth and James, 1988). Le sébum étant produit par les glandes sébacées, il prévient l'assèchement de la peau et des poils et contient des substances qui détruisent les bactéries présentes à la surface de la peau. Le front est un environnement cutané riche en sébum et la disparité de la production de quantité de sébum au niveau du front d'une personne à une autre

tout comme celle des autres facteurs peut être responsable donc de ces variabilités interindividuelles observées entre les personnes prélevées.

3.4.2. Diversité Alpha

En analysant les métriques du nombre d'OTUs et de chao1 , la comparaison des résultats de la diversité alpha nous révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre le groupe sans crème et le groupe avec crème, avec 20 à 45 OTUs observés par front de personnes prélevées (**figure 3.2**). Ces résultats sont conformes à ceux réalisés par Staudinger et al. (2011) et Grice et al. (2009) qui avaient trouvé un nombre similaire d'OTUs sur le front, mais leurs études n'ont pas été réalisées sur des personnes utilisant les crèmes éclaircissantes.

Cependant, en observant la métrique de Shannon, nous pouvons constater que les femmes utilisant les crèmes ont un indice de Shannon plus élevé que les femmes qui n'en utilisent pas. Les communautés microbiennes des femmes qui utilisent les crèmes sont donc plus équitables. Plusieurs scénarios sont susceptibles d'expliquer l'augmentation de cette équitabilité : l'augmentation de l'abondance des taxons habituellement rares, la diminution de l'abondance des taxons habituellement dominants, ou la réduction du nombre d'OTUs via la disparition de taxons rares ou de taxons dominants. Cependant, la **figure 3.1** présente des niveaux d'abondance relative élevés pour les taxons dominants, et la métrique du nombre d'OTUs n'indiquait pas de différences significatives entre les deux groupes de femmes. On peut donc considérer que l'augmentation de l'indice de Shannon est très peu due à une réduction du nombre d'OTUs. L'uniformisation des abondances relatives, via l'augmentation des abondances de taxons rares ou la diminution des abondances des taxons dominants, semble être le scénario le plus susceptible d'expliquer l'augmentation de l'équitabilité des communautés

microbiennes des fronts des femmes qui utilisent des crèmes. À ce stade, des analyses plus approfondies sont nécessaires pour déterminer le sens de l'uniformisation des abondances, à savoir si les taxons rares sont devenus plus abondants, ou si les populations des taxons dominants ont diminué.

3.4.3. Diversité Bêta

Afin d'explorer la similarité entre les différents groupes de personnes prélevées, nous avons réalisé des analyses en composante principale (prenant en compte l'abondance et ne prenant pas en compte l'abondance) à partir d'une matrice de distance UniFrac, et de Bray-Curtis et JSD (**figure 3.3**). La PCA indique qu'il n'y a pas de regroupements très clairs pour la diversité bêta distinguant les deux groupes de femmes. Cependant, sur la **figure 3.3** (voir Bray-Curtis, JSD), certaines femmes (AFR3, AFR4, AFR5, AFR10) utilisant les crèmes à hydroquinone semblent plus similaires que d'autres qui ne les utilisent pas (AFR32, AFR33, AFR36). De plus, les femmes AFR9 (utilisant les crèmes à hydroquinone) et AFR35 (n'utilisant pas de crème) âgées respectivement de 40 à 44 ans sont toujours séparées (à une exception près) des autres femmes (âgées de 20 à 43 ans) dans les quatre composantes principales. Il semble donc qu'il y a des tendances de regroupement entre les femmes utilisant les crèmes à hydroquinone par rapport à d'autres femmes, même si ce regroupement se fait aussi avec des femmes qui n'utilisent pas de crèmes. De plus, les femmes les plus âgées semblent toujours les plus éloignées des regroupements.

Cette observation qualitative de regroupement de femmes utilisant les produits éclaircissants semble être due aux effets globaux attendus des agents actifs toxiques contenus dans les produits éclaircissants sur la communauté microbienne cutanée. Bien que cette **figure 3.3** ne nous permette pas de voir nettement l'effet des crèmes éclaircissantes sur la communauté

microbienne de la peau, elle nous renseigne au moins sur l'effet de ces produits sur le microbiome au sein de chaque groupe de participantes. Nos résultats ne sont pas directement comparables à ceux de Staudinger et al. (2011) qui ont trouvé à l'aide d'une PCA que les femmes qui utilisaient les produits de maquillage sur le front sont dispersées alors que celles qui ne les utilisent pas étaient bien groupées, puisque que nous avons travaillé avec des produits éclaircissants alors que ces études ont été réalisées avec des produits de maquillage. De plus nous n'avons pas vu d'études particulièrement sur les produits éclaircissants.

Donc, les produits de maquillage étudiés peuvent avoir des agents actifs aux actions différentes des agents que nous avons étudiés. De plus, les auteurs expliquent leurs résultats par le fait que l'un des sujets utilisant les produits de maquillage semble être une participante aberrante majeure en ce qui concerne la composition de sa communauté. Ils suggèrent que la participante aberrante a été colonisée par les staphylocoques du fait de l'influence des produits de maquillages. Toutefois, nos résultats semblent être similaires aux études réalisées par Callewaert et al. (2014) qui montrent un regroupement clair entre les échantillons des personnes utilisant du déodorant et ceux des personnes qui utilisaient des anti-transpirants indiquant le comportement du microbiome des aisselles face aux ingrédients contenus dans ces produits. Les sels d'aluminium contenus dans les anti-transpirants avaient un effet dissemblable sur les *Firmicutes* et les *Actinobacteria*, tous deux plus abondants dans le microbiome des aisselles, alors que les déodorants n'en contenaient pas. Cependant, il est important de noter que le microbiome du front n'est pas forcément celui des aisselles et l'aluminium a peut-être des effets différents du mercure, de l'hydroquinone ou du propionate de clobétasol sur la peau et sur les bactéries. En conséquence, même si nos résultats se rapprochent de ceux de Callewaert et al. (2014), cette similarité ne nous renseigne pas vraiment sur le léger regroupement que nous avons

observé dans le cas de cette étude car les milieux (front versus aisselles) et les conditions des milieux ne sont pas réellement comparables. Cependant, cela nous permet de remarquer que les produits appliqués sur la peau sont susceptibles d'influencer le microbiome (selon le produit, et selon la région de peau étudiée).

Globalement, nous pouvons dire à l'étape actuelle de l'analyse des résultats que l'âge explique une faible partie de la variance observée à l'échelle de la communauté (adonis, $P = 0.04$, $R^2 = 0.07$). Ceci est en accord avec des études antérieures réalisées par Leung et al. (2015) dans lesquels les auteurs ont montré que l'âge était l'un des patrons de regroupement à la fois pour la structure et la composition microbienne cutanée.

3.5. Conclusion

Le principal objectif de ce projet était d'explorer l'impact des produits éclaircissants sur le microbiome de la peau. Globalement, nos résultats confirment les résultats des études antérieures et montrent qu'il y a beaucoup de variabilité interindividuelle en termes de distribution relative des taxons (niveau phylum et genre), sans une tendance claire entre le groupe des femmes africaines utilisant les crèmes éclaircissantes et celui des femmes qui ne les utilisent pas. L'étude nous révèle également un léger regroupement des participantes utilisant des crèmes blanchissantes à l'échelle de communauté. Bien que ce léger regroupement entre les femmes utilisant les crèmes éclaircissants ne soit pas statistiquement significatif, cela ouvre des pistes de recherches et semble particulièrement important dans la compréhension de l'effet des crèmes éclaircissantes sur le microbiome cutané. Cela peut constituer une contribution importante puisque jusqu'à ce jour, on ne sait pas encore dans quel sens (diminution de la diversité, augmentation de diversité, prolifération d'agents infectieux, activation d'agents de conservation une fois en contact avec le microbiome de la peau, etc.) ces produits contenant des

ingrédients tels que le mercure, l'hydroquinone ou le propionate de clobétasol déplaceraient l'équilibre microbien à la surface de la peau.

D'autres investigations prenant en compte ces aspects et la variabilité temporelle du microbiome cutané devraient également être entreprises afin de bien comprendre les effets avant, pendant et après utilisation des crèmes éclaircissantes sur la communauté microbienne de la peau. Ces études donneront certainement un aperçu de la dynamique du microbiome cutané chez les personnes utilisant les produits éclaircissants. Puisque les habitudes d'utilisation des produits cosmétiques ne semblent pas en général être les mêmes entre les femmes d'origine africaine et les femmes caucasiennes, il pourrait aussi être intéressant de comparer le microbiome de ces deux groupes de populations afin d'explorer s'il existe au sein de chaque population des taxons spécifiques. Finalement, d'autres études plus poussées prenant en compte les gènes des microorganismes se trouvant sur la peau (par exemple les gènes du métabolisme du mercure), seraient nécessaires afin de mieux comprendre l'effet des produits éclaircissants sur le microbiome de la peau car la seule étude taxonomique basée sur le gène de l'ARNr16S ne semble pas suffisante pour comprendre clairement l'effet de ces produits sur le microbiome cutané.

3.6. Figures

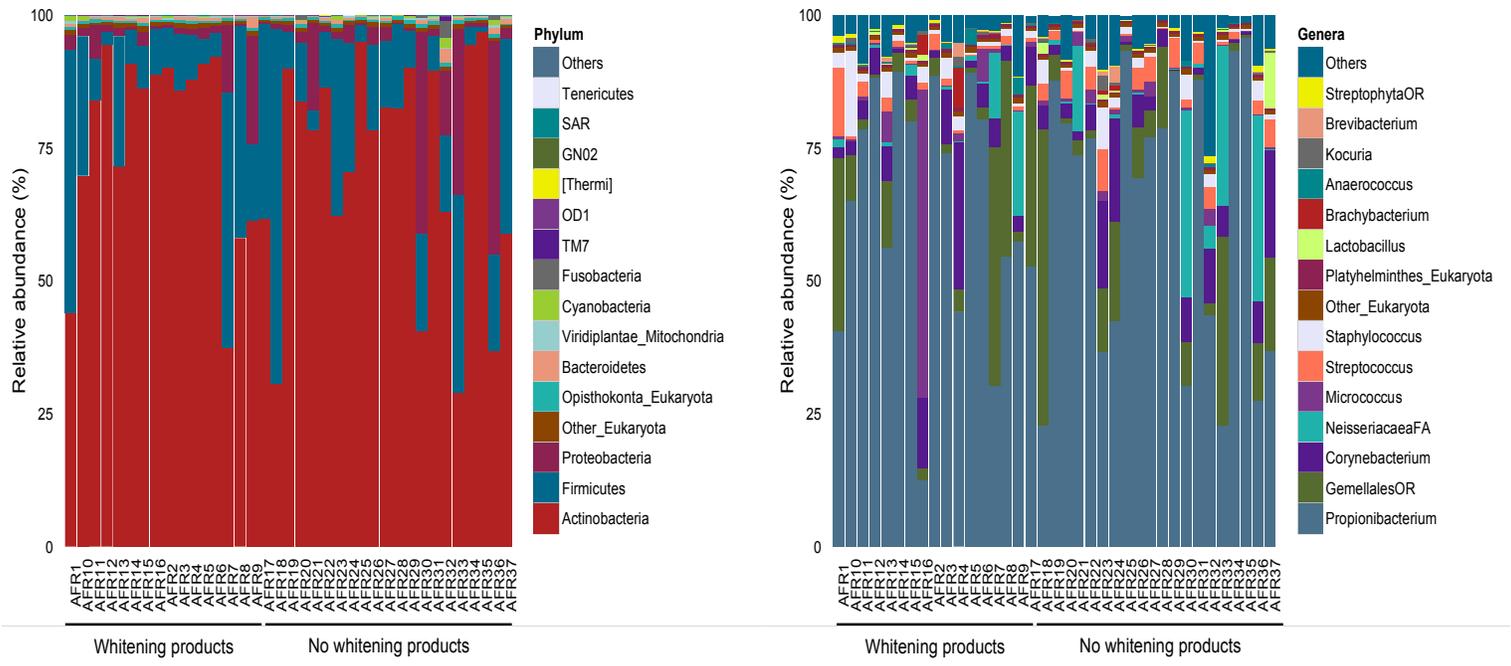


Figure 3.1. Distribution relative des phylums et genres principaux dans les échantillons des femmes d'origine africaine, séparés selon les groupes « crèmes blanchissantes » et « sans crèmes blanchissantes ».

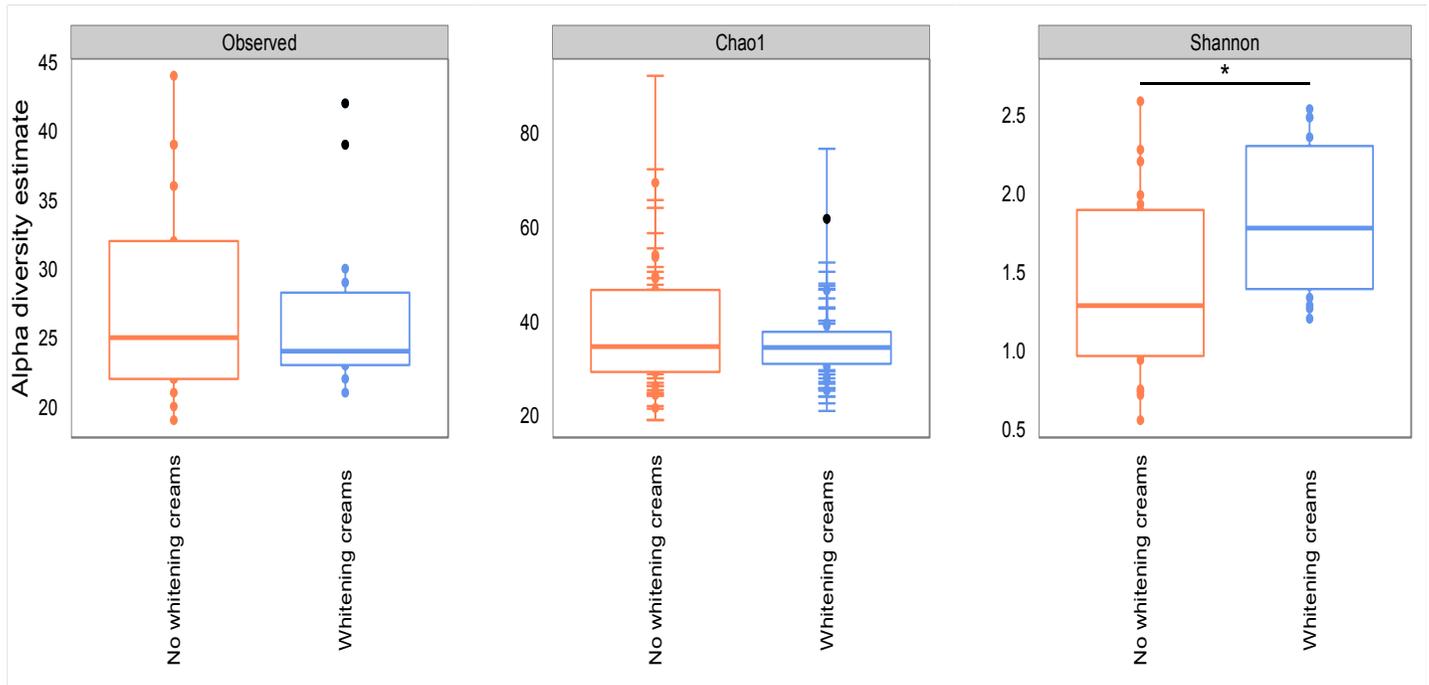


Figure 3.2. Diversité alpha, selon trois métriques (# d'OTUs, chao1 et Shannon) au sein des échantillons de femmes d'origine africaine avec ou sans crèmes éclaircissantes.

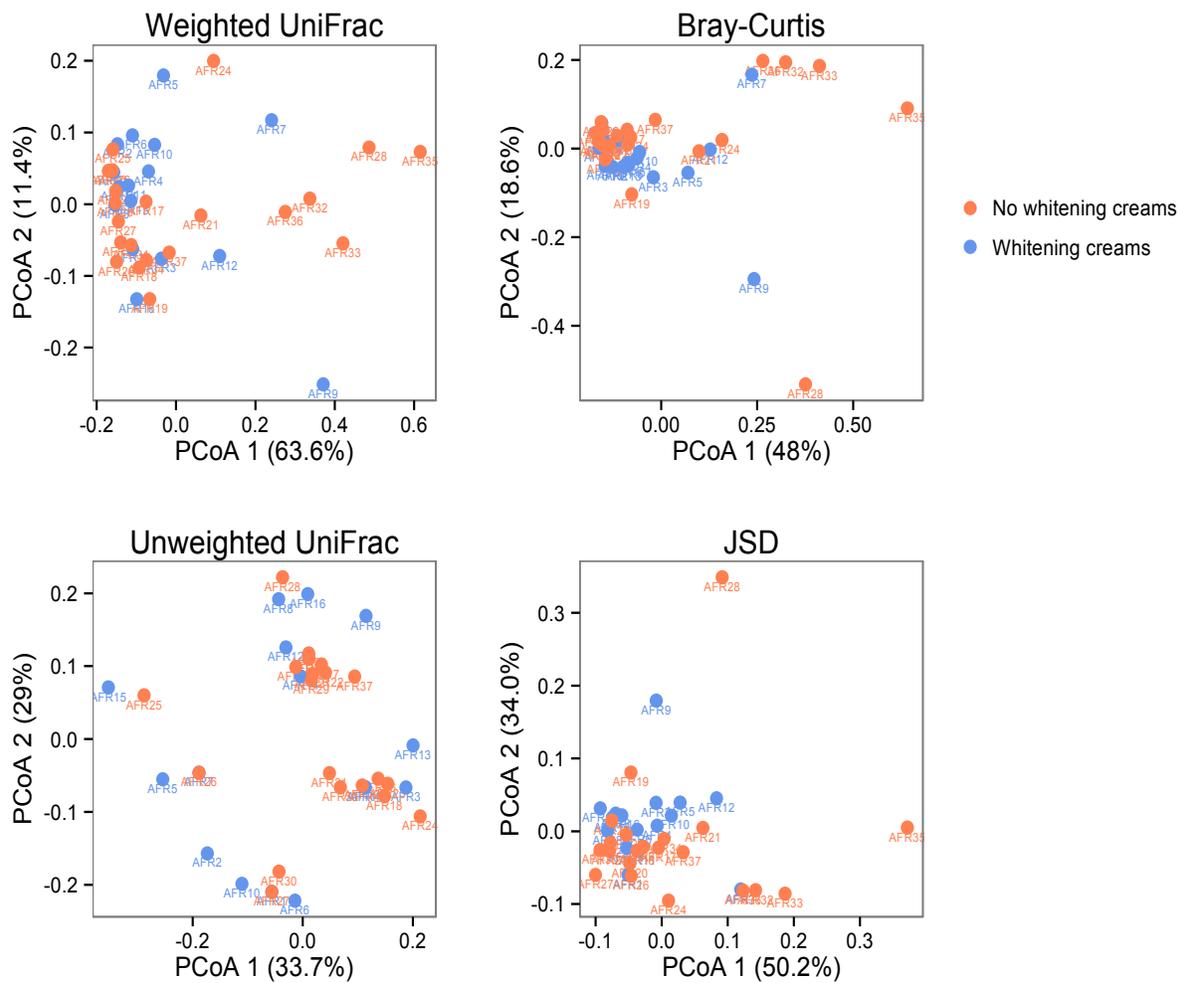


Figure 3.3. Analyses en composantes principales des échantillons de femmes d'origine africaine avec ou sans crèmes éclaircissantes.

3.7. Remerciements

Cette étude a été réalisée grâce à une subvention du CRSNG Découverte de M.A. Nous remercions Dominic Bélanger, Simone Périnet et Julie Marleau pour leur aide de laboratoire, Jesse Shapiro pour ces précieux conseils, et les membres du jury pour leurs commentaires sur ce travail. MH.G remercie la Banque Islamique de développement (BID) pour son appui financier.

Chapitre 4: Conclusion

Cette étude a permis d'enrichir nos connaissances sur la contamination des crèmes éclaircissantes et ouvre des pistes de recherches dans la compréhension de leurs effets sur le microbiome cutané humain.

Premièrement, nous avons comme objectif de déterminer les concentrations de mercure, d'hydroquinone et de propionate de clobétasol dans une grande variété de produits éclaircissants utilisés par les femmes dans les pays d'Afrique de l'Ouest et au Canada. Nos résultats montrent bien que ces ingrédients sont encore utilisés en concentrations élevées dans les produits éclaircissants. L'étude nous a également révélé que les savons étaient plus concentrés en mercure comparativement aux crèmes qui étaient beaucoup plus concentrées en hydroquinone et en propionate de clobétasol lorsqu'on considère les normes de l'US FDA. Cependant lorsqu'on considère d'autres normes comme celle l'Union Européenne qui interdit complètement le mercure, l'hydroquinone et le propionate de clobétasol, dans les produits éclaircissants, l'étude nous révèle que de 68 à 84 % de toutes les crèmes et 7,5 à 65% de tous les savons dépassent les concentrations normales recommandées en mercure, en hydroquinone ou en propionate de clobétasol. Ces pourcentages de dépassement des limites réglementaires sont suffisamment élevés et inquiétants. Puisque ces produits sont largement utilisés dans plusieurs pays d'Afrique et au sein des communautés immigrantes noires, nous suggérons aux autorités compétentes de mettre en place des mesures plus appropriées afin de renforcer le contrôle et la vente de ces produits aussi bien dans les pays d'Afrique de l'Ouest qu'au Canada. L'étude peut aussi aider les autorités des pays concernés à avoir une meilleure appréciation des concentrations des différents ingrédients contenus dans les produits éclaircissants et à

sensibiliser leurs populations sur les risques d'utilisation de ces produits surtout dans les pays d'Afrique de l'Ouest où la plupart des populations semblent ignorantes de leurs effets sur la santé.

La deuxième partie de cette étude avait pour objectif d'étudier l'impact des produits éclaircissants sur le microbiome de la peau. Plus spécifiquement, nous voulions explorer si les femmes qui utilisent les produits éclaircissants avaient des taxons spécifiques versus celles qui ne les utilisent pas. Les résultats que nous avons obtenus montrent un léger regroupement des participantes utilisant des crèmes blanchissantes à l'échelle de la communauté. De plus, la diversité de Shannon, nous révèle également qu'il semble y avoir plus d'équitabilité, et donc moins de dominance dans le groupe des femmes utilisant les crèmes éclaircissantes que dans le groupe des femmes qui ne les utilisent pas. Toutefois, ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs et ne nous permettent pas de tirer une conclusion forte à l'étape actuelle de l'étude quant à l'existence (ou non) de taxons spécifiques dans le groupe de femmes africaines utilisant les produits éclaircissants versus celui de femmes africaines qui ne les utilisent pas. Cependant, ils ouvrent des pistes de recherches et semblent particulièrement intéressants dans la compréhension de l'effet de ces produits sur le microbiome cutané. Par exemple, il peut être intéressant d'entreprendre des études plus approfondies sur les genres bactériens majoritairement retrouvés dans le microbiome des femmes africaines utilisant les produits éclaircissants versus le groupe des femmes africaines qui ne les utilisent pas afin de comprendre l'intérêt toxicologique de ces genres bactériens. Des recherches plus ciblées sur les ingrédients par exemple le mercure seraient peut-être intéressantes car nous n'avons pas vu d'étude s'étant particulièrement penchée sur l'impact de ce polluant pourtant d'intérêt mondial sur le microbiome cutané.

De plus, cette étude suscite d'autres questions comme la compréhension des interactions entre nos routines quotidiennes (pratiques d'hygiène, usage des produits cosmétiques, port de vêtement, voyages, habitudes alimentaires, etc.) et le microbiome de la peau. Même si ces routines n'impliquent pas des produits éclaircissants, les résultats de telles études seront particulièrement importants puisqu'ils nous permettront de mettre en lumière à quel point chacun de ces éléments peut interférer avec notre microbiome cutané. Ils permettront également de comprendre comment les molécules contenues dans nos produits d'hygiène quotidienne peuvent moduler l'équilibre microbien à la surface de la peau.

Par ailleurs, nous serons également curieux de voir ce qui pouvait se passer dans le microbiome cutané lorsqu'on arrête d'utiliser les produits éclaircissants après une certaine période d'utilisation. On pourrait plus clairement comparer le microbiome cutané d'une même personne utilisant les produits éclaircissants pendant et après arrêt de l'utilisation de ces produits au fil du temps versus deux groupes témoins (par exemple le groupe des femmes d'origine africaine n'utilisant pas de produits éclaircissants et celui de femmes caucasiennes) afin d'explorer l'influence de ces produits dans le temps. Cela donnera une idée sur la variabilité temporelle du microbiome cutané avant, pendant et après utilisation des crèmes éclaircissantes.

Pour l'instant, on ne sait pas encore si au sein de différents groupes de populations, une différence dans les habitudes d'utilisation des produits cosmétiques sera le principal facteur à l'origine de la spécificité du microbiome dans chaque groupe de populations. Il peut être intéressant de comparer le microbiome cutané des femmes d'origine africaine versus celui des femmes caucasiennes afin d'explorer s'il existerait une éventuelle spécificité taxonomique dans chaque groupe ethnique, car il semblerait que les pratiques d'usage des produits cosmétiques diffèrent entre ces deux groupes ethniques. Une telle étude nous révélerait également si de telles

spécificités sont réellement dues à des différences d'habitudes d'utilisation des produits cosmétiques ou à des différences ethniques.

Puisque certains ingrédients contenus dans les produits éclaircissants semblent avoir des effets antimicrobiens et d'autres sont parfois considérés comme des sources de nutriments, nous ne savons pas non plus comment ces nutriments influencent le microbiome de la peau. Augmenteraient-ils ou diminueraient-ils la biomasse ou la diversité de la communauté microbienne ? Il pourrait être aussi intéressant de se pencher particulièrement sur l'effet de ces nutriments afin de ne pas sous-estimer leur impact sur le microbiome cutané.

Finalement, d'autres études plus poussées utilisant les approches métagénomiques seraient nécessaires afin de mieux déterminer les effets des produits éclaircissants sur le microbiome cutané.

Bibliographie

- ADEPOJU-BELLO, A., OGUNTIBEJU, O., ADEBISI, R., OKPALA, N. & COKER, H. 2012. Evaluation of the concentration of toxic metals in cosmetic products in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 11, 16360-16364.
- AGORKU, E. S., KWAANSA-ANSAH, E. E., VOEGBORLO, R. B., AMEGBLETOR, P. & OPOKU, F. 2016. Mercury and hydroquinone content of skin toning creams and cosmetic soaps, and the potential risks to the health of Ghanaian women. *SpringerPlus*, 5, 1.
- AKE, M., OGA, S., BONY, N., AMIN, N. & MALAN, A. 2007. Recherche et dosage du 17-propionate de clobétasol et du 17-, 21-dipropionate de bétaméthasone dans les crèmes et gels vendus sur les marchés publics d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *J Science Pharm Biol*, 8, 25-33.
- AL-SALEH, I. & AL-DOUSH, I. 1997. Mercury content in skin-lightening creams and potential hazards to the health of Saudi Women. *J Toxicol Environ Health*, 51, 123-30.
- AL-SALEH, I., EL-DOUSH, I., SHINWARI, N., AL-BARADEI, R., KHOGALI, F. & AL-AMODI, M. 2005. Does low mercury containing skin-lightening cream (fair & lovely) affect the kidney, liver, and brain of female mice? *Cutan Ocul Toxicol*, 24, 11-29.
- AL-SALEH, I., ELKHATIB, R., AL-ROUQI, R., AL-ENAZI, S. & SHINWARI, N. 2012. The dangers of skin-lightening creams. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 94, 195-219.
- ALQADAMI, A. A., ABDALLA, M. A., ALOTHMAN, Z. A. & OMER, K. 2013. Application of solid phase extraction on multiwalled carbon nanotubes of some heavy metal ions to analysis of skin whitening cosmetics using ICP-AES. *Int J Environ Res Public Health*, 10, 361-74.
- BARANOWSKA -DUTKIEWICZ, B. 1982. Evaluation of the skin uptake of mercuric chloride in man. *Journal of Applied Toxicology*, 2, 223-225.
- BARR, R., REES, P., CORDY, P., KUNGU, A., WOODGER, B. & CAMERON, H. 1972. Nephrotic syndrome in adult Africans in Nairobi. *British medical journal*, 2, 131.
- BLASER, M. J., DOMINGUEZ-BELLO, M. G., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., ESTRADA, I., GAO, Z., CLEMENTE, J. C., COSTELLO, E. K. & KNIGHT, R. 2013. Distinct cutaneous bacterial assemblages in a sampling of South American Amerindians and US residents. *ISME J*, 7, 85-95.

- BOCCA, B., PINO, A., ALIMONTI, A. & FORTE, G. 2014. Toxic metals contained in cosmetics: a status report. *Regul Toxicol Pharmacol*, 68, 447-67.
- BOUSLIMANI, A., PORTO, C., RATH, C. M., WANG, M., GUO, Y., GONZALEZ, A., BERG-LYON, D., ACKERMANN, G., MOELLER CHRISTENSEN, G. J., NAKATSUJI, T., ZHANG, L., BORKOWSKI, A. W., MEEHAN, M. J., DORRESTEIN, K., GALLO, R. L., BANDEIRA, N., KNIGHT, R., ALEXANDROV, T. & DORRESTEIN, P. C. 2015. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E2120-9.
- BRÜGGEMANN, H., HENNE, A., HOSTER, F., LIESEGANG, H., WIEZER, A., STRITTMATTER, A., HUJER, S., DÜRRE, P. & GOTTSCHALK, G. 2004. The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. *Science*, 305, 671-673.
- CALLEWAERT, C., HUTAPEA, P., VAN DE WIELE, T. & BOON, N. 2014. Deodorants and antiperspirants affect the axillary bacterial community. *Arch Dermatol Res*, 306, 701-10.
- CAPORASO, J. G., KUCZYNSKI, J., STOMBAUGH, J., BITTINGER, K., BUSHMAN, F. D., COSTELLO, E. K., FIERER, N., PENA, A. G., GOODRICH, J. K. & GORDON, J. I. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7, 335-336.
- CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., COSTELLO, E. K., BERG-LYONS, D., GONZALEZ, A., STOMBAUGH, J., KNIGHTS, D., GAJER, P., RAVEL, J., FIERER, N., GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2011. Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biol*, 12, R50.
- CHAN, T. Y. 2011. Inorganic mercury poisoning associated with skin-lightening cosmetic products. *Clin Toxicol (Phila)*, 49, 886-91.
- COPAN, L., FOWLES, J., BARREAU, T. & MCGEE, N. 2015. Mercury Toxicity and Contamination of Households from the Use of Skin Creams Adulterated with Mercurous Chloride (Calomel). *International journal of environmental research and public health*, 12, 10943-10954.
- COSTELLO, E. K., CARLISLE, E. M., BIK, E. M., MOROWITZ, M. J. & RELMAN, D. A. 2013. Microbiome assembly across multiple body sites in low-birthweight infants. *MBio*, 4, e00782-13.
- COSTELLO, E. K., LAUBER, C. L., HAMADY, M., FIERER, N., GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2009. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 1694-7.

- DADZIE, O. E. & PETIT, A. 2009. Skin bleaching: highlighting the misuse of cutaneous depigmenting agents. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 23, 741-750.
- DAIAN, T., NAMIKOSHI, T. & FUJII, H. 1995. Intracellular distribution of Hg²⁺ applied to epidermis in mice. Analysis of subcellular fractions. *Journal of dermatological science*, 10, 233-237.
- DEL GIUDICE, P., RAYNAUD, E. & MAHE, A. 2003. L'utilisation cosmétique de produits dépigmentants en Afrique. *Bull Soc Pathol Exot*, 96, 389-393.
- DELEVOYE, C., GIORDANO, F., VAN NIEL, G. & RAPOSO, G. 2011a. [Biogenesis of melanosomes - the chessboard of pigmentation]. *Med Sci (Paris)*, 27, 153-62.
- DELEVOYE, C., GIORDANO, F., VAN NIEL, G. & RAPOSO, G. 2011b. La biogenèse des mélanosomes: l'échiquier de la pigmentation. *Medecine sciences: M/S*, 27, 153.
- DENTON, C. R., LERNER, A. B. & FITZPATRICK, T. B. 1952. Inhibition of melanin formation by chemical agents. *Journal of Investigative Dermatology*, 18, 119-135.
- DESMEDT, B., VAN HOECK, E., ROGIERS, V., COURSELLE, P., DE BEER, J. O., DE PAEPE, K. & DECONINCK, E. 2014. Characterization of suspected illegal skin whitening cosmetics. *J Pharm Biomed Anal*, 90, 85-91.
- DRÉNO, B. 2008. Anatomie, immunologie de la peau et de ses annexes. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, 135, 149-152.
- ENGLER, D. E. 2005. Mercury "bleaching" creams. *J Am Acad Dermatol*, 52, 1113-4.
- ENGUITA, F. J. & LEITAO, A. L. 2013. Hydroquinone: environmental pollution, toxicity, and microbial answers. *Biomed Res Int*, 2013, 542168.
- EU 2009. Regulation (ec) no 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 november 2009 on cosmetic products. *Official Journal of the European Union L*, 342.
- FANNY, A., COULIBALY, F., OUATTARA, A., SANGARE, Y., BERETE-COULIBALY, R., GBE, K. & BONI, S. 2014. [Cataracts related to the extended application of dermocorticosteroids. A study of 8 cases in Abidjan]. *J Fr Ophtalmol*, 37, 388-92.
- FIERER, N., HAMADY, M., LAUBER, C. L. & KNIGHT, R. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 17994-9.
- FINDLEY, K., OH, J., YANG, J., CONLAN, S., DEMING, C., MEYER, J. A., SCHOENFELD, D., NOMICOS, E., PARK, M., PROGRAM, N. I. H. I. S. C. C. S.,

- KONG, H. H. & SEGRE, J. A. 2013. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature*, 498, 367-70.
- GAO, Z., TSENG, C. H., PEI, Z. & BLASER, M. J. 2007. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 2927-32.
- GILLBRO, J. M. & OLSSON, M. J. 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches. *Int J Cosmet Sci*, 33, 210-21.
- GLAHDER, C. M., APPEL, P. W. U. & ASMUND, G. 1999. Mercury in soap in Tanzania. *NERI Technical Report*, 306, 19.
- GLENN, E. N. 2008. Yearning for Lightness: Transnational Circuits in the Marketing and Consumption of Skin Lighteners. *Gender & Society*, 22, 281-302.
- GRIBBON, E., CUNLIFFE, W. & HOLLAND, K. 1993. Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro. *Journal of general microbiology*, 139, 1745-1751.
- GRICE, E. A., KONG, H. H., CONLAN, S., DEMING, C. B., DAVIS, J., YOUNG, A. C., PROGRAM, N. C. S., BOUFFARD, G. G., BLAKESLEY, R. W., MURRAY, P. R., GREEN, E. D., TURNER, M. L. & SEGRE, J. A. 2009. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324, 1190-2.
- GRICE, E. A., KONG, H. H., RENAUD, G., YOUNG, A. C., PROGRAM, N. C. S., BOUFFARD, G. G., BLAKESLEY, R. W., WOLFSBERG, T. G., TURNER, M. L. & SEGRE, J. A. 2008. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Res*, 18, 1043-50.
- GRICE, E. A. & SEGRE, J. A. 2012. Interaction of the microbiome with the innate immune response in chronic wounds. *Adv Exp Med Biol*, 946, 55-68.
- GROUPE THÉMATIQUE 'PEAU NOIRE' DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE DERMATOLOGIE 2011. [List of compounds used as cosmetics and reported as containing skin-lightening ingredients that are dangerous for health]. *Ann Dermatol Venereol*, 138, 443-6.
- HAMANN, C. R., BOONCHAI, W., WEN, L., SAKANASHI, E. N., CHU, C. Y., HAMANN, K., HAMANN, C. P., SINNIHAH, K. & HAMANN, D. 2014. Spectrometric analysis of mercury content in 549 skin-lightening products: is mercury toxicity a hidden global health hazard? *J Am Acad Dermatol*, 70, 281-7 e3.
- HAMMARSTROM, S., HAMBERG, M., DUELL, E. A., STAWISKI, M. A., ANDERSON, T. F. & VOORHEES, J. J. 1977. Glucocorticoid in inflammatory proliferative skin disease reduces arachidonic and hydroxyeicosatetraenoic acids. *Science*, 197, 994-996.

- HARADA, M., NAKACHI, S., TASAKA, K., SAKASHITA, S., MUTA, K., YANAGIDA, K., DOI, R., KIZAKI, T. & OHNO, H. 2001. Wide use of skin-lightening soap may cause mercury poisoning in Kenya. *Science of the total environment*, 269, 183-187.
- HC-SC.GC.CA. 2015. *Cosmetic Ingredient Hotlist - Consumer Product Safety* [Online]. Available: <http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/cosmet-person/hot-list-critique/hotlist-liste-eng.php> [Accessed 9 Apr. 2016].
- HC-SC.GC.CA. 2016. *Guidance on Heavy Metal Impurities in Cosmetics [Health Canada, 2012]* [Online]. Available: http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pubs/indust/heavy_metals-metaux_lourds/index-eng.php [Accessed 9 Apr. 2016].
- HECQUET, V. 2006. M'Bemba-Ndoumba, Gaston.—Ces Noirs qui se blanchissent la peau. La pratique du «maquillage» chez les Congolais. Paris, L'Harmattan, 2004, 124 p. *Cahiers d'études africaines*, 46, 676-678.
- HOLLAND, K. T. & BOJAR, R. A. 2002. Cosmetics. *American journal of clinical dermatology*, 3, 445-449.
- HOOPER, L. V., LITTMAN, D. R. & MACPHERSON, A. J. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268-73.
- IVORY COAST 2015. Decret n 2015-288 du 29 avril 2015 portant reglementation des produits cosmetiques et des produits d'hygiene corporelle.
- KONG, H. H. 2011. Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends Mol Med*, 17, 320-8.
- KOOYERS, T. J. & WESTERHOF, W. 2005. Toxicology and health risks of hydroquinone in skin lightening formulations. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 0, 060606032107074.
- KUCZYNSKI, J., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A., PARFREY, L. W., CLEMENTE, J. C., GEVERS, D. & KNIGHT, R. 2012. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet*, 13, 47-58.
- LAMBERS, H., PIESSENS, S., BLOEM, A., PRONK, H. & FINKEL, P. 2006. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *International journal of cosmetic science*, 28, 359-370.
- LEUNG, M. H., WILKINS, D. & LEE, P. K. 2015. Insights into the pan-microbiome: skin microbial communities of Chinese individuals differ from other racial groups. *Sci Rep*, 5, 11845.
- LEVITT, J. 2007. The safety of hydroquinone: a dermatologist's response to the 2006 Federal Register. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57, 854-872.

- LEWIS, K. M., GASKA, K., ROBKIN, N., MARTIN, A., ANDREWS, E. & WILLIAMS, J. 2012. The Need for Interventions to Prevent Skin Bleaching A Look at Tanzania. *Journal of Black Studies*, 43, 787-805.
- LI, W., HAN, L., YU, P., MA, C., WU, X., MOORE, J. E. & XU, J. 2014. Molecular characterization of skin microbiota between cancer cachexia patients and healthy volunteers. *Microb Ecol*, 67, 679-89.
- LOZUPONE, C. A., HAMADY, M., KELLEY, S. T. & KNIGHT, R. 2007. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1576-85.
- LOZUPONE, C. A. & KNIGHT, R. 2008. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 557-78.
- MAHÉ, A., BLANC, L., HALNA, J., KEITA, S., SANOGO, T. & BOBIN, P. Enquête épidémiologique sur l'utilisation cosmétique de produits dépigmentants par les femmes de Bamako (Mali). *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 1993. Masson, 870-873.
- MAHE, A., LY, F., AYMARD, G. & DANGOU, J. M. 2003. Skin diseases associated with the cosmetic use of bleaching products in women from Dakar, Senegal. *British journal of dermatology*, 148, 493-500.
- MAHÉ, A., LY, F. & GOUNONGBÉ, A. 2004. La dépigmentation cosmétique à Dakar (Sénégal) : facteurs socio-économiques et motivations individuelles. *Sciences sociales et santé*, 22, 5-33.
- MAHE, A., PERRET, J. L., LY, F., FALL, F., RAULT, J. P. & DUMONT, A. 2007. The cosmetic use of skin-lightening products during pregnancy in Dakar, Senegal: a common and potentially hazardous practice. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 101, 183-7.
- MANELI, M. H., WIESNER, L., TINGUELY, C., DAVIDS, L. M., SPENGANE, Z., SMITH, P., VAN WYK, J. C., JARDINE, A. & KHUMALO, N. P. 2015. Combinations of potent topical steroids, mercury and hydroquinone are common in internationally manufactured skin-lightening products: a spectroscopic study. *Clin Exp Dermatol*.
- MARCHAND, J. & N'DIAYE, B. 1975. [Injuries from the practice of cosmetic cutaneous depigmentation in African women]. *Bulletin de la Societe medicale d'Afrique noire de langue francaise*, 21, 190-199.
- MCGREGOR, D. 2007. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. *Crit Rev Toxicol*, 37, 887-914.

- MCKELVEY, W., JEFFERY, N., CLARK, N., KASS, D. & PARSONS, P. J. 2011. Population-based inorganic mercury biomonitoring and the identification of skin care products as a source of exposure in New York City. *Environ Health Perspect*, 119, 203-9.
- MEADOW, J. F., BATEMAN, A. C., HERKERT, K. M., O'CONNOR, T. K. & GREEN, J. L. 2013. Significant changes in the skin microbiome mediated by the sport of roller derby. *PeerJ*, 1, e53.
- MISTRY, N., SHAPERO, J., KUNDU, R. V. & SHAPERO, H. 2011. Toxic effects of skin-lightening products in Canadian immigrants. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 15, 254-258.
- MOKNI, M. & ABDELHAK, S. 2014. Flore cutanée, microbiote et microbiome.
- MURPHY, T., SLOTTON, D. G., IRVINE, K., SUKONTASON, K. & GOLDMAN, C. R. 2009. Mercury contamination of skin whiteners in Cambodia. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15, 1286-1303.
- NAM, Y. S., KWON, I. K. & LEE, K. B. 2011. Monitoring of clobetasol propionate and betamethasone dipropionate as undeclared steroids in cosmetic products manufactured in Korea. *Forensic Sci Int*, 210, 144-8.
- ODUMOSU, P. & EKWE, T. 2010. Identification and spectrophometric determination of hydroquinone levels in some cosmetic creams. *African Journal of pharmacy and Pharmacology*, 4, 231-234.
- OH, J., BYRD, A. L., DEMING, C., CONLAN, S., PROGRAM, N. C. S., KONG, H. H. & SEGRE, J. A. 2014. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature*, 514, 59-64.
- OLUMIDE, Y. M., AKINKUGBE, A. O., ALTRAIDE, D., MOHAMMED, T., AHAMEFULE, N., AYANLOWO, S., ONYEKONWU, C. & ESSEN, N. 2008. Complications of chronic use of skin lightening cosmetics. *International Journal of Dermatology*, 47, 344-353.
- PALMER, R. B., GODWIN, D. A. & MCKINNEY, P. E. 2000a. Transdermal kinetics of a mercurous chloride beauty cream: an in vitro human skin analysis. *Clinical Toxicology*, 38, 701-707.
- PALMER, R. B., GODWIN, D. A. & MCKINNEY, P. E. 2000b. Transdermal Kinetics of A Mercurous Chloride Beauty Cream: An In Vitro Human Skin Analysis. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 38, 701-707.
- PARVEZ, S., KANG, M., CHUNG, H. S., CHO, C., HONG, M. C., SHIN, M. K. & BAE, H. 2006. Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. *Phytother Res*, 20, 921-34.

- PEREGRINO, C. P., MORENO, M. V., MIRANDA, S. V., RUBIO, A. D. & LEAL, L. O. 2011. Mercury levels in locally manufactured Mexican skin-lightening creams. *Int J Environ Res Public Health*, 8, 2516-23.
- PETIT, A., COHEN-LUDMANN, C., CLEVENBERGH, P., BERGMANN, J. F. & DUBERTRET, L. 2006. Skin lightening and its complications among African people living in Paris. *J Am Acad Dermatol*, 55, 873-8.
- PFLUGHOEFT, K. J. & VERSALOVIC, J. 2012. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol*, 7, 99-122.
- PRETI, G. & LEYDEN, J. J. 2010. Genetic influences on human body odor: from genes to the axillae. *J Invest Dermatol*, 130, 344-6.
- ROGUEDAS-CONTIOS, A.-M. & GARCIA-LE GAL, C. 2005. Dermocorticoïdes en dermatologie: modes d'action, indications, contre-indications, modalités d'application. *Médecine thérapeutique*, 11, 130-137.
- ROMANO-BERTRAND, S., LICZNAR-FAJARDO, P., PARER, S. & JUMAS-BILAK, E. 2015. Impact de l'environnement sur les microbiotes : focus sur l'hospitalisation et les microbiotes cutanés et chirurgicaux. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2015, 75-82.
- ROTH, R. R. & JAMES, W. D. 1988. Microbial ecology of the skin. *Annual Reviews in Microbiology*, 42, 441-464.
- SANFORD, J. A. & GALLO, R. L. 2013. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol*, 25, 370-7.
- SCHARSCHMIDT, T. C. & FISCHBACH, M. A. 2013. What Lives On Our Skin: Ecology, Genomics and Therapeutic Opportunities Of the Skin Microbiome. *Drug Discov Today Dis Mech*, 10.
- SCHERRER, B. 1984. *Biostatistique*, Morin (Gaëtan).
- SCHOMMER, N. N. & GALLO, R. L. 2013. Structure and function of the human skin microbiome. *Trends in microbiology*, 21, 660-668.
- SCHREML, S., SZEIMIES, R. M., KARRER, S., HEINLIN, J., LANDTHALER, M. & BABILAS, P. 2010. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 24, 373-8.
- SENE, D., HUONG-BOUTIN, D. L., THIOU, M., BARETE, S., CACOUB, P. & PIETTE, J. C. 2008. [Symptomatic adrenal insufficiency secondary to the use of cutaneous topical steroids for skin-bleaching]. *Rev Med Interne*, 29, 1030-3.

- SIN, K. & TSANG, H. 2003. Large-scale mercury exposure due to a cream cosmetic: community-wide case series. *Hong Kong Medical Journal*, 9, 329-334.
- STAUDINGER, T., PIPAL, A. & REDL, B. 2011. Molecular analysis of the prevalent microbiota of human male and female forehead skin compared to forearm skin and the influence of make-up. *J Appl Microbiol*, 110, 1381-9.
- URAM, E., BISCHOFER, B. P. & HAGEMANN, S. 2010. Market analysis of some mercury-containing products and their mercury-free alternatives in selected regions. *Gesellschaft für Anlagen und Reaktorsicherheit, Brunswick, Germany*, 1-140.
- US FDA. 2009. *Supporting Information for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program*, 21 May 2009 [Online]. Available: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/noms/support_docs/hydroquinone_may2009.pdf [Accessed Apr, 16th 2016].
- US FDA. 2016. *Prohibited & Restricted Ingredients* [Online]. Available: <http://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/LawsRegulations/ucm127406.htm> [Accessed 9 Apr. 2016].
- VOEGBORLO, R., VOEGBORLO, S., BUABENG-ACHEAMPONG, B. & ZOGLI, E. 2008. Total mercury content of skin toning creams and the potential risk to the health of women in Ghana. *Journal of Science and Technology (Ghana)*, 28, 88-96.
- WANG, L. & ZHANG, H. 2015. Mercury content in marketed cosmetics: analytical survey in Shijiazhuang, China. *Cutan Ocul Toxicol*, 34, 322-6.
- WIEDERSBERG, S., LEOPOLD, C. S. & GUY, R. H. 2008. Bioavailability and bioequivalence of topical glucocorticoids. *Eur J Pharm Biopharm*, 68, 453-66.
- YAMAGUCHI, Y., BRENNER, M. & HEARING, V. J. 2007. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem*, 282, 27557-61.
- ZEEUWEN, P. L., BOEKHORST, J., VAN DEN BOGAARD, E. H., DE KONING, H. D., VAN DE KERKHOF, P. M., SAULNIER, D. M., VAN, S., II, VAN HIJUM, S. A., KLEEREBEZEM, M., SCHALKWIJK, J. & TIMMERMAN, H. M. 2012. Microbiome dynamics of human epidermis following skin barrier disruption. *Genome Biol*, 13, R101.
- ZEEUWEN, P. L., KLEEREBEZEM, M., TIMMERMAN, H. M. & SCHALKWIJK, J. 2013. Microbiome and skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 13, 514-20.

Annexes A. Informations supplémentaires du chapitre 2

Table A.I. Kruskal–Wallis nonparametric and Tukey's multiple comparisons tests on concentrations of active ingredients in products from West Africa and Canada.

Analysis	Kruskal Wallis test			Tukey HSD Post hoc test		
	Chi-squared	df	<i>P-value</i>	Class	Country	Mean
[Hg]soap	51.171	4	2.056e ⁻¹⁰	a	Benin	2727000 µg/Kg
				b	Ivory Coast	596300 µg/Kg
				b	Canada	22.78 µg/Kg
				b	Senegal	1.232 µg/Kg
				b	Mali	0.884 µg/Kg
[Hg]cream	69.663	4	2.674e ⁻¹⁴	a	Canada	53.22 µg/Kg
				a	Benin	10.71 µg/Kg
				a	Senegal	0.336 µg/Kg
				a	Ivory Coast	0.187 µg/Kg
				a	Mali	0.129 µg/Kg
[HQ]cream	24.243	4	7.141e ⁻⁰⁵	a	Mali	3.272 %
				ab	Benin	2.024 %
				b	Canada	0.953 %
				b	Senegal	0.560 %
				b	Ivory Coast	0.508 %
[PC]cream	11.041	4	0.026	a	Senegal	0.043 %
				ab	Ivory Coast	0.023 %
				ab	Benin	0.017%
				b	Canada	0.013 %
				b	Mali	0.003 %

Table A.II. Acceptable impurities in the case of banned substances*.

Ingredients	Acceptable impurities
Hg in soaps	0.6 µg/kg
Hg in creams	0.6 µg/kg
HQ in creams	0.5%

* These impurity limits were defined by us from our data, for legislations which completely ban these ingredients in cosmetics

Hg in cream

acceptable impurities: $\leq 0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$

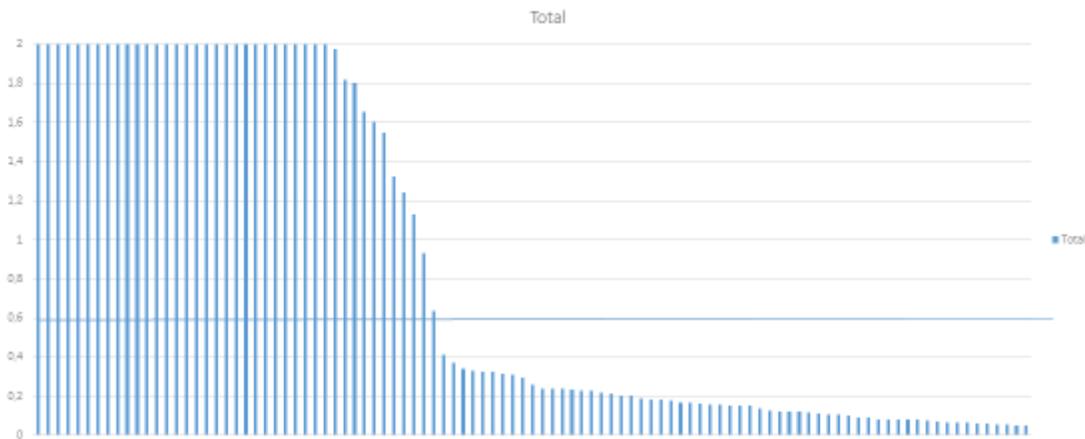


Figure A.1. Determination of acceptable impurities in cases Hg is banned in creams

Hg in soaps

acceptable impurities: $\leq 0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$

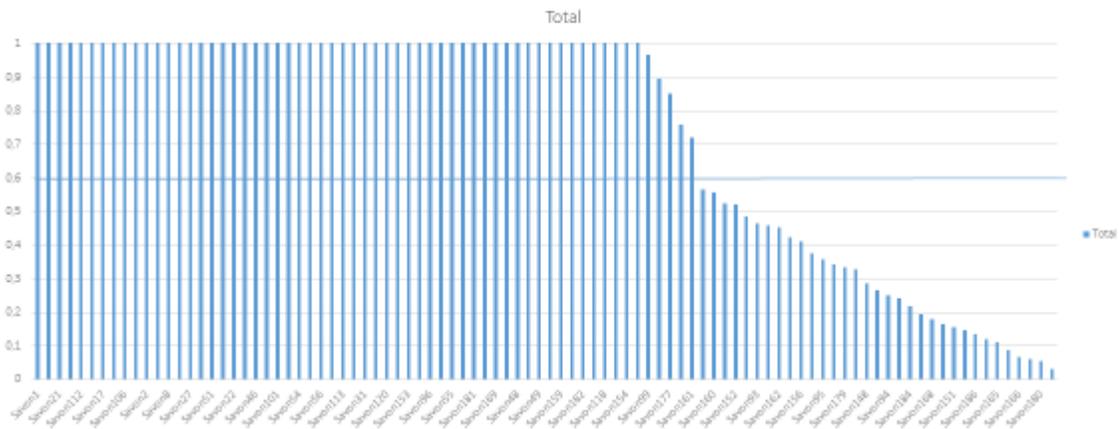


Figure A.2. Determination of acceptable impurities in cases Hg is banned in soaps

HQ in creams

acceptable impurities: $\leq 0.5\%$

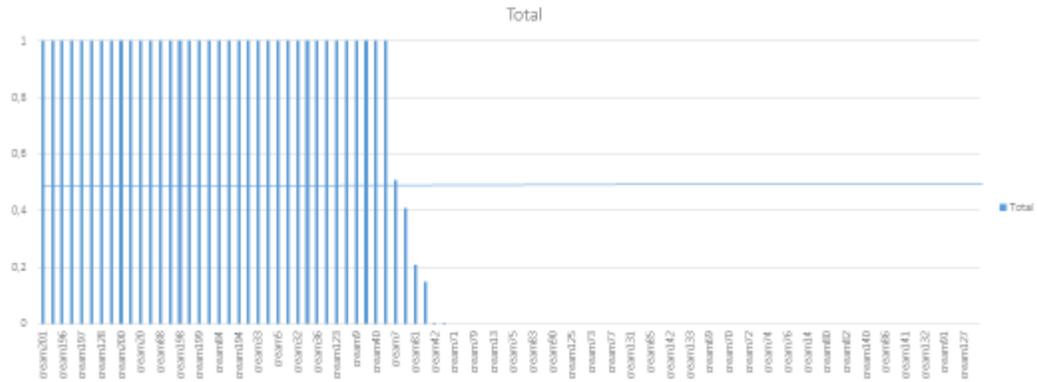


Figure A.3. Determination of acceptable impurities in cases HQ is banned in creams

Table A.III. Threshold values, for different regulations, when considering acceptable impurities.

	Categories¹	PC	HQ	Hg
US FDA limit	<i>considering bans</i>	0%	2%	1µg/g
	<i>not considering bans</i>	0.05%	2%	1µg/g
Heath Canada limit	<i>considering bans</i>	0%	0.5%	1µg/g
	<i>not considering bans</i>	0.05%	0.5%	1µg/g
EU limit	<i>considering bans</i>	0%	0.5%	0.6µg/kg
	<i>not considering bans</i>	0.05%	0.5%	0.6µg/kg
Ivory Coast limit	<i>considering bans</i>	0%	2%	0.6µg/kg
	<i>not considering bans</i>	0.05%	2%	0.6µg/g

¹ Each product (cream or soap) that exceeds standard was counted once only.

Table A.IV. Frequencies of exceedance of guidelines by more than one ingredient in a given product.

	Categories	% of all same creams excess both Hg, HQ and PC standards	% of all same creams excess both Hg and HQ standards	% of all same creams excess both Hg and PC standards	% of all same creams excess both HQ and PC standards
US FDA limit	<i>considering bans</i>	0	0	0	0
	<i>not considering bans</i>	0	0	0	0
Heath Canada limit	<i>considering bans</i>	0	0	0	3 (3/98)
	<i>not considering bans</i>	0	0	0	1 (1/98)
EU limit	<i>considering bans</i>	0	19.3 (19/98)	9.1 (9/98)	3 (3/98)
	<i>not considering bans</i>	0	19.3 (19/98)	3 (3/98)	1 (1/98)
Ivory Coast limit	<i>considering bans</i>	0	15.3 (15/98)	9.1 (9/98)	0
	<i>not considering bans</i>	0	15.3 (15/98)	3 (3/98)	0

Table A.V. Percentage of products (creams or soaps) exceeding regulatory guidelines for Hg, of HQ or of PC published in other studies.

	% in creams	% in soaps	% in (creams + soaps)	References
[Hg] > 1ppm	0 (0/146)			(Wang and Zhang, 2015)
	64.7 (22/34)			(Alqadami et al., 2013)
	8.7 (2/33)			(Al-Saleh et al., 2012)
	37.5 (6/16)			(Peregrino et al., 2011)
	47.36 (9/19)			(Murphy et al., 2009)
	100 (21/21)			(Sin and Tsang, 2003)
	41.4 (12/29)			(Maneli et al., 2015)
	45 (17/38)			(al-Saleh and al-Doush, 1997)
	0 (0/98)	7.52 (7/93)	3.6 (7/191)	Our study
	47(8/17)	100 (2/2)	52.6 (10/19)	(McKelvey et al., 2011)
	57.14 (8/14)		(Harada et al., 2001)	
	100 (3/3)		(Glahder et al., 1999)	
[Hg] > 10,000ppm	45% (247/549)			(Hamann et al., 2014)
[HQ] > 2%	29.5 (29/98)			Our study
[HQ] > 0,5%	37.7 (37/98)			Our study
[HQ] > 0,5%	12 (19/163)			(Desmedt et al., 2014)
[HQ] > 1%	18.5 (6/33)			(Al-Saleh et al., 2012)
[HQ] > 0,5%	100 (10/10)			(Odumosu and Ekwe, 2010)
[HQ] > 0,5%	37.9 (11/29)			(Maneli et al., 2015)
[PC] > 0,05%	20.4 (20/98)			Our study
[PC] > 0%	39.7 (39/98)			Our study
[PC] > 0%	40 (65/163)			(Desmedt et al., 2014)
[PC] > 0%	92.2 (83/90)			(Ake et al., 2007)
[PC] > 0,05%	74.3 (62/83)			(Ake et al., 2007)
[PC] > 0%	31 (9/29)			(Maneli et al., 2015)
	% of all products considered as illegal			References
	59			(Desmedt et al., 2014)
	75.9			(Maneli et al., 2015)