

Anti-pollution et efficacité

La récente prise de conscience des effets de la pollution atmosphérique sur la peau a entraîné le développement intensif d'agents dermo-cosmétiques protecteurs. Pour se positionner sur ce marché en pleine expansion de manière efficace, il est aujourd'hui important d'en identifier les mécanismes cutanés sous-jacents. Face aux nombreuses zones d'ombre associées à cette thématique, ci-après, un état des lieux et quelques points de réflexion à prendre en considération lors de la planification de telles études *in vitro*.

► Pollution atmosphérique : une préoccupation mondiale qui ne ménage pas notre peau

Récemment confirmé par l'Organisation Mondiale de la Santé, la pollution urbaine est aujourd'hui reconnue comme l'enjeu de santé environnementale le plus important à l'échelle mondiale. En

contact direct avec l'environnement, notre peau est la première à en subir les conséquences. Des études de grande envergure menées sur les populations urbaines de villes industrielles telles que Mexico, Shanghai et Sao Paulo ont permis de démontrer cliniquement les effets délétères de l'environnement urbain sur la peau : vieillissement prématuré, états d'inflammations

chroniques et/ou allergiques, etc. (1-3). L'air ambiant contient de nombreuses particules microscopiques en suspension (*Particulate Matter, PM*) véhiculant diverses molécules chimiques toxiques, dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Une fois au contact de la peau, ces particules peuvent pénétrer jusque dans les cellules épidermiques et y libérer leurs composés toxiques,

Anti-pollution and in vitro

The recent awareness of the effects of air pollution on skin has led to the intensive development of protective dermo-cosmetic agents. To be efficiently positioned on this expanding market, it is important to identify the skin's underlying mechanisms. Given the many grey areas surrounding this issue, you will find below an overview of the situation and some points to consider when planning such in vitro studies.

► Air pollution: a global concern that does not spare our skin

Urban pollution, which was recently confirmed by the World Health Organization, is now recognized as the most important environmental health issue in the world. In direct contact with the environment, our skin is the first one to suffer the consequences. Large-scale studies on urban populations of industrial cities

such as Mexico City, Sao Paulo and Shanghai have helped to clinically demonstrate the noxious effects of the urban environment on skin: premature ageing, chronic and/or allergic inflammatory conditions, etc. (1-3). Ambient air contains a quantity of microscopic suspended particulate matters (PM) carrying various toxic chemical molecules, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Once in contact with the skin, these particles can penetrate right into the

epidermal cells and release their toxic compounds, a source of highly reactive free radicals. In combination with other environmental stressors such as ozone and UVs, they disrupt the balance between production and elimination of reactive oxygen species and nitrogen, promote an inflammatory condition and thus damage many biological macromolecules (4). Air pollution induced chronic stress impacts and alters the integrity of the skin barrier to the point of genera-

in vitro : état des lieux

sources de radicaux libres hautement réactifs. Combinées à d'autres facteurs de stress environnementaux tels que l'ozone et les UV, elles perturbent l'équilibre entre production et élimination des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, favorisent un état inflammatoire et endommagent ainsi de nombreuses macromolécules biologiques⁽⁴⁾.

Le stress chronique engendré par la pollution atmosphérique affecte et modifie l'intégrité de la barrière cutanée jusqu'à générer/aggraver certaines pathologies : sensibilité, irritabilité, déshydratation, troubles de la pigmentation, dermatite, etc.

► Les mécanismes de défense cellulaire face à la pollution

Il existe au sein des cellules des mécanismes de défense permettant l'élimination d'agents exogènes tels que

les polluants. Principalement, cette protection est assurée par deux voies biochimiques fondamentales étroitement liées entre elles et finement régulées par leurs facteurs de transcription respectifs :

1. La voie *NF-E2-related factor 2*

(**Nrf2**) ; elle régule un ensemble de réponses adaptatives aux stress cellulaires intrinsèques et extrinsèques en induisant l'expression de gènes impliqués dans la neutralisation des oxydants (**Figure 1**). Entre autres, son activation conduit à augmenter le niveau des défenses anti-oxydantes, améliorer la prise en charge et le recyclage des protéines endommagées, et inhiber l'inflammation induite par les cytokines.⁵

2. La voie du récepteur aux hydro-

carbures aromatiques (AhR) : situé dans le cytoplasme, AhR est activé par de nombreux hydrocarbures aromatiques, dont les dioxines, les HAP, ou encore les polyphénols et

induit l'expression de gènes codant pour des enzymes de détoxicification tels que les mono-oxygénases de type cytochrome P450 (phase I) et la glutathion S-transférase (phase II) (**Figure 1**).

Les enzymes de détoxicification améliorent la solubilité aqueuse de composés exogènes afin de faciliter leur élimination⁽⁶⁾. Paradoxalement, l'activation d'enzymes de phase I provoque la production de métabolites intermédiaires oxydants plus dangereux que les polluants eux-mêmes et nécessitant une neutralisation rapide. L'équilibre entre enzymes de phase I, de phase II et autres antioxydants est donc essentiel au maintien de l'intégrité cellulaire. Ainsi, il n'est pas surprenant de retrouver plusieurs enzymes de phase II co-régulées par Nrf2. Plusieurs études ont démontré que ces voies interagissent aussi avec d'autres voies de signalisation telles que NF-κB, Wnt, p53, Notch, etc.⁽⁷⁾ En

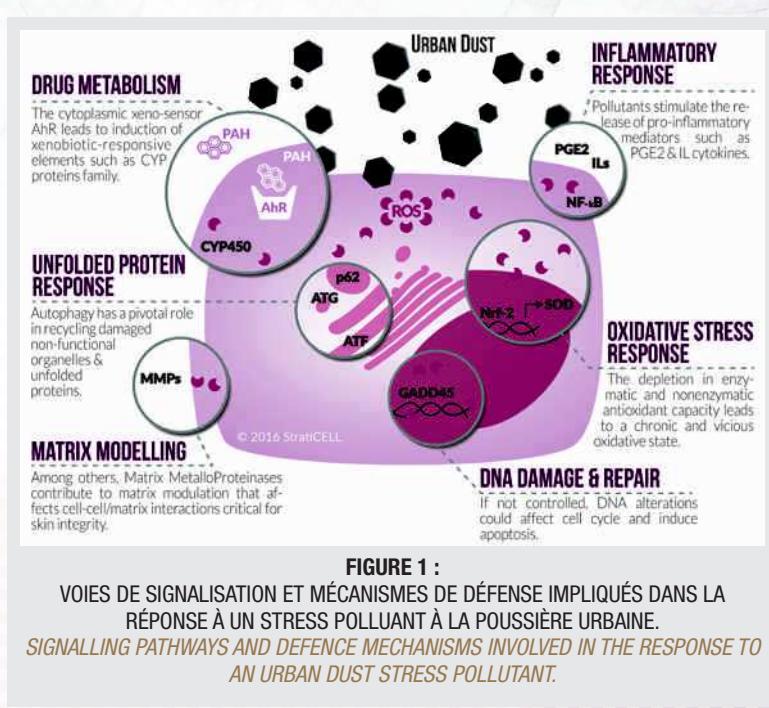
efficiency: overview

*ting/worsening certain pathologies:
sensitivity, irritability, dehydration,
pigmentation disorders, dermatitis,
etc.*

► The cellular defence mechanisms against pollution

Defence mechanisms exist within the cells, to help eliminate exogenous agents such as pollutants. Primarily, two fundamental biochemical pathways closely interconnected and finely regulated by their respective transcription factors provide this protection:

1. The NF-E2-related factor 2 (Nrf2) pathway; it regulates a set of adaptive responses to intrinsic and extrinsic cellular stresses by inducing the gene expression involved in the neutralization of oxidants (**Figure 1**). Its activation increases the level of antioxidant defences, improves the management



and recycling of damaged proteins, and inhibits induced cytokine inflammation.⁽⁵⁾

2. The **aryl hydrocarbon receptor's pathway (AhR)** in the cytoplasm, AhR is activated by a number of aromatic

particulier, l'équilibre entre l'activation de Nrf2 et NF- κ B a un impact significatif sur l'état inflammatoire induit par les polluants tandis que l'influence de ces derniers sur l'activation de la voie Wnt engendre des modifications de la pigmentation cutanée. Par ailleurs, l'activation des facteurs de transcription AhR et Nrf2 est aussi impliquée dans la différenciation des kératinocytes (7-9).

► Pollution et tests d'efficacité : quelle démarche adopter *in vitro* ?

En fonction des objectifs et des connaissances sur les ingrédients/formules à tester, une configuration rigoureuse des paramètres d'objectivation *in vitro* se doit d'être effectuée au préalable :

- **Le challenge** : parmi la multitude de polluants standardisés disponibles *in vitro* (PM2.5, particules fines de diesel, fumée de cigarette, benzo[a]pyrène, métaux lourds, etc.), l'extrait de poussière urbaine a l'avantage de représenter la pollution atmosphérique de manière plus globale avec une composition bien caractérisée.

À préciser que chaque produit (polluant, agent protecteur, référence, etc.) possède sa propre signature de réponse. Par exemple, les effets d'un extrait de fumée de cigarette sur la morphologie et la différenciation épidermique diffèrent fortement de ceux observés après exposition du même épiderme à la poussière urbaine (10).

- **Le modèle** : la sélection du modèle cellulaire (cellules en monocouches 2D) ou tissulaire (épidermes reconstruits 3D) dépendra des mécanismes d'action recherchés. Par exemple, l'objectivation de propriétés protectrices face aux troubles pigmentaires induits par la pollution requiert un modèle d'épiderme

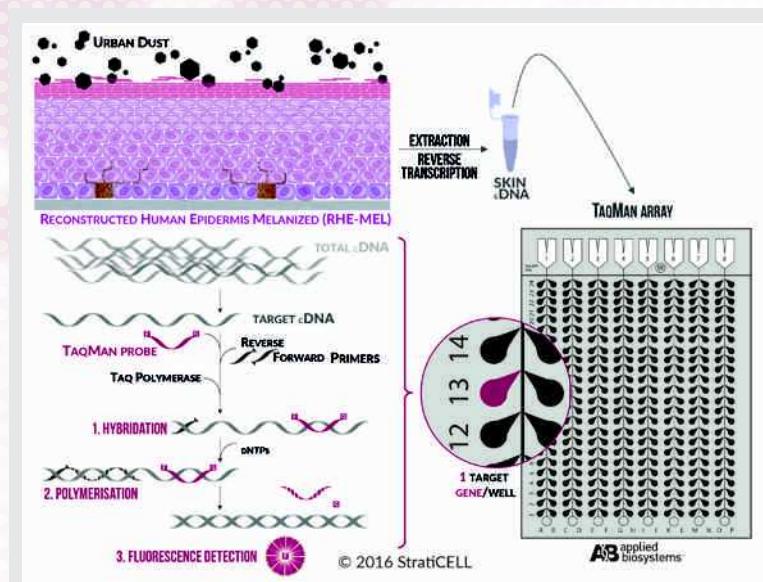


FIGURE 2 :
PRINCIPE DU TAQMAM ARRAY « POLLUTION & DÉTOXIFICATION » : ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE PAR QRT-PCR À PARTIR D'ÉPIDERMES RECONSTRUIS MÉLANISÉS (RHES-MEL) EXPOSÉS À LA POUSSIÈRE URBAINE.
PRINCIPLE OF THE TAQMAM ARRAY “ POLLUTION & DETOXIFICATION ”: TRANSCRIPTOME QRT-PCR ANALYSIS FROM MELANISED RECONSTRUCTED EPIDERMIS (RHES-MEL) EXPOSED TO URBAN DUST.

hydrocarbons, among which, dioxins, PAHs, or polyphenols and induces the gene encoding expression for detoxification enzymes such as cytochrome P450 type monooxygenases (Phase I) and glutathione S-transferase (Phase II) (Figure 1). Detoxification enzymes improve the aqueous solubility of exogenous compounds to facilitate their elimination (6). Paradoxically, the activation of phase I enzymes leads to the production of oxidative intermediate metabolites, which are more dangerous than pollutants themselves, thus requiring rapid neutralization. A balance between phase I and phase II enzymes and other antioxidants is therefore crucial for maintaining cellular integrity. It is therefore not surprising to find several phase II enzymes co-regulated by the Nrf2.

Several studies have shown that these pathways also interact with other signalling pathways such as NF- κ B, Wnt, p53, Notch, etc. (7). In particular, the balance between the activation of Nrf2 and NF- κ B has a significant impact on the inflammatory state triggered by pollutants while the influence of the latter on the activation of the Wnt pathway leads to changes in skin pigmentation. Furthermore, the activation of AhR and Nrf2 transcription factors is also involved in keratinocyte differentiation (7-9).

► Pollution and efficiency tests: what is the appropriate *in vitro* approach?

Depending on the objectives and the knowledge of ingredients/

formulations to test, a rigorous configuration of the parameters for *in vitro* substantiation should be carried out first:

- **The challenge**: among the vast array of standardized pollutants available in *in vitro* (PM2.5, diesel fine particles, cigarette smoke, benzo[a]pyrène, heavy metals, etc.), urban dust extract has the advantage of representing air pollution in a more comprehensive way with a well-characterized composition.

To note that each product (pollutant protective agent, benchmark, etc.) has its own response signature. For example, the effects of a tobacco smoke extract on the morphology and epidermal differentiation are very different from those observed after exposure of the same epidermis to urban dust (10).

- **The model**: the selection of the cell model (2D monolayer cells) or tissue model (3D reconstructed epidermis) will depend of the

mélanisé reconstruit *in vitro* permettant d'étudier les interactions complexes entre mélanocytes et kératinocytes.

- Les techniques :

- Les **analyses transcriptomiques** intègrent toute la complexité de réponses et l'interconnexion des voies de signalisation en formulant des hypothèses mécanistiques anti-pollution. Cette stratégie permet d'étudier simultanément le profil d'expression de gènes clés, associés aux mécanismes de défense cellulaire ; soit de manière ciblée par qRT-PCR arrays (**Figure 2**), soit à l'échelle du génome entier sur puces à ADN.
- Les **études fonctionnelles** permettent d'identifier directement les effets d'agents anti-pollution sur de nombreux biomarqueurs d'intérêt (*end points*) tels que la production d'agents radicalaires ou des marqueurs de l'intégrité de la fonction barrière, de la différenciation de l'épiderme, de la structure de la

matrice, les enzymes de remodelling, ou encore l'amplitude de la réponse inflammatoire (**Figure 1**).

► Conclusion

Si les effets délétères de la pollution atmosphérique sur la peau sont désormais bien établis, la complexité de l'équilibre entre les différentes voies de signalisation sous-jacentes peut rendre la problématique difficile à appréhender. Pour une objectivation anti-pollution optimale *in vitro*, il est donc important de pouvoir proposer une explication mécanistique des phénomènes mis en jeu en regard des différents marqueurs fonctionnels pouvant être observés. Suite aux récents travaux visant à caractériser *in vitro* les mécanismes de défense cutanée en réponse à divers polluants atmosphériques, de nouveaux tests pertinents sont maintenant disponibles et permettent de révéler de nombreux agents dermo-cosmétiques anti-pollution innovants. ■



Roland HUBAUX

STRATICELL

Responsable recherche –
Recherche & Développement
Lead Scientist – Research and Development

Références

- (1) Drakaki et al. Air pollution and the skin. 2014
- (2) Kim et al. Air pollution and skin diseases: Adverse effects of airborne particulate matter on various skin diseases. 2016
- (3) Lefebvre et al. Consequences of urban pollution upon skin status. A controlled study in Shanghai area. 2016
- (4) Poljsak et al. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. 2014
- (5) Wakabayashi et al. When NRF2 talks, who's listening? 2010
- (6) Haarmann-Stemmann et al. The AhR-Nrf2 pathway in keratinocytes: on the road to chemoprevention? 2012
- (7) Lee et al. Rôle of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) in epidermal differentiation. 2014
- (8) Piao et al. Nrf2-dependent and Nrf2-independent induction of phase 2 detoxifying and antioxidant enzymes during keratinocyte differentiation. 2012
- (9) Van den Bogaard et al. Genetic and pharmacological analysis identifies a physiological role for the AhR in epidermal differentiation. 2015
- (10) Hubaux et al. *In vitro* assays to study the effects of air pollutants on skin: exposure to urban dust and cigarette smoke extract. 2015

desired mechanism of action. For example, the objectification of protective properties vs. pollution induced pigmentation disorders requires an *in vitro* reconstructed melanised epidermis model to study the complex interactions between melanocytes and keratinocytes.

- Techniques:

- **Transcriptomic analyses** integrate the full complexity of responses and the interconnection of signalling pathways by formulating anti-pollution mechanistic hypotheses. This strategy allows to simultaneously study the expression profile of key genes associated with cellular defence mechanisms; either in a targeted way via qRT-PCR arrays (**Figure 2**), or across the entire genome via DNA array.
- **Functional studies** enable to identify directly the effects of anti-pollution agents on a number of biomarkers of interest (*end-points*), such as the

production of free radical agents or of markers for the integrity of the barrier function, of epidermis differentiation, of the matrix structure, remodelling enzymes, or the amplitude of the inflammatory response (**Figure 1**).

► Conclusion

If the harmful effects of air pollution on the skin are now well established, the complexity of the balance between the various underlying signalling pathways can make the issue difficult to grasp. For optimal *in vitro* anti-pollution objectification, it is therefore important to provide a mechanistic explanation of phenomena involved in relation to the different functional markers observed. Following recent work to characterize *in vitro* skin's defence mechanisms in response to various air pollutants, new relevant tests are now available and can help identify many innovative dermo-cosmetic anti-pollution agents. ■



Céline BLANCHARD

STRATICELL

Réponsable de la communication scientifique
Scientific Communication Manager