



# Avant-propos

Développer des produits cosmétiques performants et permettant de garantir le bien-être et la sécurité des consommateurs impose la réalisation de nombreux tests d'évaluation. Si l'Union Européenne a interdit depuis mars 2013 la commercialisation et l'importation dans ses états membres de tout cosmétique ayant été testé sur l'animal, qu'il s'agisse du produit fini ou de ses différents ingrédients, l'industrie cosmétique avait depuis de nombreuses années intégré les techniques alternatives à l'animal. Les efforts ont porté au départ dans le domaine de la toxicité, avec pour objectif de valider par des tests prédictifs l'innocuité des produits. Les travaux se sont élargis à la mise en place de méthodes et modèles permettant de mesurer l'impact des actifs sur la peau voire d'en comprendre les mécanismes au niveau cellulaire et moléculaire. Le développement des connaissances et des technologies dans le domaine de la biologie et de la bioinformatique ont conduit à une forte évolution des approches permettant de mesurer les interactions entre la peau et le produit. C'est la raison pour laquelle nous avons souhaité qu'un ouvrage original soit consacré à cette thématique. Catherine Grillon et Marek Haftek ont répondu à cette attente en coordonnant « *Modèles pour l'évaluation des produits cosmétiques : de la molécule à l'humain* ». Ils ont eu à cœur de faire un ouvrage clair et didactique à destination des professionnels du domaine cosmétique.

**Anne-Marie Pensé-Lhéritier et Christophe Masson**





# Table des matières

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## **Partie 1** **Modèles** **moléculaires**



### **Prédiction par des méthodes *in silico*** *Julie-Anne Chemelle*

<b>1. Introduction.....</b>	<b>5</b>
<b>2. La prédiction qualitative : Structural Alert.....</b>	<b>6</b>
<b>3. La prédiction quantitative .....</b>	<b>6</b>
3.1. Les systèmes QSAR .....	7
3.2. Les systèmes à règles .....	8
3.3. L'Intelligence Artificielle .....	8
<b>4. Les applications .....</b>	<b>9</b>
<b>5. Les limites .....</b>	<b>10</b>
<b>6. Conclusion.....</b>	<b>11</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>11</b>



### **Criblage et caractérisation de ligands de protéines** *Sandrine Vadon-Le Goff et Catherine Moali*

<b>1. Introduction : enjeux et principes pouvant guider le choix</b> <b>d'une technique .....</b>	<b>13</b>
1.1. Domaine d'applicabilité des techniques présentées.....	14
1.2. Informations pouvant être obtenues .....	14
1.3. Principes généraux pouvant guider le choix d'une technique.....	16
1.4. Nature de la cible et des ligands.....	17
1.5. Contraintes liées au type d'informations souhaitées.....	17

<b>2. Principales techniques de criblage et de caractérisation de ligands de protéines.....</b>	<b>19</b>
2.1. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	19
2.2. Méthodes basées sur la détection de fluorescence.....	21
2.3. Biosenseurs optiques.....	24
<b>3. Techniques pouvant apporter des informations complémentaires</b>	<b>28</b>
3.1. Tests cellulaires.....	28
3.2. Informations thermodynamiques et structurales .....	29
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>30</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>31</b>

## Partie 2

# Modèles cellulaires



3

## Les modèles cellulaires simples

*Catherine Grillon*

<b>1. Introduction.....</b>	<b>35</b>
<b>2. La peau, ses cellules et son microenvironnement .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Les cultures primaires.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Les lignées cellulaires.....</b>	<b>40</b>
<b>5. Les co-cultures .....</b>	<b>42</b>
<b>6. La reconstitution <i>in vitro</i> du microenvironnement cutané.....</b>	<b>43</b>
<b>7. Que peut-on étudier avec ces modèles ? .....</b>	<b>44</b>
7.1. La dynamique cellulaire.....	45
7.2. Diverses activités cellulaires .....	46
7.3. Techniques omiques.....	46
7.4. Dosages d'activité enzymatiques .....	46
7.5. Dosages de molécules .....	47
<b>8. Avantages et inconvénients des modèles cellulaires simples .....</b>	<b>47</b>
<b>9. Conclusion.....</b>	<b>48</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>48</b>



4

## Les épidermes reconstruits et leurs applications

*Marie Reynier, Corinne Leprince, Michel Simon*

<b>1. Les kératinocytes : de la culture 2D à la culture 3D .....</b>	<b>52</b>
1.1. Les premiers modèles de culture de kératinocytes en monocouche.....	52
1.2. Les différents modèles de culture de kératinocytes en 3D .....	53
1.3. Sources des kératinocytes utilisés .....	54

<b>2. Modulations des conditions de culture des épidermes reconstruits humains.....</b>	<b>56</b>
2.1. Humidité relative .....	56
2.2. Addition topique de microorganismes.....	57
2.3. Addition de cytokines dans le milieu de culture.....	58
2.4. Utilisation d'un milieu de culture totalement défini.....	58
<b>3. Modèles <i>ex vivo</i> à partir de kératinocytes de patients.....</b>	<b>59</b>
3.1. Les modèles <i>ex vivo</i> d'épidermes reconstruits.....	59
3.2. Les modèles <i>ex vivo</i> de peaux reconstruites.....	59
<b>4. Modulation de l'expression génique .....</b>	<b>60</b>
4.1. Modulation par expression d'ADNc dans un vecteur rétroviral ...	60
4.2. Modulation par interférence ARN.....	61
4.3. Modulation par édition du génome.....	63
<b>5. L'intérêt des épidermes reconstruits 3D et conclusions.....</b>	<b>64</b>
5.1. Un modèle basique et fondamental d'épiderme.....	64
5.2. Un modèle pouvant être soumis à des variations environnementales.....	65
5.3. Un modèle <i>ex vivo</i> pour la physiopathologie .....	65
5.4. Un modèle modulable génétiquement .....	66
5.5. Un modèle alternatif aux modèles animaux.....	66
5.6. Vers d'autres modèles encore .....	66
<b>Bibliographie .....</b>	<b>67</b>



## Les modèles d'épidermes humains reconstruits (RhE) pour l'évaluation de l'innocuité des ingrédients en cosmétique.

*Christian Pellevoisin, Nathalie Alépée,  
Estelle Tinois-Tessonneaud, Nathalie Seyler*

<b>1. Les modèles d'épidermes humains reconstruits (RhE).....</b>	<b>70</b>
<b>2. Changement de paradigme en toxicologie .....</b>	<b>72</b>
<b>3. Méthodes valides et méthodes validées en toxicologie.....</b>	<b>74</b>
<b>4. Irritation et corrosion cutanée .....</b>	<b>74</b>
<b>5. Irritation oculaire .....</b>	<b>78</b>
<b>6. Pénétration cutanée et métabolisme des xénobiotiques.....</b>	<b>79</b>
<b>7. Phototoxicité .....</b>	<b>82</b>
<b>8. Génotoxicité .....</b>	<b>84</b>
<b>9. Sensibilisation .....</b>	<b>85</b>
<b>10. Conclusions.....</b>	<b>88</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>89</b>



## Les peaux reconstruites en dermo-cosmétique : les modèles

*Valérie André, Sébastien Cadau, Odile Damour*

<b>1. Introduction</b> .....	92
<b>2. La combinaison minimale derme-épiderme</b> .....	92
2.1. Modèle avec substrat.....	93
2.2. Modèle sans substrat.....	104
<b>3. Conclusion</b> .....	104
<b>Bibliographie</b> .....	105



## Les peaux reconstruites en dermo-cosmétique : les applications

*Valérie André, Karsten Mewes, Odile Damour*

<b>1. Introduction</b> .....	107
<b>2. Stress oxydatif</b> .....	107
2.1. L'irradiation aux UVA.....	108
2.2. L'irradiation aux UVB .....	111
2.3. Les effets génotoxiques.....	112
2.4. Le stress oxydatif chimiquement induit.....	113
<b>3. Régénération cutanée et cicatrisation</b> .....	113
3.1. Évaluation des propriétés biologiques.....	115
3.2. Évaluation des propriétés mécaniques.....	117
3.3. Évaluation de la fonction barrière .....	122
<b>4. Conclusion</b> .....	123
<b>Bibliographie</b> .....	124



## Les peaux reconstruites complexes et leurs applications respectives

*Sébastien Cadau, Valérie André, Odile Damour*

<b>1. Introduction</b> .....	126
<b>2. Modèles pigmentés</b> .....	126
<b>3. Modèles endothélialisés</b> .....	129
<b>4. Modèles immunitaires</b> .....	131
<b>5. Modèles nerveux</b> .....	133
<b>6. Modèles adipeux</b> .....	134
<b>7. Modèles microbiotiques</b> .....	136

<b>8. Conclusion</b> .....	139
<b>Bibliographie</b> .....	140



## Utilisation de la bio-impression 3D pour la conception de modèles de peau reconstruite *in vitro*

*Morgan Dos Santos, Céline Auxenfans,  
Amélie Thepot, Christophe Marquette*

<b>1. Introduction</b> .....	142
<b>2. De l'impression 3D... à la bio-impression 3D</b> .....	142
2.1. Qu'est-ce que la Bio-impression 3D ?.....	142
2.2. La bio-impression 3D : une histoire ancienne .....	143
<b>3. Principes de la Bio-impression 3D tridimensionnelle</b> .....	146
3.1. Étapes clés de la bio-impression 3D ?.....	146
3.2. Technologies de bio-impression 3D .....	147
3.3. Biomatériaux pour la bio-impression 3D.....	149
<b>4. Bio-impression 3D de la peau et ses applications</b> .....	150
4.1. L'ingénierie tissulaire de la peau : stratégies et concepts.....	150
4.2. La peau reconstruite par bio-impression 3D .....	151
4.3. Applications.....	154
<b>5. Conclusion</b> .....	155
<b>Bibliographie</b> .....	155

### Partie 3

## Modèles utilisant la peau native et ses dérivés



### Modèle d'explants de peau humaine

*Laurent Peno-Mazarino, Giuseppe Percoco, Stéphanie Scalvino,  
Philippe Gasser et Elian Lati*

<b>1. Le modèle de peau <i>ex vivo</i></b> .....	159
1.1. Le développement du modèle .....	160
1.2. Les différents types d'explants de peau humaine.....	160
1.3. Préparation et mise en culture.....	162
<b>2. Ce que l'on peut tester</b> .....	163
2.1. Actifs cosmétiques.....	163
2.2. Formulations .....	164
2.3. Dispositifs médicaux .....	164

<b>3. Ce que l'on peut évaluer et par quel moyen .....</b>	<b>165</b>
3.1. Dosages.....	165
3.2. Histologie.....	166
3.3. Génomique.....	167
3.4. Mesures physiques.....	167
<b>4. Ce que l'on peut reproduire.....</b>	<b>170</b>
4.1. Environnement .....	170
4.2. Agressions extérieures .....	177
4.3. Plaies et blessures.....	179
4.4. Anti-âge .....	180
4.5. Activité lipolytique/lipogenèse .....	182
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>184</b>
<b>6. Remerciements.....</b>	<b>184</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>184</b>

#### Partie 4

## Modèles pour les mesures de la pénétration des actifs



### Les cellules de diffusion : Dispositifs d'étude *in vitro* de la perméabilité cutanée

*Damien Salmon, Fabrice Pirot*

<b>1. Contexte des essais de perméabilité cutanée <i>in vitro</i> .....</b>	<b>189</b>
1.1. Intérêt des essais de perméabilité <i>in vitro</i> .....	189
1.2. Unicité et diversité des cellules de diffusion.....	190
1.3. Innovation et adaptation des cellules de diffusion .....	192
1.4. Utilisation des cellules de diffusion .....	194
<b>2. Méthodologie des essais de perméabilité <i>in vitro</i> .....</b>	<b>198</b>
2.1. Cadre méthodologique.....	198
2.2. Approvisionnement.....	199
2.3. Phase pré-expérimentale .....	199
2.4. Phase expérimentale .....	200
2.5. Phase post-expérimentale .....	200
2.6. Phase analytique .....	201
2.7. Modèles mathématiques.....	202
<b>3. Conclusion.....</b>	<b>202</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>202</b>



## La microdialyse sur explant de peau et *in vivo*

*Sophie Robin*

1. Historique .....	205
2. Principe.....	206
3. Calibration .....	207
3.1. Calcul du « Relative recovery (RR) » .....	207
3.2. Détermination du « No net flux » .....	208
3.3. Rétrodialyse.....	209
4. Matériel .....	209
4.1. Micro-pompe.....	209
4.2. Liquide de perfusion.....	209
4.3. Sondes.....	209
4.4. Microcollecteur .....	210
5. Application en biologie cutanée.....	210
5.1. Microdialyse <i>in vivo</i> .....	210
5.2. Microdialyse <i>ex vivo</i> .....	211
6. Limites .....	213
6.1. Faibles volumes .....	213
6.2. Le relative recovery.....	213
6.3. Composés lipophiles.....	213
7. Conclusion.....	214
Bibliographie .....	214



## Apport de la microspectroscopie Raman pour l'étude de la distribution d'actifs dans la peau

*Mohammed Essendoubi, Cyril Gobinet,  
Michel Manfait, Olivier Piot*

1. Introduction.....	216
2. Historique et développements instrumentaux de l'analyse Raman.....	218
3. Principe de la spectroscopie Raman .....	220
4. Avantages et limites de la microspectroscopie Raman pour des applications au niveau de la peau.....	222
4.1. Points positifs.....	222
4.2. Limitations .....	222
5. Traitement des données de spectroscopie vibrationnelle Raman par analyse statistique multivariée.....	224
6. La microspectroscopie Raman dans la recherche en dermo-cosmétique .....	226
7. Approches expérimentales <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> .....	227

<b>8. Application de la spectroscopie Raman pour étudier la distribution d'actifs dans la peau</b> .....	230
<b>8.1. Suivi de la diffusion transcutanée d'actifs</b> par microspectroscopie confocale Raman.....	231
<b>8.2. Distribution d'actifs dans la peau par imagerie Raman 2D</b> .....	233
<b>9. Conclusions et perspectives</b> .....	234
<b>Bibliographie</b> .....	235



# Introduction

---

Le développement d'un produit cosmétique repose en premier lieu sur la sélection d'actifs pour lesquels il est possible de démontrer un effet bénéfique pour la peau ainsi qu'une absence de cytotoxicité. Ceci nécessite souvent de tester de nombreuses molécules et de disposer pour cela de modèles, c'est-à-dire de systèmes simplifiés représentatifs de la peau ou de la cible moléculaire choisie. En effet, il n'est pas réaliste ni concevable de travailler directement sur l'Homme pour ce type d'étude, à la fois pour des raisons éthiques et pour des raisons pratiques. D'autre part, depuis 2013, la réglementation européenne a interdit l'utilisation des animaux pour les applications cosmétiques. En conséquence, le besoin de modèles adaptés pour évaluer l'activité de composés à visée cosmétique est grandissant.

Ces dernières années, la recherche en biologie cutanée a considérablement évolué et apporte une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la peau et dans le maintien de son homéostasie. Ces découvertes ont permis d'affiner les modèles de culture cellulaire, par exemple en prenant en compte les interactions entre les différents types de cellules ou encore en reproduisant au mieux le microenvironnement cutané. On est ainsi passé de cultures cellulaires simples en 2 dimensions à des cultures tridimensionnelles complexes, beaucoup plus proches de la peau *in situ*. De même, les progrès dans le domaine informatique, tels que modélisation, logiciels, banques et analyses de données, ainsi que dans les domaines de la biologie moléculaire et des interactions moléculaires sont en plein essor et apportent de nouveaux moyens pour prédire et étudier l'effet de composés.

Depuis quelques années, de nombreuses méthodes alternatives se sont donc développées et améliorées, allant des méthodes *in silico* aux méthodes *in vivo*, en passant par l'*in vitro* et l'*ex-vivo*. En plus de montrer une activité des molécules évaluées, ces modèles se prêtent aussi à l'étude de leurs mécanismes d'action, à l'étude de leur pénétration dans la peau, etc.

Ce livre décrit l'ensemble des techniques développées et utilisées à l'heure actuelle pour évaluer l'activité de composés. Il est divisé en 4 grandes parties. Les 3 premières présentent des moyens pour tester l'activité de molécules, en commençant par les modèles moléculaires, les modèles cellulaires puis les modèles utilisant la peau native. Dans la dernière partie, c'est la pénétration des actifs dans la peau qui est étudiée. Pour chacun des modèles, les auteurs ont présentés les avantages et les inconvénients afin de permettre au non spécialiste de se rendre compte des limites de la méthode et de pouvoir les comparer.

Cet ouvrage est aussi destiné à apporter une aide pour choisir le/les modèles pertinents et adaptés pour répondre à la question posée. En effet, le criblage à haut débit d'une banque de molécules n'est pas compatible avec tous les modèles, notam-

ment ceux qui sont les plus complexes. Inversement, l'étude d'un nombre limité de composés sur un modèle très proche de la peau permettra d'évaluer son activité, ses cibles cellulaires et éventuellement son mode d'action. De même, la recherche d'un actif sur la pigmentation de la peau nécessitera un modèle adapté, différent de celui permettant d'évaluer un effet hydratant par exemple. C'est la complémentarité de ces modèles qui va permettre de suivre le développement d'un produit cosmétique, de la sélection de l'actif, en général avec un modèle simple, à l'évaluation de l'activité du produit formulé, avec un modèle plus proche de la peau, en passant par sa capacité à pénétrer dans la peau.

Ce recueil de modèles très variés, allant de la molécule à l'homme, est un outil de base pour les biologistes afin de démontrer l'activité biologique de composés pour le développement de produits cosmétiques innovants.

Catherine Grillon et Marek Haftek