

L'aventure des produits inoffensifs : une approche pionnière de la sécurité en cosmétique

Jacques Leclaire est le directeur scientifique international du groupe L'Oréal¹. Il est un expert de toxicologie moléculaire pour prédire les effets secondaires potentiels et les interactions inter-médicamenteuses. Il est aussi membre de l'Académie des Technologies et membre du jury international du prix L'Oréal UNESCO pour les femmes et la science.

1 La cosmétique n'est pas une discipline futile

1.1. L'enjeu des produits inoffensifs

L'enjeu des produits inoffensifs représente quarante ans de détermination de l'industrie cosmétique, qui est la seule à essayer de supprimer l'expérimentation animale dans un certain nombre de domaines, notamment dans certains champs toxicologiques. Au départ, cela pouvait paraître comme une utopie, mais c'est quasiment la seule industrie qui, avec

des partenaires académiques dans le monde, et au prix de beaucoup d'énergie et d'investissements, a réalisé, comme nous allons le voir, un parcours immense qu'il reste encore à achever. Nous allons voir en quoi ces efforts et ces contraintes ont contribué très fortement, et c'est le plus important, à l'innovation. L'aventure des produits inoffensifs, c'est aussi l'histoire du Groupe L'Oréal avec son fondateur Eugène Schueller qui, dès 1909, inventa la *teinture inoffensive* pour cheveux (*Figure 1*). Et cette obsession de la sécurité restera ancrée dans les gènes de l'entreprise qui prendra très tôt la décision de se lancer dans la recherche et le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale pour aborder plus finement et plus précocement les aspects de sécurité dans le processus de recherche (*Figure 2*). Ce combat pour essayer de trouver des solutions alternatives à l'expérimentation animale a été initié dès les années 1970 en se lançant dans le très grand défi

Figure 1

Eugène Schueller fonde L'Oréal en créant la première teinture inoffensive.

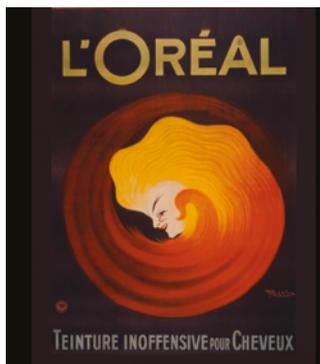


Figure 2

L'Oréal s'est lancé, dès les années 1970, le défi des peaux reconstruites afin de développer une méthode alternative à l'expérimentation animale.

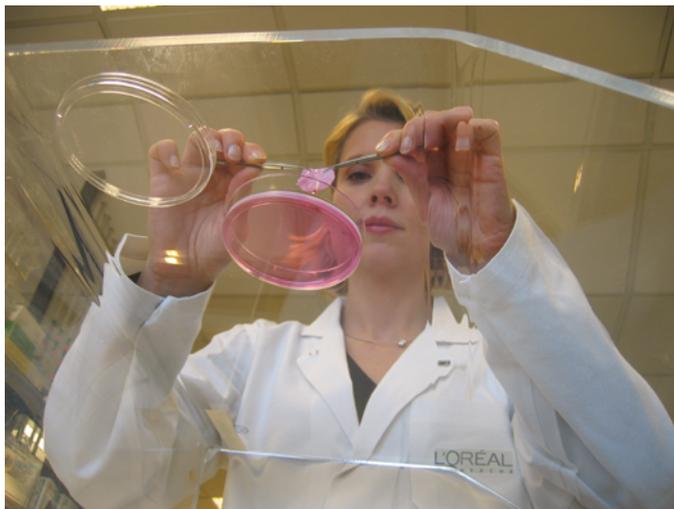




Figure 3

Le maquillage et les soins dans la préhistoire et l'Égypte ancienne.

de la reconstruction de la peau humaine.

Des produits inoffensifs, c'est ce que la réalité des faits nous amène à constater d'une façon générale pour l'industrie de la beauté et dans le cas particulier de L'Oréal qui, depuis 107 ans, n'a jamais connu un seul retrait du marché pour effets secondaires graves d'un produit, alors que le groupe met aujourd'hui annuellement environ 5 000 formules nouvelles sur le marché et vend 7 milliards de produits dans le monde.

1.2. La cosmétique est une science de longue date

Depuis la nuit des temps, les produits cosmétiques ont montré qu'ils n'étaient pas futiles. Ils ont toujours contribué à l'estime de soi, au lien social et à l'hygiène de chacun. Les gestes d'hygiène étant les premiers gestes de beauté (Figure 3). La préparation des fards pour les yeux en Égypte ancienne (voir le *Chapitre de P. Walter* dans cet ouvrage *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*, EDP Sciences, 2017) s'appuie déjà sur la science et la technologie. Dans le cadre d'une collaboration avec le Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF), en analysant

quarante flacons de fards à yeux antiques, nous avons montré que les Égyptiens mettaient quarante jours à obtenir certains composés chimiques indispensables à leur confection.

Le procédé chimique donnait naissance à deux composés, la *laurionite* et la *phosgénite*, connus pour leurs vertus bactéricides qui protégeaient les yeux des infections qui accompagnaient les crues du Nil et qui touchaient toutes les populations. Les Égyptiens maîtrisaient la chimie des solutions en élaborant des produits à base de galène, un sel de plomb interdit aujourd'hui en cosmétique. La Figure 4 montre

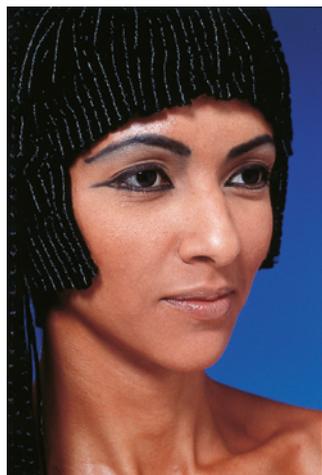


Figure 4

Reproduction d'un maquillage des yeux de l'Égypte ancienne.

un exemple de maquillage des yeux selon le modèle de l'Égypte ancienne.

1.3. La place des cosmétiques dans la société contemporaine

Quelques exemples contemporains illustrent l'importance des produits cosmétiques dans la vie de tous les jours. Par exemple, bien que tous les produits cosmétiques aient été rationnés pendant la Seconde Guerre mondiale, Winston Churchill décida de maintenir la production de rouges à lèvres car il estimait que c'était important pour le moral !



Figure 5

Angela Davis :
« black is beautiful ».

Source : Wikipédia, CC-BY-SA-3.0, Yuriy Ivanov.

Angela Davis fit de sa chevelure un instrument de revendication politique et sociale pour promouvoir la beauté noire et dépit du racisme ambiant des années 1960. Son credo fut toujours : « *Be accepted as I am* » (Figure 5).

Apprendre à accepter le regard des autres et à s'accepter soi-même au détour d'une maladie, c'est aussi un rôle essentiel que jouent les produits de soin comme dans le cas particulier des patients atteints de cancers ou de maladies chroniques.

Mais les cosmétiques aujourd'hui, c'est satisfaire tout simplement la très grande diversité des besoins de beauté des consommateurs du monde entier (Figure 6), en particulier dans les pays émergents quand les gestes d'hygiène sont les premiers gestes de beauté.

2 Le combat pour la suppression de l'expérimentation animale

2.1. Science et éthique : la fin de l'expérimentation animale

L'engagement du groupe L'Oréal dans l'aventure de la suppression de l'expérimentation animale a été



Figure 6

La diversité de la beauté à travers le monde.

historiquement motivé dès le milieu des années 1970 par deux convictions fortes :

- une conviction éthique, basée sur le fait qu'il fallait anticiper les aspirations sociétales vis-à-vis de la suppression de l'expérimentation animale ;
- une conviction scientifique, basée sur le fait qu'il était impératif de modéliser la peau humaine pour mieux la comprendre et mieux aborder la diversité des peaux. Ce n'étaient pas les peaux d'origine animale qui apporteraient la solution.

Forts de ces convictions, nous avons relevé le défi dès le milieu des années 1970 où nous avons initié les premières recherches de reconstruction de la peau humaine (Figure 7).

Quand on se lance le défi de supprimer l'expérimentation animale dans le champ de la sécurité des produits, on commence par les priorités et, en cosmétique, la priorité c'est l'application topique. Et c'est la raison pour laquelle dès le début, les efforts méthodologiques et de recherche ont démarré sur deux domaines : le premier était l'absorption percutanée (voir le **Chapitre de P. Humbert** dans *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*), le second domaine était celui de la tolérance locale, qui couvre plusieurs domaines (irritation cutanée et oculaire, corrosion, inconfort et picotements, allergie, phototoxicité, etc.).

Il y a quarante ans, nous nous sommes donc lancés dans la recherche et le développement de méthodes alternatives dans deux domaines

stratégiques : l'absorption cutanée et les réactions d'intolérances locales.

2.2. Modèle de peau et technologies d'étude de l'absorption cutanée

En toxicologie, pour évaluer le risque et pour avoir une idée de l'exposition, il était essentiel de pouvoir prédire le plus tôt possible le passage transcutané chez l'homme de nouveaux ingrédients (formulés ou non), après application topique sur la peau.

Les premiers travaux dans ce domaine se sont concentrés sur la recherche du meilleur modèle pour réaliser cette évaluation. Des peaux de différentes origines animales ont été testées et évaluées. Mais la peau humaine excisée provenant de résidus opératoires de chirurgie esthétique s'est avérée être le modèle le plus intéressant. Cette peau, montée sur une cellule dynamique de Franz (voir le **Chapitre de P. Humbert** dans *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*), permet d'étudier le devenir des ingrédients.

Près de quinze ans de recherche ont été nécessaires, ne serait-ce que pour mettre au point un modèle pertinent pour l'évaluation *in vivo* chez l'homme de l'étude de l'absorption percutanée en



Figure 7

Les peaux reconstruites participent à la suppression de l'expérimentation animale.

routine. Il aura pourtant fallu presque dix ans après cette découverte pour qu'en 1998 l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économiques) reconnaisse officiellement cette méthode.

Ces études sont complexes, et en 2017, il reste encore d'énormes défis méthodologiques à résoudre dans ce domaine. Aujourd'hui, des membranes synthétiques utilisant la microfluidique² permettent d'aller plus vite, mais sur le plan stratégique, il faut encore pouvoir prendre en compte la pharmacocinétique³ et la localisation précise dans les différentes couches de la peau : le passage par la voie transfolliculaire⁴ par exemple n'est pas encore complètement compris.

C'est pourquoi aujourd'hui, une grande partie des efforts méthodologiques sont dédiés à l'utilisation des techniques de spectroscopie, principalement le Raman⁵ et ses dérivés, de

microscopies confocales, de microscopie multiphotonique⁶, pour pouvoir localiser les ingrédients dans la peau (*Figure 8*).

2.3. La tolérance aux produits et ingrédients

Un autre sujet a mobilisé et mobilise encore les efforts de l'industrie cosmétique bien qu'on y travaille depuis quarante ans : c'est celui de la tolérance aux produits et aux

externe d'un matériau en exploitant le phénomène physique selon lequel un milieu modifie légèrement la fréquence de la lumière qui y circule. Ce décalage en fréquence (effet Raman) correspond à un échange d'énergie entre le rayon lumineux et le milieu, et donne des informations sur le substrat. La spectroscopie Raman consiste à envoyer une lumière monochromatique sur l'échantillon et à analyser la lumière diffusée.

6. Microscope multiphotonique : outil de recherche puissant qui combine les techniques avancées d'optiques du microscope confocal (obtention d'une image tridimensionnelle grâce à un positionnement du plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon) avec une excitation multiphotonique (absorption quasi-simultanée de plusieurs photons d'excitation d'une longueur d'onde proche d'un multiple de l'excitation optimale à un photon), avec de grandes longueurs d'onde pour imager des échantillons en haute résolution en trois dimensions.

2. Microfluidique : science de la manipulation des fluides à l'échelle micrométrique.

3. Pharmacocinétique : étude du devenir d'une substance après son administration.

4. Voie transfolliculaire : qui s'incorpore au sébum.

5. Spectroscopie Raman : méthode non destructive d'observation et de caractérisation de la composition moléculaire et de la structure

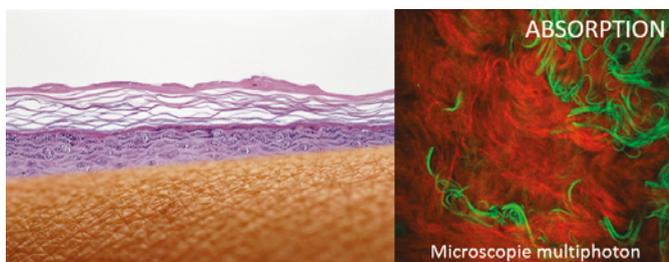


Figure 8

Observation par microscopie biphoton.

ingrédients. Par tolérance on entend les phénomènes d'irritation et d'inconfort.

L'inconfort est une notion essentielle en cosmétique. Il s'agit de toutes ces sensations et ces petits signes de tiraillement, picotements, échauffements, etc. Ce sont des manifestations sensorielles sans signes cliniques visibles mais qui peuvent être réhivitoires pour l'acceptabilité d'un produit cosmétique. Les sensations d'inconfort impliquent le système nerveux périphérique et les médiateurs de l'inflammation. La mise au point de modèles pertinents dans ce domaine est complexe.

L'irritation cutanée et oculaire, mais aussi les phénomènes de phototoxicité et les allergies de contact, sont une réaction à la fois locale et systémique.

Bien qu'initiées il y a plusieurs dizaines d'années

avec des progrès majeurs, les recherches dans ces domaines se poursuivent pour améliorer en particulier leur pouvoir prédictif.

À titre d'exemple, un phénomène aussi simple que l'inconfort implique les *récepteurs nociceptifs* et correspond à une cascade mécanistique complexe impliquant l'activation de récepteurs et canaux ioniques comme le récepteur TRPV1, exprimé dans les kératinocytes⁷ (Figure 9).

Ce type d'études de l'activation du récepteur *via* l'influx calcique tourne maintenant en routine dans les laboratoires de L'Oréal, mais nous travaillons aussi sur la modélisation d'un certain nombre de

7. Kératinocytes : cellules qui constituent 90 % de la couche superficielle de la peau et des cheveux, ongles, etc.

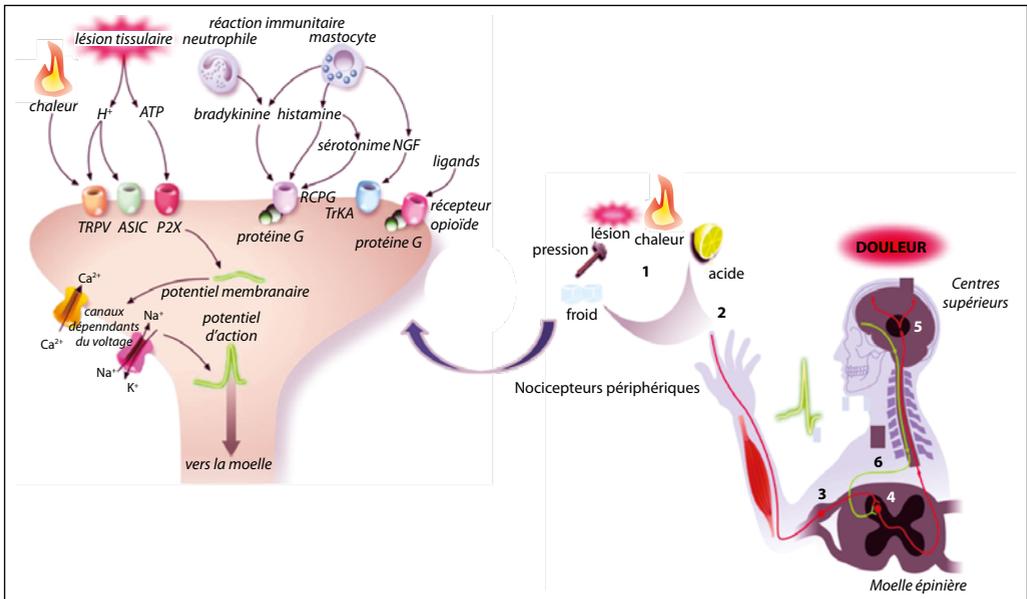


Figure 9

Mécanismes régissant l'inconfort au niveau de la peau : récepteurs et canaux ioniques impliqués.

récepteurs et de fibres nerveuses sensibles au niveau de la peau. Les méthodologies sont extrêmement délicates et lourdes à mettre en œuvre. Les progrès dans ce domaine sont importants mais pas encore à un niveau où l'on peut prédire de façon sûre et certaine l'inconfort pour toute la diversité physico-chimique des matières premières qu'utilise l'industrie cosmétique.

Deux méthodes, la corrosion chimique (qui ne concerne pas les produits cosmétiques mais qu'il était important de pouvoir prédire en particulier lorsqu'on crée de nouveaux ingrédients) et l'irritation cutanée, sont validées et reconnues par l'OCDE.

La phototoxicité est réglée, l'irritation oculaire est en cours de validation, les méthodes seront validées probablement vers 2017-2018. L'étude de l'allergie de contact est un domaine sur lequel l'industrie cosmétique travaille depuis près de dix-huit ans. La validation officielle des méthodes d'allergie de contact est attendue pour les années 2017-2018.

L'évaluation de l'absorption percutanée et de la tolérance nécessitent de la recherche de très haut niveau : beaucoup de progrès ont été réalisés depuis trente ans, mais tout n'est pas réglé. C'est important parce qu'un produit cosmétique qui est inconfortable ne se vend pas !

2.4. L'évolution de la réglementation européenne pour les cosmétiques

Pour comprendre le contexte sécuritaire dans lequel évolue

l'industrie cosmétique, il faut revenir à la réglementation. L'*Encart « Vers la suppression de l'expérimentation animale »* donne les grandes dates qui ont encadré les efforts de l'industrie cosmétique.

C'est le 11 mars 2013 qu'a été décidée l'interdiction totale de l'expérimentation animale pour tout nouvel ingrédient cosmétique, associée à l'interdiction de commercialisation de tout produit cosmétique contenant un ingrédient ayant été testé après cette date chez l'animal.

Dans le règlement européen REACH⁸ (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques) se trouvent un certain nombre de dispositions pour les produits cosmétiques. Il faut notamment constituer un « *Cosmetic Product Safety Report* », c'est-à-dire un dossier complet sur le produit fini : caractéristiques complètes de l'ingrédient chimique, propriétés physico-chimiques, propriétés d'absorption percutanée, caractéristiques de production et caractéristiques toxicologiques. Pour chaque formule, il faut constituer des dossiers très complets, ce qui, pour un groupe qui met environ 7 000 nouvelles formules par an sur le marché, représente un énorme travail. Une cosmétovigilance a été mise en place depuis une vingtaine d'années dans le groupe L'Oréal.

8. Au sujet de REACH, voir *Chimie et expertise, santé et environnement*, chapitre d'I. Rico-Lattes, coordonné par M.-T. Dinh-Audouin, D. Olivier et P. Rigny, EDP Sciences, 2016.

VERS LA SUPPRESSION DE L'EXPÉRIMENTATION ANIMALE

1959 Premier ouvrage paru sur les principes de prise en compte et de respect du bien-être de l'animal avec la première présentation de la fameuse règle des 3Rs (réduction, raffinement et remplacement) par Russell W.M.S. et Burch R.L.

1979 L'Oréal décide de supprimer toute expérimentation animale pour les produits finis.

1976 Première mise en application de la règle des 3Rs dans la législation.

2003 Entrée en vigueur du 7^e amendement qui introduit un échéancier sur la suppression de l'expérimentation animale.

2004 Décision de suppression de l'expérimentation animale pour les produits finis (L'Oréal l'a fait quinze ans plus tôt).

2009 Décision de suppression de l'expérimentation animale pour les ingrédients dans les domaines de la tolérance et la toxicité aiguë, et de commercialisation de tous produits contenant des ingrédients cosmétiques ayant été testés sur ces critères.

2013 Décision de suppression de l'expérimentation animale pour les ingrédients dans les domaines de la toxicité systémique et interdiction de commercialiser tous produits contenant des ingrédients ayant été testés sur l'animal à des fins cosmétiques.

2018 Dernière étape du programme REACH initié en 2006 pour l'enregistrement des substances chimiques entre 1 et 100 tonnes par les industriels producteurs, importateurs, utilisateurs, avec une recommandation de privilégier les méthodes alternatives disponibles (Figure 10).

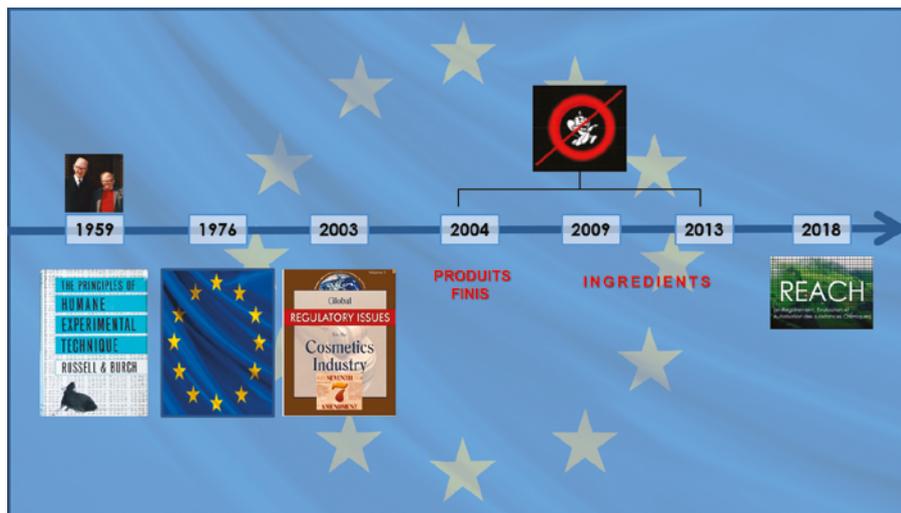


Figure 10

Évolution de la réglementation sur l'expérimentation animale.

Depuis l'interdiction de l'expérimentation animale en Europe du 11 mars 2013, d'autres pays se sont emparés de la problématique et

commencent à prendre des mesures spécifiques : interdiction des tests sur animaux et interdiction d'importation de produits/ingrédients

testés sur l'animal (*Figure 11*). Seuls les ingrédients utilisés en cosmétique sont touchés par l'interdiction. Cette disposition est en train de faire tache d'huile dans un certain nombre d'autres régions du monde :

Israël (depuis 1^{er} janvier 2014) : attestation stipulant qu'aucun test sur animaux n'a été réalisé au cours de la fabrication du produit cosmétique après le 30 décembre 2012.

Inde (depuis 12 novembre 2014) : interdiction de tester et d'importer. Négociations en cours.

Initiatives en cours : Canada, Brésil, Argentine, Russie, Nouvelle Zélande, Taiwan, Corée du Sud.

Le cas de la Chine : en Chine, les autorités exigent encore des tests sur les produits finis et les ingrédients, mais les choses sont en train d'évoluer lentement mais sûrement en particulier grâce aux échanges, discussions et partage des techniques dans le domaine des méthodes alternatives depuis quinze ans avec les autorités et la communauté scientifique.

3 Les peaux humaines reconstruites

Le domaine des peaux humaines reconstruites a joué un rôle important dans l'évolution de la cosmétologie, et L'Oréal y a pris une place de leader en démarrant cette aventure dans le milieu des années 1970 (*Encart : « Histoire de l'ingénierie tissulaire chez L'Oréal »*).

Un certain nombre de petites start-up de biotechnologie se développent un peu partout dans le monde, notamment en Asie, et l'une d'entre elles, historiquement aux États-Unis, commercialise un certain nombre de modèles. L'engagement dans cette aventure fascinante de la peau reconstruite commence par la recherche (*Figure 12*).

L'histoire de l'ingénierie tissulaire chez L'Oréal est une aventure de recherche qui se poursuit encore aujourd'hui et a permis de concevoir de nombreux modèles de peaux humaines mimant partiellement un certain nombre de fonctions physiologiques de la peau normale.

1979 : ce fut la reconstruction d'un épiderme vivant donc de



Figure 11

État des réglementations pour les cosmétiques dans le monde en 2016.

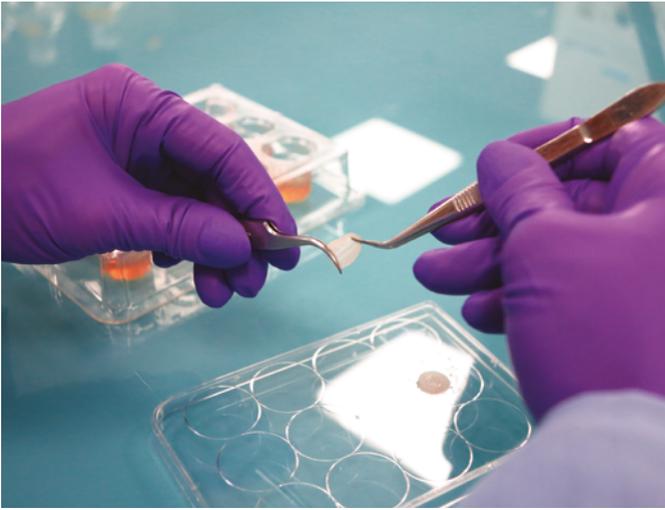


Figure 12

L'Oréal s'est engagé depuis plusieurs décennies dans la reconstruction de la peau.

HISTOIRE DE L'INGÉNIERIE TISSULAIRE CHEZ L'ORÉAL

En 2000, L'Oréal construisait dans la technopole de Gerland à Lyon une unité de production de peau reconstruite. Il s'agissait alors d'industrialiser une technologie maîtrisée des laboratoires depuis vingt ans, et qui était utilisée pour la recherche en biologie, pour le développement de méthodes alternatives et l'évaluation de la tolérance cutanée. Le bâtiment de 2 000 m² hébergeait alors quinze personnes et produisait 12 000 unités de peaux reconstruites par an aux normes de qualité ISO 9001. Dix ans plus tard, L'Oréal double la superficie, multiplie les effectifs par quatre, produit plus de 120 000 unités par an de tissu biologique reconstruit, peau et cornée, et y développe toute une activité d'évaluation de la sécurité et de l'efficacité. Le « vaisseau biotechnologique » de production industrielle de peaux humaines reconstruites a changé, c'est désormais un véritable centre d'évaluation prédictif de la sécurité et de l'efficacité. Une plateforme unique au monde dans l'industrie cosmétique qui illustre l'engagement sans relâche de L'Oréal en faveur d'un virage éthique inéluctable : le renoncement à l'animal de laboratoire pour l'activité de test.

Pourquoi une telle accélération ? Parce que les technologies progressent, les équipes ont l'ambition de relever ce défi, mais surtout parce qu'une révolution profonde de l'évaluation de la toxicité et de l'efficacité est en cours. L'évaluation pure et simple fait place à l'évaluation prédictive. Autrement dit, il s'agit de prédire un effet toxique ou bénéfique à partir de la structure moléculaire d'une substance et d'un cortège de données provenant de la modélisation mathématique des modèles *in vitro*, des plateformes génomiques et protéomiques et des études *in vivo* et cliniques antérieures.

Pour comprendre l'évolution et l'accélération de cette démarche, entrons dans ce centre d'évaluation prédictive. Au cœur du bâtiment, les salles de production des tissus reconstruits : épiderme* Episkin RHE, cornée HCE**, peau complète. On y cultive des cellules de peau et de cornée avec lesquelles on reconstruit à la demande un épiderme, une peau complète ou une cornée oculaire. Les espaces de cultures sont des salles blanches à atmosphère contrôlée pour éviter toute contamination. Ces tissus reconstruits sont de fabuleux outils, car ils permettent d'évaluer des produits dans les conditions réelles d'application à la surface de l'épiderme, qu'il s'agisse d'un gel, d'une crème, d'un liquide, d'une pâte ou d'une poudre. Tous ces modèles *in vitro* ont joué un rôle clé dans le développement de méthodes de

remplacement total des tests sur l'animal pour les substances chimiques. Trois méthodes ont déjà été validées en Europe pour la corrosion, l'irritation cutanée et la photo-toxicité sur les modèles Episkin et RHE, et une quatrième méthode est en passe de l'être pour l'irritation oculaire sur le modèle HCE. Tout autour se déploient toutes les activités et technologies qui permettent de construire les méthodes et les stratégies prédictives pour la sécurité et l'efficacité des ingrédients et des formules. Des milliers de substances et de produits y sont testés. On y trouve des équipements d'analyse chimique et biologique, des outils de simulation numérique, les modèles de tissus *in vitro*, des plateformes de criblage rapide et d'imagerie avancée. Les nouvelles données enrichissent le patrimoine constitué depuis cent ans et permettront à terme, à partir de structures chimiques et sans animal, de passer sans risque à la clinique chez l'homme.

Une révolution, symbole d'un monde qui change. L'Oréal concrétise ainsi sa vision d'anticipation, son ambition d'une beauté sans animal et son pacte de confiance vis-à-vis des consommateurs. Offrir aux femmes et aux hommes du monde entier le meilleur de la cosmétique en termes de qualité, d'efficacité et de sécurité, pour satisfaire tous les besoins et les envies dans leur infinie diversité.

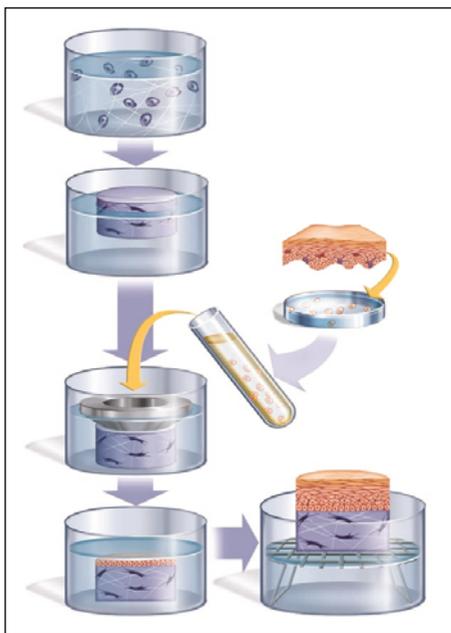


Figure 13

L'ingénierie tissulaire chez L'Oréal.

* Épiderme : couche superficielle de la peau.

** Human Corneal Epithelium.

la couche superficielle de la peau, une première possibilité pour enfin modéliser *in vitro* l'application topique.

1986 marque l'étape clé de la création des premiers modèles de peau comportant

un épiderme vivant mais aussi un derme⁹ vivant, c'est-à-dire contenant des fibroblastes.

9. Derme : une des trois couches formant la peau, comprise entre l'épiderme et l'hypoderme.

Une étape clé car c'est là que se situe le siège biologique du vieillissement cutané et qu'il était essentiel de posséder de tels modèles, ne serait-ce que pour comprendre le rôle des UVA qui pénètrent les couches profondes de la peau.

1994 Une autre étape décisive a été la reconstruction d'un épiderme capable de bronzer contenant les mélanocytes (cellules de la fonction pigmentaire).

1997 L'introduction des cellules de Langerhans (cellules de l'immunité cutanée) a permis de comprendre les phénomènes d'immunosuppression liés au rayonnement solaire.

2001 Nous avons construit un modèle de peau de patients atteints de *xeroderma pigmentosum*, le cancer des enfants de la lune. Ce travail a été initié en lien avec le CNRS et l'équipe du Professeur Alain Sarasin.

Nous avons aussi fabriqué des modèles à base de cellules souches permettant d'obtenir des épidermes avec des potentiels de régénération

variables, et des modèles de peau complète pigmentée (voir le **Chapitre P. Humbert** dans *Chimie, dermo-cosmétique et beauté*) avec un derme vivant pour comprendre comment se forme une tache brune ou une tache de vieillesse.

Depuis **2005**, nous avons un centre de recherche en Chine dont l'une des grandes priorités est le développement de la connaissance des peaux asiatiques ; en **2010**, nous avons commencé à créer des modèles d'épiderme pigmentés et non pigmentés chinois.

Il était essentiel de pouvoir produire ces différents modèles de peaux humaines en quantité et selon les critères de qualité les plus exigeants, que ce soit pour des objectifs de recherche ou d'évaluation de la sécurité et de l'efficacité des cosmétiques (**Figure 14**).

C'est la raison pour laquelle nous avons racheté à Lyon en 1994 la société Imedex, filiale à l'époque de Pasteur Mérieux, spécialisée dans la reconstruction d'épidermes humains



Figure 14

Industrialisation des peaux reconstruites.

vivants. Puis, en 2000, nous avons construit à Gerland un bâtiment dédié à la production de ces modèles. Enfin, en 2006, nous avons acquis la société SkinEthic basée à Nice pour compléter la palette de modèles de peaux produits industriellement.

Cet ensemble est aujourd'hui regroupé sous le nom *Centre d'évaluation prédictive de L'Oréal Episkin*¹⁰. De la même façon, notre investissement en Chine depuis dix ans dans le domaine de la reconstruction de peaux asiatiques nous a permis de créer en 2014 *L'Oréal Shanghai Episkin Biotechnology Center*, pour mettre à disposition des modèles d'épidermes asiatiques.

La **Figure 15** illustre l'utilisation d'un modèle de peau reconstruite dans le cas d'un test d'irritation cutané de produits cosmétiques. Les épidermes reconstruits se trouvent à l'intérieur des nacelles.

L'évaluation de l'irritation cutanée est une étape décisive dans l'évaluation de la tolérance

des produits. Le protocole est défini avec précision :

25 mg/cm² de produit à tester sont appliqués à la surface des épidermes reconstruits. Les produits solides sont appliqués délicatement à l'aide d'une spatule recourbée. Après 15 minutes de contact, les produits appliqués sont éliminés par rinçage et incubés à 37 °C pendant 42 h. La viabilité des cellules de ces tissus est évaluée par un test de réduction du MTT et un autre test de libération d'Interleukine 1 alpha. Une biopsie des épidermes est transférée dans des tubes contenant 2 ml d'isopropanol, pour solubiliser les cristaux du réactif MTT pendant 2 h. La densité optique des puits est lue à 570 nm.

L'Encart : « Historique des méthodes validées et reconnues par les instances européennes » trace l'historique des résultats obtenus grâce à ces efforts de recherches méthodologiques dans le domaine de la tolérance en termes de reconnaissance internationale et de validation. Il faut retenir que le

10. www.episkin.com

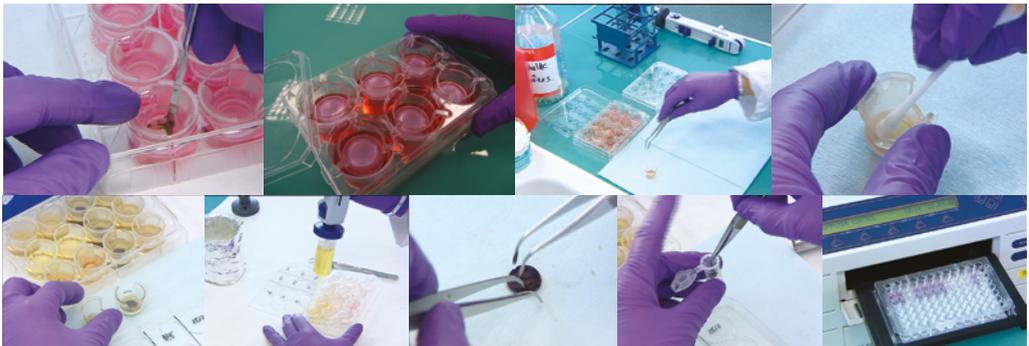


Figure 15

Les étapes de l'évaluation de l'irritation cutanée à l'aide des peaux reconstruites.

HISTORIQUE DES MÉTHODES VALIDÉES ET RECONNUES PAR LES INSTANCES EUROPÉENNES

1998 Corrosion cutanée

1999 Adsorption percutanée

2001 Corrosion chimique

2002 Photo-toxicité

2008 Irritation cutanée, irritation oculaire, sensibilisation, reprotoxicité, génotoxicité/mutagenicité, toxicocinétique, carcinogénicité, toxicité chronique, toxicité à doses répétées.

2002 OCDE : irritation/corrosion

2004 OCDE : skin corrosion

2010 OCDE : skin irritation

processus de validation d'une méthode a jusqu'à présent pris en moyenne un peu plus de dix ans pour être reconnue par les autorités européennes (l'« *European Centre for the Validation of Alternative Methods* », ECVAM), et internationales (l'OCDE). C'est un travail considérable.

4 Les méthodes prédictives d'évaluation des cosmétiques

En avançant tout au long de ces années, il est apparu nécessaire d'utiliser des méthodes prédictives intégrées plutôt que des méthodes alternatives. Il faut associer plusieurs méthodologies pour être plus prédictif, pour deux raisons :

- le concept de méthodes alternatives est basé historiquement sur la mesure avec une seule méthode d'un seul critère biologique ou chimique, comme par exemple la cytotoxicité¹¹ ou l'inflammation, ce

qui n'est pas possible pour prédire un effet clinique complexe (irritation, inconfort, allergie...). Cet effet clinique final résulte la plupart du temps de toute une cascade d'événements et de mécanismes biologiques bien spécifiques. Les approches dites « une à une » ont donné de bons résultats mais souvent dans des réponses oui/non pour l'évaluation du risque intrinsèque, et ne permettent pas (ou très rarement) de discriminer finement le potentiel des ingrédients, ce qui est essentiel pour un évaluateur du risque ;

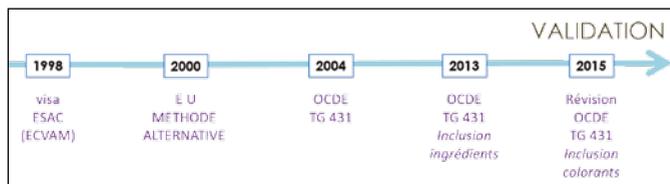
- une seule méthode, même validée, pour certains types d'ingrédients, ne suffit pas à tester la très grande diversité physico-chimique des ingrédients et produits (liquide, crème, pâte, gel, poudre, produits et ingrédients colorés, etc.).

On en trouve par exemple une illustration dans le cas des colorants capillaires (*Figure 16*). Ces ingrédients ne faisaient pas partie des ingrédients validés dans les méthodes d'irritation reconnues en 1998 et 2004, tout

11. Cytotoxicité : propriété d'un agent chimique ou biologique à être toxique pour les cellules.

Figure 16

L'évaluation des colorants capillaires.



simplement parce que ces colorants colorent et ne permettent pas l'application d'un protocole classique basé sur l'histologie. Il a donc fallu trouver une autre méthodologie pour évaluer le potentiel intrinsèque d'irritant cutané des colorants capillaires. Cela s'est fait en restant dans le cadre réglementaire de ce qui avait été accepté auparavant, mais les travaux jusqu'à la reconnaissance OCDE ont là encore nécessité une dizaine d'années...

Les efforts en cours depuis plus de vingt ans sur la prédiction de l'allergie de contact illustrent parfaitement ce passage de la notion de méthodes alternatives aux méthodes prédictives intégrées (Figure 17). Les efforts ont toujours visé à tenter d'évaluer le potentiel intrinsèque allergisant d'un ingrédient sur des tests censés mimer les différentes étapes du mécanisme d'action. C'est ce qui a amené l'ensemble des acteurs à développer des méthodologies à chacune des étapes de ce mécanisme

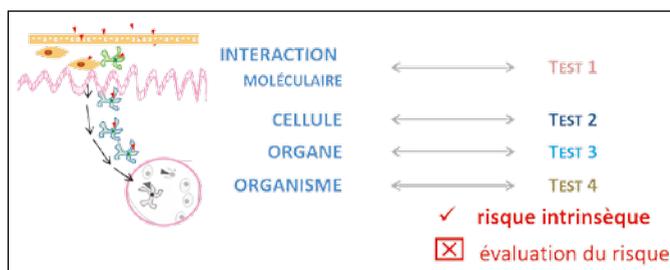
d'action comme par exemple ici l'étude de la réactivité moléculaire, l'interaction avec les premières cellules rencontrées comme les kératinocytes ou les cellules de Langerhans, ou d'étudier le comportement des molécules sur des modèles de peaux reconstruites contenant les cellules de l'immunité cutanée.

Tous ces efforts ont donné quelques résultats et beaucoup de publications mais n'ont cependant pas permis jusqu'à présent de pouvoir classifier sur les ingrédients concernés, le risque intrinsèque (OUI/NON) de façon certaine et fiable par rapport aux tests réglementaires *in vivo*.

Des espoirs sont nés lorsque nous avons commencé à développer des stratégies d'évaluation intégrées qui associent l'ensemble des méthodologies précédentes avec les outils de prédiction et de simulation, les modèles *in silico* et les bases de données (Figure 18).

Figure 17

Stratégie intégrée de l'étude de l'allergie de contact.



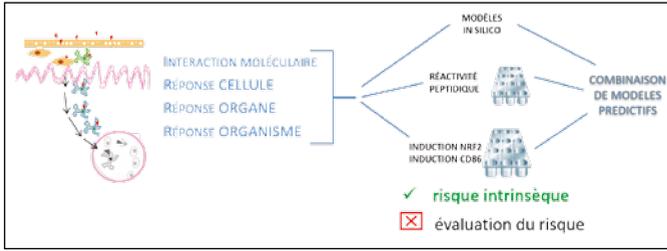


Figure 18

Les stratégies d'évaluation intégrée permettent de prévoir le risque intrinsèque.

Dans un domaine aussi complexe que l'allergie de contact, les efforts conjoints de l'industrie et du secteur académique permettent aujourd'hui de prédire, sur l'ensemble des ingrédients concernés (conservateurs, colorants, etc.), le risque intrinsèque c'est-à-dire une réponse OUI/NON. Les efforts se poursuivent pour affiner le système et pouvoir détecter plus finement le potentiel allergisant au-delà de la réponse OUI/NON en caractérisant les allergènes faibles, moyens et forts pour se rapprocher d'une évaluation du risque.

Pour des raisons évidentes d'anticipation à long terme, ce qui compte, au-delà de la prédiction chez l'animal (car on se réfère toujours à des tests réglementaires réalisés chez l'animal), c'est de viser la prédiction chez l'homme. C'est la raison pour laquelle l'ensemble de nos tests, cellulaires ou organotypiques, sont pour l'essentiel d'origine humaine. Nous savons dans un autre domaine, celui de l'efficacité, que les modèles de peaux humaines reconstruites sont capables de prédire très précisément les efficacités biologiques retrouvées chez l'homme lors des essais de recherche clinique.

4.1. L'évaluation actuelle de la sécurité des produits

Dans un contexte où l'expérimentation animale est interdite depuis le 11 mars 2013 pour tout nouvel ingrédient destiné à être utilisé en cosmétique, l'évaluation de la sécurité des produits finis et des ingrédients se fait selon des processus qui utilisent largement le patrimoine de données que nous avons accumulées depuis plus d'un siècle.

Ce patrimoine comporte des études toxicologiques chez l'animal, des études cliniques, des données de physico-chimie, de pénétration cutanée et des résultats de tests *in vitro* mais aussi, pour les produits finis, des remontées du marché et de cosmétovigilance qui nous permettent à tout moment de comparer nouvelles formules et nouveaux ingrédients aux formules ou ingrédients historiques les plus proches. Lorsque la comparaison et les informations recueillies ne suffisent pas, de nouvelles données sont obtenues par les tests *in vitro* ou *in silico*.

4.1.1. L'évaluation des ingrédients

L'évaluation toxicologique des ingrédients démarre toujours par une déclaration d'intérêt

qui garantit toutes les qualités de la matière première d'où qu'elle vienne. Pour définir le profil toxicologique, on évalue d'abord le risque intrinsèque sur la base de l'ensemble des données de sécurité disponibles sur la matière première et également en les comparant avec les données historiques lorsque la matière première est proche de structures connues. Des tests *in silico* ou *in vitro* complémentaires pourront être demandés si nécessaire, et un avis sera rendu sur les concentrations de la matière première utilisables en toute sécurité, en tenant compte de l'utilisation finale (**Figure 19**).

4.1.2. Les différentes étapes de l'évaluation des produits finis

Le processus est assez similaire à celui des ingrédients à ceci près que pour les produits finis, nous possédons un véritable système expert basé sur nos données historiques qui permet d'avoir très rapidement un avis sur la tolérance de la formule (**Figure 20**).

4.1.3. La toxicité systémique

Malgré tous ces efforts de plusieurs dizaines d'années dans le domaine de la toxicologie et de la tolérance, il reste de grands défis auxquels nous nous sommes attelés ces dix dernières années et qui ne sont pas spécifiques à l'industrie cosmétique mais sont des défis scientifiques au sens large, comme par exemple prédire la toxicité systémique après des doses répétées ou la toxicité systémique chronique.

Les travaux de recherche sur l'effet répété des faibles doses sans effet adverse à court terme mais sur le long terme, utilisent aujourd'hui des études *in vitro* et *in silico*, pour évaluer les effets biologiques néfastes au niveau cellulaire et les comparer avec l'exposition réelle chez l'homme, et calculer ainsi une marge de sécurité.

Nous avons développé ces dernières années plusieurs partenariats à l'international pour avancer sur ce sujet

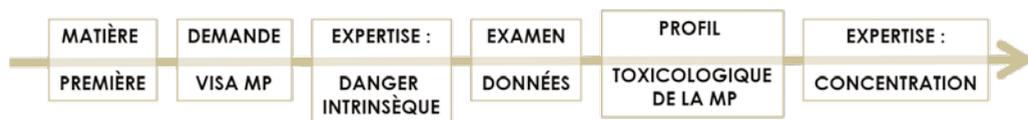


Figure 19

L'évaluation toxicologique des ingrédients.



Figure 20

L'évaluation toxicologique des produits finis.

complexe. C'est un très gros travail réalisé dans le cadre des programmes (TOXCAST) avec l'US EPA aux États-Unis et SEURAT en Europe.

Pour découvrir les méthodes les plus pertinentes d'études de la toxicité systémique et chronique, nous poursuivons des collaborations de recherche d'envergure comme par exemple avec l'Université de Floride et le Professeur Hickman pour mettre au point les outils *organ-on-a-chip* basés sur la microfluidique permettant d'évaluer la toxicité et les effets biologiques sur plusieurs types cellulaires (quatre organes différents).

4.1.4. Les effets secondaires graves

Parmi les grands défis scientifiques auxquels nous devons faire face figure la prédiction des effets secondaires graves pouvant conduire au retrait du produit du marché, ce qui est assez répandu dans le domaine du médicament si on regarde le nombre de médicaments retirés pour effets secondaires graves dans le monde ces vingt dernières années. Mais c'est exceptionnellement rare dans le domaine cosmétique. Il s'agit en général d'effets inattendus que rien ne le laissait prévoir par les processus classiques d'évaluation de la sécurité.

C'est pourtant ce qui peut arriver. À cet égard, je souhaite citer un cas récent survenu en 2013 qui est dans le domaine public et qui a été publié dans plusieurs revues scientifiques. Il s'agit d'un agent dépigmentant utilisé en Asie, dérivé du phénol, le

rhododendrol, qui, après trois ans de mise sur le marché et une période de surveillance post-marketing rigoureuse, a déclenché une réaction de leucodermie (destruction des mélanocytes et apparition de taches de dépigmentation quasiment irréversibles) chez les consommateurs avec plus de 14 000 cas remontés et une prévalence estimée de 1 % ! Le produit a été retiré du marché mi-2013, ce qui est dramatique.

Il faut savoir par ailleurs que les agents d'éclaircissement du teint ou permettant d'éclaircir les taches brunes (taches de vieillesse) sont très utilisés par toute l'industrie cosmétique. Sur le plan de la chimie, ce sont deux familles de produits que l'on trouve en majorité : les dérivés de résorcinol comme le Lucinol, ou les dérivés du phénol (Figure 21). De nombreuses études mécanistiques réalisées par les industriels eux-mêmes et d'autres équipes académiques dans le monde ont montré que les effets secondaires observés sont sans doute attribuables à une interaction particulière de la molécule avec la tyrosinase, l'enzyme responsable de la synthèse de la mélanine dans l'usine à pigment qu'est le mélanocyte. En fait, cette

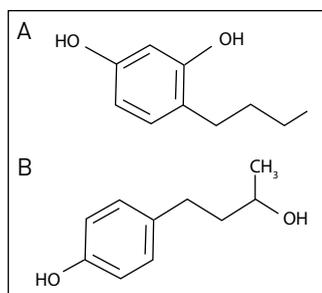


Figure 21

Molécules de lucinol (A) et rhododendrol (B), ayant un rôle dans les effets secondaires de leucodermie rencontrés en Asie en 2013.

molécule conçue pour être juste un inhibiteur réversible de la tyrosinase s'est avérée être capable dans certains cas d'activer le rhododendrol en orthoquinone, qui est à l'origine de la cytotoxicité sur les mélanocytes.

En revanche d'autres dérivés de phénol ne sont pas activés par la tyrosinase dans les mêmes conditions, de même que le dérivé de résorcinol, le lucinol. Dans ce cas, aucune des études toxicologiques réglementaires (en Asie, ce type de substance fait l'objet d'un dossier quasi-drug très conséquent), ni aucune étude clinique préalable à la mise

sur le marché n'avait détecté ces effets.

Avec nos outils et notre savoir-faire, nous avons vérifié si nous aurions pu détecter et prévenir de tels effets. L'ensemble des outils développés depuis quarante ans, et en particulier dans les domaines de l'activation métabolique et du métabolisme, mais aussi celui de la pigmentation avec l'utilisation des tyrosinases humaines ou de champignons, notre connaissance de la biologie du mélanocyte, nous ont montré que nous saurions maintenant détecter préventivement de tels effets lors du développement d'une nouvelle molécule.

Les peaux reconstruites : source d'innovation en cosmétique

Quarante ans d'efforts, de convictions et de passions dans ce combat pour supprimer l'expérimentation animale ont permis parallèlement de contribuer très significativement à l'innovation.

Les modèles de peaux humaines reconstruites, et en particulier ceux contenant un épiderme et un derme vivants, ont permis d'aborder la connaissance des effets du rayonnement solaire de façon extrêmement fine.

En vingt ans, deux résultats majeurs ont été obtenus avec ces outils, résultats qui n'auraient pas été obtenus par la simple recherche clinique pour de multiples raisons :

- bien plus que les UVB, les UVA jouent un rôle essentiel dans l'apparition des signes cliniques de l'âge et dans les événements biologiques

précoces des cancers cutanés. Par ailleurs, sur le marché mondial, les technologies ne permettent pas aujourd'hui pour un certain nombre de raisons techniques de protéger dans le domaine des UVA longs (370-400 nm). Les peaux reconstruites couplées aux approches « omiques » nous ont permis de montrer la très forte contribution de ces UVA longs à des dégâts biologiques en lien avec l'immunosuppression et l'inflammation ;

– la lumière du jour, à laquelle nous sommes exposés dans les différentes régions du monde, est surtout riche en UVA. Suivant les latitudes, les doses d'UVA reçues peuvent varier de 1 à 6. Dans les pays et régions du monde les plus exposés à ce rayonnement ; il est donc essentiel de se protéger avec des produits de jour couvrant surtout le spectre UVA et non UVB. Cela paraît anodin mais c'est une révolution d'avoir montré cela scientifiquement car les produits de protection disponibles de jour ne couvraient il y a quelques années que les UVB. Nous avons montré scientifiquement que ce n'était pas pertinent. Ces découvertes ont été essentielles pour innover et proposer des technologies efficaces de protection quotidienne sous toutes les latitudes où les doses d'UVA reçues sont fortes.

De même, les modèles de peaux reconstruites pigmentées, notre connaissance approfondie de la biologie du mélanocyte, nos collaborations avec la recherche médicale sur certaines maladies rares, ont montré que l'apparition des taches de vieillesse, que nous découvrons tous sur notre peau à partir d'un certain âge (suivant les types de peaux et les latitudes où nous vivons), sont en partie dues à une perte progressive du contrôle des mélanocytes dans l'épiderme basal par les fibroblastes du derme superficiel. En termes simples, nous avons découvert que c'est le fibroblaste qui joue dans

le derme le rôle de chef d'orchestre de la fonction pigmentaire situé au-dessus. Plus un fibroblaste vieillit, plus il est « fatigué » et moins le mélanocyte est contrôlé, et plus la production de pigment semble importante conduisant ainsi à des phénomènes d'hyperpigmentation et de taches, caractéristiques des signes du vieillissement cutané. Les conséquences en termes d'innovations sont évidemment très importantes pour concevoir des technologies efficaces pour empêcher la formation de taches ou certains désordres pigmentaires.

C'est aussi grâce aux peaux reconstruites qu'il y a vingt ans, les importants effets cutanés d'une molécule simple et connue comme la vitamine C ont été mises en évidence, notamment son rôle protecteur de la matrice extracellulaire, c'est-à-dire du derme. C'est la raison pour laquelle cette vitamine C est, lorsqu'elle est utilisée aux bonnes concentrations, un des actifs anti-âge les plus puissants de la cosmétique. Et c'est aussi grâce aux peaux reconstruites qu'ont été découvertes les propriétés dépigmentantes de la vitamine C.

Enfin il faut rappeler les contributions de notre savoir-faire en ingénierie tissulaire et cellulaire cutané à la recherche médicale. Notre savoir-faire en ingénierie cellulaire a permis, au travers d'une collaboration de dix ans avec l'hôpital Percy de Clamart, d'améliorer les technologies de culture des implants cutanés pour une meilleure prise de greffe chez les grands brûlés. Quinze ans de recherche, toujours en cours après une dizaine de publications, ont permis d'améliorer la compréhension de cette maladie qu'est *Xeroderma Pigmentosum*, la maladie des enfants de la lune.