De l'expression des

« StratiCELL Skin Knowledge Database », nouvelle base de données dédiée à la peau, renforce la pertinence de l'interprétation des données et établit enfin la correspondance entre les modifications d'expression de gènes et les bénéfices dermo-cosmétiques que l'on peut attendre d'un actif ou d'un extrait biologique.



Analyses génomiques et perspective cosmétique

L'étude des modifications de l'expression des gènes prend de plus en plus d'importance dans la recherche et le développement d'actifs cosmétiques. L'approche permet à la fois d'identifier des cibles innovantes. et de collecter un ensemble de données permettant de décrypter les mécanismes d'action des actifs. Il s'agit également d'une stratégie

efficace pour identifier de nouvelles activités et allégations de produits existants, en leur assurant un nouveau positionnement et une extension de leur cycle de vie (Figure 1). La culture de cellules, la reconstitution d'épidermes in vitro ou l'obtention de disques de peau issus de chirurgies abdominales constitue la première étape de la stratégie expérimentale. Une fois traités par les actifs dans des conditions expérimentales contrôlées, les ARNs en sont extraits, et étudiés au travers de technologies de référence.

From gene expression data

A new database dedicated to skin biology, namely « StratiCELL Skin. Knowledge Database » has been developed to reinforce the relevance of data interpretation, and to underscore the match between gene expression changes and dermo-cosmetic benefits that can be expected from an active compound or biological extract.

Genomic analysis and cosmetic research

The study of gene expression changes is of growing importance for the research and development of innovative cosmetic products. This kind of study allow both to identify original targets and to gather a collection of data allowing to shed light on the mechanism of action of active compounds. Such a strategy also reveals to be efficient in the identification of new applications and claims about existing products, thereby ensuring a new positioning and an extended life cycle (Figure 1).

Cell culture, reconstitution of in

vitro skin models, or collection of skin biopsies from abdominal or breast surgery is the first step of the experimental strategy. After treatment with the active compound in experimentally controlled conditions, total RNA is extracted and studied using reference technologies. TaqMan qRT-PCR conducted with fluorescent dyes from single (TaqMan assays) up to 384 parallel assays (384-well TagMan arrays) is a key strategy to focus on dermo-cosmetic benefits. In contrast, DNA microarrays, like high-density oligonucleotide arrays, allow to specifically target more than 30.000 genes/transcripts in parallel, thereby allowing highthroughput screening.

enes aux allégations

La qRT-PCR à l'aide de sondes fluorescentes de type TaqMan sur des cibles individuelles (TagMan assays) ou en plaques 384-puits (TaqMan arrays) constitue une approche ciblée sur certains bénéfices dermocosmétiques. La technologie des puces à ADN développée entre autres par la firme Affymetrix constitue, quant à elle, une approche de criblage à haut débit, où plus de 30 000 gènes/cibles sont analysés en parallèle.

Analyses ciblées par **qRT-PCR** sur cartes TaqMan thématiques 384-puits

L'analyse des modifications d'expression par la technique de gRT-PCR TagMan en plagues 384-puits présente l'avantage de

se focaliser sur 96 ou 384 gènes démontrant un intérêt majeur dans le fonctionnement et l'intégrité de la peau, et identifiés comme acteurs clés dans le cadre de bénéfices dermo-cosmétiques. Citons par exemple la différenciation et l'hydratation de l'épiderme, la cicatrisation, la pigmentation cutanée, la réponse au stress généré par le soleil ou par les polluants, ou encore le vieillissement cutané. Les données générées par cette stratégie sont particulièrement fiables, en lien avec la forte spécificité de la technique assurée par la reconnaissance des séquences à la fois par les amorces de la PCR et la sonde TagMan spécifique de la ciblée. Il est important de souligner que les résultats ne doivent pas être confirmés par une autre

technique, permettant de passer directement à des études au niveau de l'abondance protéique et/ou aux tests fonctionnels. De

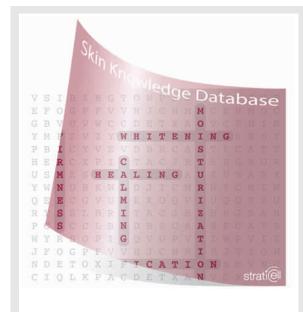


FIGURE 1: ANALYSE GÉNOMIQUE, UNE STRATÉGIE INTÉRESSANTE EN COSMÉTIQUE. GENOMIC ANALYSIS, A PROMISING STRATEGY FOR COSMETIC.

to cosmetic claims

qRT-PCR thematic screening with custom 384-well TaqMan arrays

Analyzing gene expression changes using aRT-PCR conducted on TaqMan 384-well arrays offers the advantage to focus on 96 to 384 target genes, carefully selected and identified as key factors of dermo-cosmetic benefits. Among other examples, we can refer to differentiation, epidermis hydration, wound healing, skin pigmentation, UV-induced or pollutant-induced stress response, or senescence/aging.

The output data from such a strategy reveal to be reliable and robust, thanks the high specificity of the technique that results from

the design of specific PCR primers and specific fluorescent TaqMan probe. Furthermore, highlighting that this technique frees the biologist from further validation with another technique is noteworthy, thereby directly allowing to design downstream investigations, i.e. measuring protein abundance and/or functional tests. To properly interpret the data with regards to dermo-cosmetics benefits, a deep knowledge in skin biology and the awareness of recent scientific publications on the topic are necessary. Such information can of course be supplied either by the researcher, or by the service provider, who is in charge of the scientific interpretation, and possibly the source of innovative marketing concepts.

However, one must keep in mind that the qRT-PCR experimental strategy is limited by the maximum number of targets that can be screened in parallel (384). Consequently, only the genes presenting a major interest in the field will be tested, and this approach is not adapted for a comprehensive whole-genome/ transcriptome screening.

Transcriptome analyses on microarrays

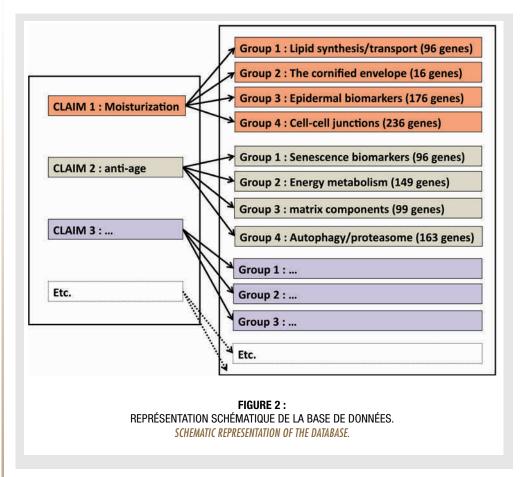
DNA microarrays, like the Affymetrix Genechip oligonucleotide arrays, are widely used for gene expression profiling at the scale of the whole-genome/transcriptome. Full transcriptome analysis is conducted in parallel on tens bonnes connaissances en biologie de la peau et une revue poussée de la littérature sont toutefois nécessaires pour interpréter les données et identifier les résultats en lien avec un possible bénéfice cosmétique. Celles-ci peuvent, bien entendu, être apportées par le chercheur lui-même, ou par le prestataire éventuel, qui se chargera de l'interprétation scientifique des données, allant dans certains cas jusqu'à proposer un concept marketing innovant.

Il est toutefois important de garder à l'esprit que l'approche qRT-PCR se limite à analyser au maximum 384 gènes en parallèle. Seuls les gènes qui présentent un intérêt majeur pour la peau sont étudiés, puisque la technique ne couvre pas de façon exhaustive l'intégralité des gènes exprimés.

Analyses transcriptomiques sur puces à ADN

La technologie de référence pour analyser l'ensemble des ARN messagers exprimés en présence d'un actif repose sur les puces à ADN. On parle dans ce cas d'une analyse à l'échelle du transcriptome, soit plus de 30 000 gènes/cibles en parallèle. L'acquisition des données est basée sur l'hybridation des ADNs complémentaires issus des ARN messagers à de courtes séquences appelées oligonucléotides, greffées sur un support ad hoc. Il s'agit d'une approche quasi exhaustive, dite sans a priori, puisque les gènes ne sont pas préalablement sélectionnés. Les résultats obtenus doivent cependant être confirmés par la suite par qRT-PCR au niveau des gènes les plus intéressants. Si la technique offre une mine d'informations, il est cependant important de prendre en compte que cette masse d'informations nécessite un traitement statistique. une contextualisation et une interprétation biologique des données qui peuvent se révéler complexes et chronophages. L'analyse demande une expertise combinée en bio-informatique et en biologie cutanée pour identifier les résultats les plus marquants, sur base d'une

analyse de groupes de gènes et



"The mapping is now possible between genes / genes groups modulated by an active compound and cosmetic benefits that can be expected."

of thousands targets in parallel. Following RNA extraction, reverse transcription to cDNA, labelling, and fragmentation, the hybridization is performed on the chip, which holds a large collection of small 25-nucleotide probes, specifically designed to match currently known genes/transcripts. This approach does not rely on the prior selection of interesting genes (no a priori). However, highthroughput screening conducted on microarrays requires further studies with qRT-PCR to validate interesting detected genes.

Although microarray experiments provide a plethora of information, it's important to remind that such a large quantity of parallel tests requires an adapted statistical processing and appropriate annotation/contextualization/visualization. The downstream biological interpretation can be a complex and time-consuming task. The analysis and interpretation of the results requires deep expertise

d'annotations individuelles. Très simplement, une analyse de groupe consiste à analyser les gènes, regroupés par thématiques et impliqués dans une voie biologique d'intérêt. Il s'agit d'affirmer via une probabilité statistique que telle ou telle voie/processus est effectivement modulée par l'actif. L'annotation individuelle consiste, quant à elle, à regarder gène par gène les modifications d'expression statistiquement significatives et d'en tirer des hypothèses quant aux cibles potentielles de l'actif et à son mécanisme d'action.

Nouvelle base de données StratiCELL

La complexité potentiellement liée à l'interprétation biologique des résultats repose en grande partie sur le caractère très généraliste des bases de données et interfaces web disponibles, dont les thèmes

in biostatistics/bioinformatics and skin biology, to identify the main lessons from the results, involving both individual gene annotation and statistical evaluation of sets of genes biologically related (groups).

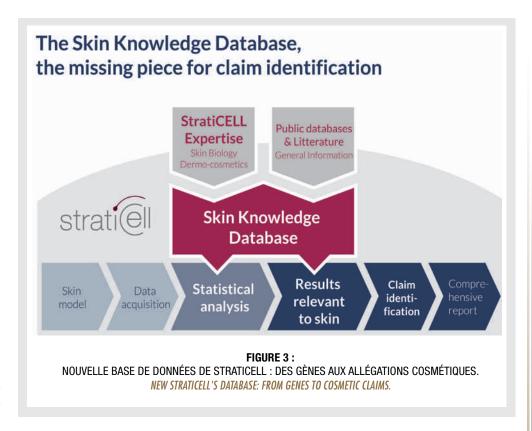
Group analysis consists in a joint evaluation of several genes that are connected together by a common theme, i.e. involved in the same biological pathway. The aim is to statistically evaluate the probability that a given biological pathway/process, is modulated by an active compound. Individual annotations bring the details, and allow a gene-wise focus on significant expression changes, to formulate hypothesis on putative targets of the active compound and on its mechanism of action.

The new StratiCELL Database

The complexity of the biological interpretation of the results is

et groupes sont rarement associés directement et explicitement à la biologie cutanée (ex. KEGG, Reactome, Gene Ontology, Ref-Seq, etc.). Travaillant sur la peau, il est en effet impératif d'identifier aisément, parmi les informations et les connaissances actuelles, celles qui ont un intérêt pour la peau. Celles-ci sont cependant souvent noyées dans une masse de données généralistes ou dédiées à certains sujets fortement étudiés, fréquemment en lien avec des pathologies diverses.

«Il est maintenant possible d'établir une correspondance entre les gènes et groupes de gènes modulés par un actif et les bénéfices cosmétiques que l'on peut attendre ».



related to the fact that most biological databases and web interfaces provide general, nonspecific information, so that that genes/themes analysis are rarely related to skin biology (i.e. KEGG, Reactome, Gene Ontology, RefSeq, etc.). Working with skin samples, easily identifying information relevant to skin biology, among current knowledge and available information, is a major challenge. Indeed, knowledge relevant to skin biology is often flooded in a large set of non-specific information, and/or specifically dedicated to major research fields, frequently

focusing on pathologies.

This is why a new concept has recently emerged, that is a structured knowledge center in which information is specific to skin biology or dedicated to the associated dermo-cosmetic properties/benefits (« the StratiCELL Skin Knowledge Database »).

This is a relational database, that includes the classification of more than 3.500 genes and their gathering in themes/groups related to skin biology and functions (Figure 2). Such a gathering models the expertise acquired by StratiCELL through thousands

Pour cette raison, un nouveau concept a vu le jour récemment, à savoir un centre de connaissances structuré au sein duquel les informations sont dédiées à la biologie de la peau et aux propriétés cosmétiques associées (« the Strati-CELL Skin Knowledge Database »). Il s'agit d'une base de données relationnelle où plus de 3 500 gènes ont été regroupés en thèmes et groupes liés aux fonctions de la peau (Figure 2). Ce regroupement modélise toute l'expérience acquise par StratiCELL de façon empirique au travers de ses activités (tests et modèles de peau in vitro), et intègre les données disponibles dans la littérature et les informations fournies par les bases de données généralistes. Utilisant cette base de données unique, il est maintenant possible d'établir une correspondance explicite entre les gènes et groupes de gènes modulés par un actif d'une part, et les bénéfices cosmétiques que l'on peut en attendre d'autre part. Il s'agit donc d'un outil indispensable pour renforcer la pertinence de l'interprétation biologique réalisée par le biologiste. L'expertise permet ensuite de contextualiser les résultats obtenus par rapport aux bénéfices apportés par un actif ou extrait (Figure 3). La base de données se double d'une interface conviviale, permettant d'automatiser l'analyse statistique et de générer de multiples tableaux et figures thématiques pour illustrer les résultats.

Cas pratique

À titre d'exemple, une analyse du transcriptome sur puce à ADN a été réalisée dans le but de caractériser les bénéfices cosmétiques potentiels de l'extrait Macaderm™ de racines de *Lepidium meyenii* Walp, appliqué dans le milieu de culture d'un épiderme humain reconstitué *in vitro*.

L'analyse du transcriptome en ayant recours à la base de données StratiCELL a permis d'identifier de multiples voies biologiques modulées par l'extrait, avec notamment des effets sur les gènes constituant l'enveloppe cornée, la synthèse des lipides intercornéocytaires et les jonctions cellulaires, constituant de la sorte un faisceau d'évidences soutenant une allégation liée au renfort de la barrière épidermique ainsi qu'une meilleure fermeté et hydratation cutanée. Ces résultats ont été par ailleurs présentés lors du 28e congrès IFSCC à Paris, et ont fait l'objet d'un soutien financier de la part de la Région Wallonne.



Michel Salmon
StratiCELL SA
PhD, directeur général
& scientifique
PhD, managing and
R&D director

Fabrice Berger
StraticELL SA
PhD, responsable
plateforme bio-informatique
PhD, lead scientist,
bio-informatics



of studies about skin. It also includes information available in the scientific literature and in general databases. Thanks to this exclusive database, the mapping is now possible between genes/groups modulated by an active compound on one hand, and cosmetic benefits that can be expected on the other hand. Such a tool is thus necessary to strengthen the relevance of the biological interpretation. The expertise of the biologist then allows to contextualize the results in terms of benefits brought by an active compound or extract (Figure 3). The database is jointly developed with a user-friendly interface, allowing the automation of statistical analysis and the generation of multiple summarizing tables and figures, to illustrate the results.

Case study

As an example among others, transcriptome analysis has been conducted with DNA oligonucleotide arrays, to characterize putative cosmetic benefits of Macaderm™, a Lepidium meyenii Walp root extract applied in the culture medium of an in vitro reconstructed human epidermis. Transcriptome

analysis performed with the help of StratiCELL's database allowed to identify multiple biological pathways modulated by the extract, especially the effects on genes involved in the cornified envelope, lipid synthesis and cell junctions, thereby building a set of evidences supporting the claim of the strengthening of the epidermal barrier, as well as better firmness and cutaneous hydration. These results have been presented at the 28th IFSCC congress in Paris. ■

* This work has been supported by the Walloon Region (research grant n°7041)