

AP 104

Oleopine[®]

Huile cellulaire bioactive du Pinus Halepensis méditerranéen



ACTIFS PRÉCIEUX

AP 104

Oleopine®

Huile cellulaire bioactive du Pinus Halepensis méditerranéen

À la croisée des rituels ancestraux et de la technologie d'extraction moderne se trouve un puissant extrait protecteur pour la peau: **Oleopine®**. Cet extrait lipidique bioactif est sourcé de manière durable dans les forêts de pins d'Alep méditerranéennes du nord-est de la Tunisie. Consommées depuis l'Antiquité pour leurs riches bienfaits nutritionnels et thérapeutiques, les graines de pin sont une source naturelle de précieux lipides, de tocophérols et d'acides gras essentiels pour la peau. Ces acides gras polyinsaturés contribuent à maintenir la barrière lipidique vitale de la peau, emprisonnant l'humidité et préservant la peau nourrie, souple et jeune. Le **Oleopine®** présente également un puissant effet antioxydant protecteur en réduisant de manière significative les espèces réactives de l'oxygène (ROS) induites par les UV et la lumière visible à haute énergie (HEV).

Les graines de pin sont libérées de leurs cônes entre 8 et 10 semaines après maturation. Notre technologie verte moderne, connue sous le nom d'extraction au CO2 supercritique, est utilisée pour accéder et préserver les précieux phytonutriments bioactifs des graines de pin. Cette méthode donne des extraits puissants et hautement stables sans solvants résiduels ni résidus potentiellement nocifs.

Conformité

Oleopine® est conforme à toutes les réglementations européennes applicables aux cosmétiques, y compris:

La réglementation européenne sur les cosmétiques (CE 1223/2009), la directive européenne sur les allergènes dans les cosmétiques (76/768/CE), sur les COV (2004/42/CE), sur les CMR (CE 1272/2008 et CE 1223/2009), sur les nanomatériaux (SCCS/1484/12) et sur les tests sur les animaux (76/768/CE).

De plus, **Oleopine®** est garanti :

- 100% de matériau pur sans additifs
- Non-OGM, non-EST, non-irradié, non-ionisé, non-fumigé et exempt d'oxydes d'éthylène / propylène.
- Contrôlé pour les pesticides, les métaux lourds.
- Issu d'une source renouvelable
- Non soumis au protocole de Nagoya.

ACTIFS PRÉCIEUX

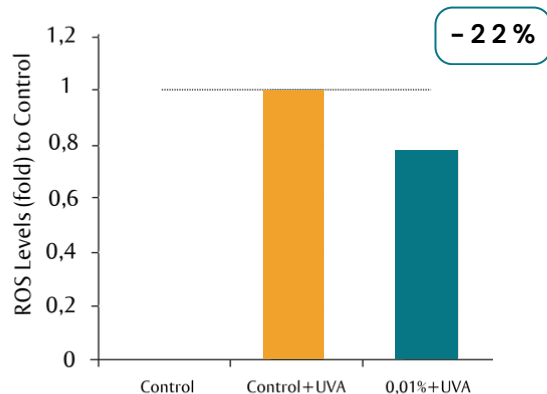
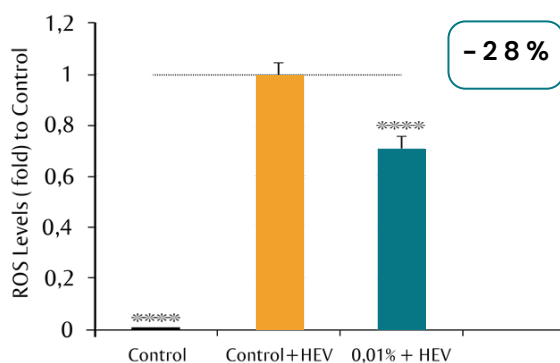
AP 104

Oleopine[®]

Huile cellulaire bioactive du Pinus Halepensis méditerranéen

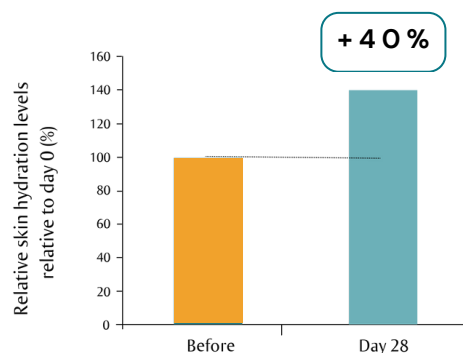
Oleopine[®] réduit le stress oxydatif de 22 à 28 %.

L'effet antioxydant protecteur du **Oleopine[®]** a été étudié in vitro sur des cellules kératinocytes humaines (HaCaT). Les cellules ont été exposées à la lumière visible à haute énergie (lumière bleue) et à la lumière UVA pendant 30 minutes (dose approximative de 120 J/cm² et 3 J/cm² respectivement) pour induire un environnement de stress oxydatif. Une réduction significative des espèces réactives de l'oxygène dommageables a été observée dans les cellules traitées avec 0,01 % de **Oleopine[®]**.



Oleopine[®] augmenté l'hydratation de la peau de 40%

Les résultats ont montré que le traitement avec Oleopine[®] AP-104 pendant 28 jours sur 20 volontaires a augmenté de manière significative l'hydratation de la peau de 40,3 ± 8,0 %, en comparant chaque volontaire avec son propre témoin à J0.



ACTIFS PRÉCIEUX

AP 104

Oleopine[®]

Huile cellulaire bioactive du Pinus Halepensis méditerranéen

Sourcing durable des graines de Pin d'Alep

Durabilité environnementale

- **Récolte respectueuse:** Attendre que les cônes matures tombent naturellement limite les dommages aux arbres et à l'écosystème environnant, évitant la dégradation de la forêt.
- **Empreinte carbone réduite:** La méthode de récolte contribue à réduire l'empreinte carbone, ce qui est crucial dans la lutte contre le changement climatique.
- **Technologie d'extraction écologique:** L'extraction au CO2 supercritique est un processus qui utilise du CO2 dans un état spécifique où il agit comme un solvant propre, préservant la qualité de l'huile sans produits chimiques nocifs.

Durabilité sociale

- **Soutien aux communautés locales:** En utilisant des méthodes traditionnelles, la récolte des graines de Pin d'Alep peut soutenir les économies locales et contribuer à la stabilité sociale régionale.
- **Conservation de la biodiversité:** Encourager des méthodes de récolte respectueuses aide à la conservation des espèces et favorise la biodiversité.

Durabilité dans les cosmétiques

- **Utilisation responsable:** L'huile extraite de manière écologique est idéale pour les cosmétiques naturels, offrant une alternative aux produits chimiques et aux ingrédients non durables.
- **Choix du consommateur:** Opter pour des produits contenant cette huile reflète la conscience et l'engagement envers un mode de vie plus durable et respectueux de l'environnement.

La durabilité et l'écologie dans le contexte des graines de Pin d'Alep et de l'extraction au CO2 supercritique englobent une approche intégrée qui prend en compte l'environnement, la société et l'économie. Cela ouvre la voie à un avenir plus durable en harmonie avec la nature.

ACTIFS PRÉCIEUX

AP 104

Oleopine[®]

Huile cellulaire bioactive du Pinus Halepensis méditerranéen

Nom commercial	Oleopine
Ref	AP 104
INCI	Pinus Halepensis Seed Oil
Pays d'origine	Cape Bon est une péninsule située dans le nord-est lointain de la Tunisie et connue dans l'Antiquité sous le nom de Cap de Mercure
Composition	100 % extrait CO2 de graines Pinus Halepensis
Matière Première	Pinus Halepensis, graines
Processus de production	Obtenu par extraction au fluide supercritique en utilisant du dioxyde de carbone naturel.
Apparence	Liquide clair jaune-blanc
Naturalité selon la norme ISO 16128	CN= 100 %
Statut REACH	Exempté
Bénéfices	• Protection contre le stress oxydatif • Hydratant • Anti-inflammatoire
Applications	• Produits pour le visage et le corps • Protection contre les rayons UV, la lumière HEV et la lumière bleue • Traitements anti-âge réparateurs • Lotions ou sérums hydratants
Conservation	Sans conservateur
Solubilité	Liposoluble
Niveau d'utilisation	0,1 - 5 %
Formulation	Peut être ajouté à l'émulsion une fois que l'émulsion est formée à une température inférieure à 50 °C.
Caractéristiques	Stable jusqu'à 80 °C
Additifs/impuretés	Aucun
Irradiation	Non
Substances CMR	Aucun
Métaux lourds	Aucun
COV (Composés Organiques Volatils)	Aucun

ACTIFS PRÉCIEUX

AP 104

Oleopine®

Huile cellulaire bioactive du Pinus Halepensis méditerranéen

Tests sur les animaux	Non
Traçabilité de la chaîne d'approvisionnement	Oui
Approvisionnement responsable	Oui
Contenu pétrochimique	Non
Contenu animal	Non
Vegan	Oui aucun contenu animal, et aucun produit animal, ni sous produit n'est utilisé dans la production. Qualifié comme étant vegan
OGM (Organismes Génétiquement Modifiés)	Toutes les matières premières proviennent de sources végétales non-OGM
Pesticides	Non
Contenu de palmier	Pas de contenu du palmier
Certifié RSPO	N/A
Contenu en gluten	Non
Durabilité	100% renouvelable
Biodiversité	Conforme au Protocole de Nagoya et à la Convention des Nations Unies sur la Diversité Biologique
Biodégradabilité	Conforme au protocole de Nagoya et à la convention des Nation Unies sur la Diversité Bilologique.
Toxicité aquatique	Non-chronically toxic to aquatic organisms
Proposition 65 de Californie	Non
SVHC de l'UE	Non spécifié
Matériaux nanatechnologique	Pas de nano matériaux, tels que définie par la réglementation de l'UE.
BSE/TSE:	L'ingrédient est exempt de contenu animal et certifié comme étant et certifié comme de risque d'ESB et D'ITS.
Natural Standards:	Conforme les principales normes de cosmétique naturels (par exemple, Cosmos, Natrue, NSF AISI 305).

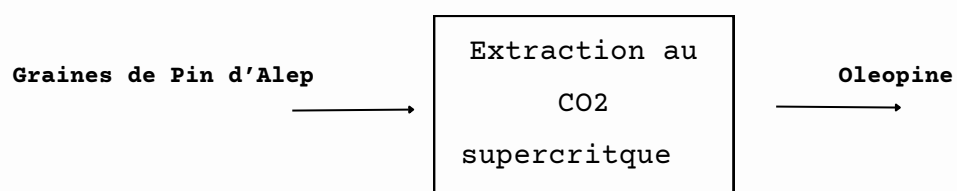
ACTIFS PRÉCIEUX

AP 104

Oleopine[®]

Huile cellulaire bioactive du Pinus Halepensis méditerranéen

Durée de conservation:	24 mois
Aluminum Salts Content :	Non
Teneur en sels d'aluminium:	Non
Teneur en formaldéhyde:	Non
Agent libérant du formaldéhyde:	Non
Teneur en hydroquinone:	Non
Teneur en parabènes:	Non
Teneur en phthalates:	Non
Teneur en sulfate de sodium laurylique (SLS):	Non
Teneur en sulfate de sodium laureth (SLES):	Non
Teneur en triclosan:	non
Cruelty-Free:	oui



ACTIFS PRÉCIEUX

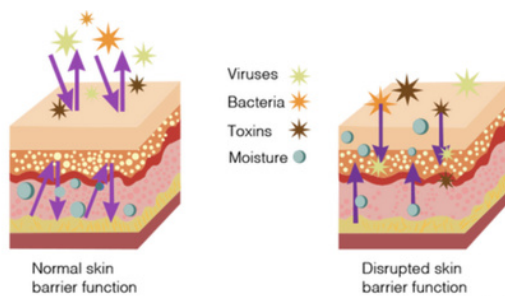


HYDRATATION CUTANÉE (20 VOLONTAIRES, 28 JOURS) ÉVALUATION COSMÉTIQUE CLINIQUE DE AP-104 PENDANT 28 JOURS SUR 20 VOLONTAIRES HUMAINS

Evaluation de l'effet hydratant

L'hydratation est le résultat de plusieurs facteurs tels que la qualité et la fonctionnalité de la barrière cutanée à l'eau, la quantité d'eau contenue dans l'épiderme, la concentration de substances hygroscopiques et l'humidité externe. Même si l'eau contenue dans la peau se trouve principalement au niveau du derme, lorsque nous parlons d'hydratation cutanée, nous nous référons uniquement à l'état de la couche la plus superficielle de la peau, le stratum corneum. La perte d'eau et le maintien d'un gradient d'eau optimal dans la peau sont garantis par un ensemble de régulations fines, basées sur les propriétés fonctionnelles et dynamiques de cette couche. Maintenir la qualité et la cohésion du stratum corneum conditionnera, par exemple, la bonne rétention d'eau dans la peau. [9,10]. La surface de l'épiderme n'est cependant pas en contact direct avec l'extérieur. Elle est recouverte d'un mélange complexe, le film hydrolipidique, qui participe à la fonction barrière de l'épiderme et agit pour emprisonner l'humidité, renforçant ainsi le rôle du stratum corneum. [9,11].

Si la déshydratation est superficielle (épiderme) la peau est moins lumineuse, tendue et le teint devient terne. Une rugosité de surface apparaît, due à l'augmentation du nombre de cornéocytes qui se détachent. La première stratégie mise en place pour renforcer l'hydratation ou limiter la déshydratation consiste à créer un film en surface agissant comme une barrière contre la perte d'eau en ajoutant des substances grasses. À un niveau encore plus profond de notre peau, la nature des lipides entourant les membranes cellulaires et constituant le ciment intercellulaire est également fondamentale dans l'effet barrière du stratum corneum. [9]. Les acides gras essentiels pénètrent ces différentes couches et aident à consolider le ciment lipidique qui soude les cellules cornées ensemble. En agissant ainsi, ils renforcent non seulement le film hydrolipidique mais aussi le ciment intercellulaire, ce qui permet une meilleure circulation de l'eau intracellulaire vers la surface.



OBJECTIF

Évaluation clinique de l'efficacité cosmétique du traitement topique avec AP-104 après un traitement de 28 jours sur 20 volontaires humains. L'hydratation de la peau à l'aide du Corneometer® et la brillance de la peau à l'aide du Glossymeter® sont quantifiées à J0 et J28.

MÉTHODOLOGIE : 20 volontaires ont été soumis à un traitement topique de 28 jours avec AP-104 dans la zone faciale (deux fois par jour, matin et soir). Avant (Jour 0) et après 28 jours de traitement (Jour 28), l'hydratation de la peau a été mesurée à l'aide du dispositif **Corneometer®** et la luminosité de la peau a été quantifiée à l'aide du **Glossymeter®**. De plus, chaque volontaire a répondu à un questionnaire d'auto-évaluation à la fin du traitement. Toutes les données ont été analysées statistiquement.

RÉSULTATS

Les résultats ont montré que le traitement avec **AP-104 pendant 28 jours a augmenté de manière significative l'hydratation de $40,3 \pm 8,0$ %, en comparant chaque volontaire avec son propre contrôle au jour 0 .**

Ces résultats ont été confirmés de manière subjective par le biais du questionnaire d'auto-évaluation, avec des résultats positifs (acceptation supérieure à 80 %) pour la plupart des paramètres testés, y compris les attributs cosmétiques, l'efficacité cosmétique et l'opinion des consommateurs.

CONCLUSION

Le traitement topique in vivo avec AP-104 sur 20 volontaires présente une capacité d'hydratation, avec une augmentation significative ($40,3 \pm 8,0$ %) de l'hydratation cutanée après 28 jours d'application, en comparant chaque volontaire avec son propre contrôle au jour 0. En ce qui concerne la surveillance dermatologique, le produit AP-104 a montré une bonne compatibilité cutanée et peut revendiquer les mentions :

"Testé dermatologiquement", "Testé cliniquement" et "Test de tolérance".

Résultats d'efficacité

Les résultats ont montré que le traitement avec AP-104 pendant 28 jours sur 20 volontaires a augmenté de manière significative l'hydratation de la peau de $40,3 \pm 8,0$ %, en comparant chaque volontaire avec son propre témoin à J0, comme le montre la Figure 1.

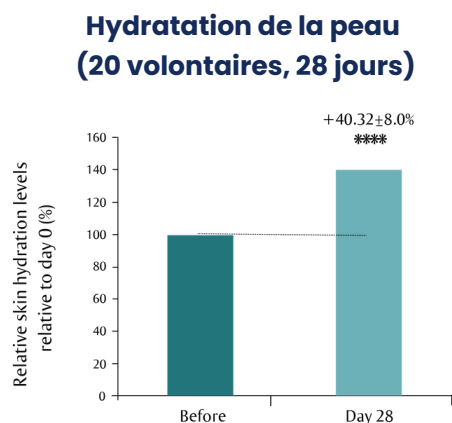


Figure 1. Représentation graphique des niveaux d'hydratation de la peau quantifiés à l'aide du Corneometer avant (Jour 0) et après (Jour 28) l'application topique d'AP-104 pendant 4 semaines sur 20 volontaires humains. La moyenne et l'erreur standard de la médiane (SEM) sont indiquées.

**** Représente une signification statistique avec une valeur $p < 0,0001$.

Discussion et conclusions

Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité cosmétique clinique du traitement topique avec AP-104 après un traitement de 28 jours sur 20 volontaires humains. L'hydratation de la peau a été mesurée à l'aide du Corneometer® et la brillance de la peau a été quantifiée à l'aide du Glossymeter® à J0 et J28.

Pour cela, 20 volontaires ont été soumis à un traitement topique de 28 jours avec AP-104 sur la zone faciale (deux fois par jour, matin et soir). Avant (Jour 0) et après 28 jours de traitement (Jour 28), l'hydratation de la peau a été mesurée à l'aide du dispositif Corneometer® et la luminosité de la peau a été quantifiée à l'aide du Glossymeter®. De plus, chaque volontaire a répondu à un questionnaire d'auto-évaluation à la fin du traitement. Toutes les données ont été analysées statistiquement.

Les résultats ont montré que le traitement avec AP-104 pendant 28 jours a augmenté de manière significative l'hydratation de $40,3 \pm 8,0$ %, en comparant chaque volontaire avec son propre témoin à Jour 0 (test t de Student apparié).

Ces résultats ont été confirmés de manière subjective par le biais du questionnaire d'auto-évaluation, avec des résultats positifs (acceptation de plus de 80 %) pour la plupart des paramètres testés, y compris les attributs cosmétiques, l'efficacité cosmétique et l'opinion des consommateurs.

En conclusion, le traitement topique in vivo avec AP-104 sur 20 volontaires démontre une capacité d'hydratation, avec une augmentation significative ($40,3 \pm 8,0$ %) de l'hydratation de la peau après 28 jours d'application, en comparant chaque volontaire avec son propre témoin à Jour 0.

En ce qui concerne la surveillance dermatologique, le produit AP-104 a montré une bonne compatibilité cutanée et peut revendiquer les mentions "Testé dermatologiquement", "Testé cliniquement" et "Testé en tolérance".

VOLONTAIRES

Le nombre de volontaires défini dans le protocole était suffisant pour évaluer l'efficacité du traitement. Le nombre de volontaires était de 20.

Les données des volontaires se trouvent en Annexe 1.

Aucun des volontaires n'a été exclu de l'étude par le chercheur. Aucun des volontaires n'a interrompu l'étude.

Le questionnaire d'auto-évaluation a été rempli en ligne par les 20 volontaires.

OBLIGATIONS DE L'ÉTUDE

Les obligations imposées aux volontaires étaient les suivantes :

- Ne pas appliquer d'autres traitements similaires (cosmétiques ou nutricosmétiques) à celui testé dans la zone expérimentale (visage) pendant la période de l'étude.
- Ne pas appliquer de traitements esthétiques (exfoliation, botox, peelings cliniques, acide hyaluronique, etc.) dans la zone expérimentale à partir de 3 mois avant le début de l'expérience.
- Respecter les conditions d'utilisation du traitement testé.
- Ne pas appliquer de produits auto-bronzants dans la zone expérimentale.
- Ne pas prendre de médicaments ou de compléments alimentaires contenant du bêta-carotène.
- Conserver les habitudes d'hygiène et/ou de maquillage.
- Ne pas suivre de traitement à base de vitamine A ou de ses dérivés (en cas de nécessité, exclusion de l'étude) à partir d'1 mois avant le début de l'expérience.
- Ne pas utiliser de maquillage dans la zone expérimentale (visage) pendant les jours de contrôle au centre de recherche.
- Ne pas faire de bains turcs ni de sauna pendant l'étude.
- Éviter une exposition intense au soleil (directement au soleil ou en studio de bronzage) pendant la période de l'étude.

CONSENTEMENT ÉCLAIRÉ

Un consentement éclairé a été obtenu de chaque volontaire avant le début de l'étude, décrivant les raisons de l'étude, les effets indésirables possibles, les risques associés et les avantages potentiels du traitement, ainsi que les limites de responsabilité. Les panélistes ont signé et daté le document de consentement éclairé pour indiquer leur autorisation de participer et reconnaître leur compréhension du contenu, avant le début de l'étude. Le modèle de consentement éclairé est présenté en Annexe 5.

ÉTHIQUE

Le protocole d'étude est conforme aux directives du Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs (SCCS). Il respecte toutes les normes internationales pour les études de recherche impliquant des sujets humains, les Bonnes pratiques cliniques (ICH-GCP) et l'Association médicale mondiale. Il a été mené conformément à la Déclaration d'Helsinki (1864), avec les amendements de Tokyo (1975), Venise (1983), Hong Kong (1989) et Séoul (2008).

VÉRIFICATION DE L'ACCEPTABILITÉ

Les sujets ont été invités à noter quotidiennement toute réaction observée et toute sensation d'inconfort ressentie. Un examen de la peau de la zone expérimentale à la lumière du jour standard a été effectué par le technicien responsable, les mêmes jours que les mesures techniques.

En plus des examens cliniques effectués pendant le traitement, chaque sujet a été interrogé par le technicien responsable sur les éventuelles sensations d'inconfort ressenties à la fin de l'étude.

CONTRÔLE DE LA CONSOMMATION

Un contrôle de la consommation a été effectué pour vérifier que les volontaires suivaient les instructions et appliquaient le traitement. Le contenant du produit a été pesé avant et après le traitement.



ANALYSE IN VITRO DE LA CAPACITÉ ANTIOXYDANTE ET PROTECTRICE DE OLÉOPINE APRÈS IRRADIATION HEV DANS LES KÉRATINOCYTES HUMAINS

RÉSUMÉ EXÉCUTIF

OBJECTIF

Analyse des effets antioxydants et protecteurs de l'Oleopine AP104, dans la lutte contre le stress oxydatif induit par la lumière visible à haute énergie (HEV), après un traitement de 24 heures sur les kératinocytes humains (HaCaT), à travers la quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Préalablement, les effets sur la viabilité cellulaire ont été évalués par un test MTT pour déterminer les concentrations non toxiques et les capacités de prolifération.

MÉTHODOLOGIE

Les cellules HaCaT ont été cultivées en présence d'Oleopine à des concentrations de 0,01 %, 0,1 % et 1 %, sélectionnées à partir d'un précédent essai (INF.767.12.04), pendant 24 heures. Après le traitement, les cellules ont été exposées à la lumière HEV pour induire le stress oxydatif et l'accumulation de ROS pendant 30 minutes (dose approximative de 120 J/cm²), et les effets du traitement sur ce processus ont été évalués. La concentration de ROS a été mesurée par spectrofluorimétrie dans les échantillons testés.

RÉSULTATS

Les résultats ont indiqué que l'irradiation HEV pendant 60 minutes a significativement augmenté les niveaux de ROS de $154,1 \pm 7,8$ fois, par rapport au groupe témoin non irradié. Lorsque les cellules ont été préalablement traitées avec l'Oleopine pendant 24 heures, les résultats ont montré que le traitement à des concentrations de 0,01 %, 0,1 % et 1 % a significativement réduit les niveaux de ROS de $28,4 \pm 5,6$ %, $30,4 \pm 4,8$ % et $23,6 \pm 4,7$ % respectivement, par rapport au témoin irradié.

CONCLUSION

Le traitement in vitro avec l'Oleopine AP104 pendant 24 heures sur les kératinocytes humains (HaCaT) présente des capacités antioxydantes et protectrices, en réduisant significativement les dommages induits par la HEV sous forme de diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Introduction

Le stress oxydatif est l'une des principales causes contribuant au processus de vieillissement. La production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) peut avoir différentes sources, principalement intrinsèques et extrinsèques, et les deux affectent les principales structures de la peau. Le rôle des radicaux libres dans les lésions tissulaires a fait l'objet de plusieurs études. Le superoxyde peut inactiver des enzymes spécifiques, activant ainsi la voie de peroxydation [Muller, 2000]. Sous des conditions de stress spécifiques, cette dernière réaction est prédominante, et la cellule subit le processus d'apoptose ou de mort cellulaire programmée. Le choc thermique est connu pour induire un stress oxydatif dans un processus lié au dysfonctionnement de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. La principale source de radicaux endogènes est représentée par les mitochondries, la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes [Han et al., 2001]. Néanmoins, plusieurs stimuli exogènes, tels que les rayonnements ionisants, la lumière UV, la fumée, les processus inflammatoires et certaines maladies humaines, provoquent également la production de radicaux libres. En particulier, en fonction de la gravité des dommages provoqués sur les membranes mitochondriales, la réponse déclenchée est différente.

Dans le cas de dommages par fuite, la chaîne électronique dans les membranes mitochondriales serait perturbée, réduisant la synthèse de l'ATP ; privant ainsi la cellule d'énergie. Dans les autres cas de dommages graves, les membranes mitochondriales et les enzymes oxydantes seront affectées, provoquant la libération de radicaux libres (ROS).

La peau humaine est exposée de manière répétée au rayonnement solaire, qui influence la fonction et la survie de nombreux types de cellules et est considérée comme le principal facteur causal dans l'induction du vieillissement cutané [Brenner and Hearing, 2008]. Plus spécifiquement, l'exposition aiguë de la peau humaine à l'irradiation UV provoque des coups de soleil, une pigmentation altérée, une inflammation, une suppression immunitaire et des lésions du tissu conjonctif dermique [Fisher et al., 2002; Fisher et al., 1997; Gilchrest and Yaar, 1992; Kripke, 1984]. L'exposition chronique à l'irradiation UV perturbe l'architecture normale de la peau et finit par causer un vieillissement cutané prématuré (photo-vieillissement). Environ 6 % du spectre solaire est constitué de rayonnement UV (200 - 400 nm), 52 % est lumière visible (400 - 760 nm) et les 42 % restants sont des radiations infrarouges (760 nm - 106 nm) [Ichihashi et al., 2009].

La lumière bleue ou la lumière visible à haute énergie (HEV) désigne les longueurs d'onde entre 390 et 500 nm [Dykas et al., 2004]. Elle est émise par un grand nombre de sources de lumière artificielle, telles que les LED bleues, et par la lumière directe du soleil. En raison de sa haute énergie, la HEV a une plus grande dispersion que d'autres longueurs d'onde du spectre visible et peut pénétrer les tissus animaux, comme le montre la Figure 1. Certaines études ont démontré que la lumière visible peut induire une dysfonction cellulaire et la mort cellulaire à la fois in vitro et in vivo, par accumulation de H₂O₂, entre autres [Jones et al., 1997 ; Peak and Peak, 1995 ; Tyrrell et al., 1994 ; Setlow and Woodhead, 1994]. De la même manière, des études ont montré que l'irradiation de cellules de mammifères par la lumière visible induit principalement des dommages cellulaires par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [Peak and Peak, 1989]. Des ROS tels que le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et l'oxygène singulet peuvent être produits lorsque la lumière visible excite les photosensibilisateurs cellulaires [Peak and Peak, 1990 ; Cunningham et al., 1985].

Il a également été démontré que le rayonnement visible affecte la récupération de la barrière de perméabilité épidermique.

Plus spécifiquement, la lumière bleue a retardé la récupération de la barrière cutanée par rapport au groupe témoin [Denda and Fuziwara, 2008].

De la même manière, l'exposition de cellules contenant de la lipofuscine à la lumière visible a provoqué une

augmentation des lésions de l'ADN mitochondrial et nucléaire par rapport aux cellules non pigmentées, ce qui signifie que la lumière visible peut provoquer une dysfonction cellulaire par l'action des espèces réactives de l'oxygène sur l'ADN et que cela peut contribuer au vieillissement cellulaire.

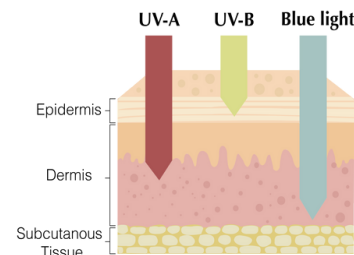


Figure 2. Représentation graphique de la capacité de pénétration des différentes radiations (UVC, UVB et HEV) dans la peau.

Bien que les mécanismes ne soient pas entièrement compris, il semble que la lumière à haute énergie visible (HEV) soit impliquée dans le photovieillissement humain. Pour ces raisons, dans cette étude, des kératinocytes humains (HaCaT) ont été exposés à la lumière HEV afin d'analyser la réponse des cellules au stress oxydatif induit et d'évaluer le potentiel de l'Oleopine AP104 .

Plateforme

Kératinocytes humains (ligne HaCaT).

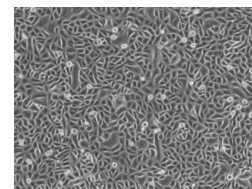


Figure 3. Image microscopique des kératinocytes humains en culture (ligne HaCaT), utilisés pendant l'étude.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Équipement analytique

Microscope, incubateur, logiciel d'analyse statistique, hotte à flux laminaire, micropipettes, pipettes, propipette, support, bloc thermique, vortex, centrifugeuse réfrigérée, irradiateur Luzchem LZC-420 (lampe HEV), système de détection multi-mode Glomax Discovery Promega, lecteur multi-mode Synergy H1 Hybrid, spectrophotomètre de lecture de plaques, plaques transparentes et noires de 96 puits adaptées à la culture cellulaire, consommables.

Réactifs

Eau distillée (Braun), DMEM, FBS, pénicilline, streptomycine, solution tampon phosphate (Sigma), solution de bleu trypan (Bio-Rad), DMSO (Sigma-Aldrich), poudre MTT (Invitrogen), trypsine (Sigma), éthanol (Sigma-Aldrich), kit de détection des ROS (Sigma Aldrich).

Procédure

Les cellules vivantes ont été dénombrées dans une chambre de Bürker sous le microscope. Les cellules HaCaT ont été cultivées pendant la nuit à une densité de 10 000 cellules/puits dans une plaque de 96 puits noire, dans un milieu de croissance. 24 heures plus tard, le milieu de culture a été retiré et remplacé par un nouveau milieu de culture contenant Oleopine à concentration de 0,01 %.

Après une période d'incubation de 24 heures, du PBS et un mélange maître de ROS ont été ajoutés dans tous les puits cultivés et les cellules ont été exposées à la lumière haute énergie visible (HEV) pendant 60 minutes (dose reçue d'environ 120 J/cm², à une longueur d'onde centrée à 420 nm). Les témoins non irradiés ont été incubés à 26°C pendant ce temps dans l'obscurité. 2 heures après l'ajout du mélange maître de ROS aux cellules, la quantité de ROS intracellulaire accumulée a été mesurée dans tous les échantillons. Les ROS intracellulaires accumulés ont réagi avec un capteur fluorogène localisé dans le cytoplasme, donnant lieu à un produit fluorométrique en quantités proportionnelles à la quantité de ROS présents. La quantification de la fluorescence a été mesurée à $\lambda_{\text{ex}} = 490$ / $\lambda_{\text{em}} = 525$. Les informations spectrales sur la lampe de radiation HEV sont présentées dans les annexes. 6 réplicats techniques par condition ont été utilisés. Toutes les données ont été analysées statistiquement à l'aide d'une ANOVA ordinaire à un facteur et du test t de Student non apparié. La signification statistique a été fixée à $p < 0,05$, avec un niveau de confiance de 95 %. Les résultats graphiques ont été représentés sous forme de Moyenne $\pm$ SEM (Erreur Standard de la Moyenne), analysés statistiquement en comparant le traitement vs le témoin, et l'échantillon irradié vs non irradié. Nous avons représenté les données sous deux formes de normalisation

Dans le premier processus de normalisation, le témoin non traité a été utilisé comme témoin de référence et les données ont défini l'efficacité du traitement par irradiation induisant les ROS. Dans le second cas, le témoin irradié a été utilisé comme témoin de référence pour détecter l'efficacité du composé dans la prévention de l'accumulation de ROS.

La formule utilisée pour analyser les données brutes et obtenir les données utilisées dans les graphiques était "X / M", où X est la valeur brute de l'absorbance et M est la moyenne du témoin de contrôle correspondant pour chaque répétition biologique propre.

Resultats

La capacité antioxydante et protectrice de Oleopine a été évaluée sur des kératinocytes humains en culture (ligne HaCaT), après traitement et irradiation avec la lumière visible à haute énergie (HEV), par le biais de la quantification du stress oxydatif sous forme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Des concentrations non toxiques ont été sélectionnées à partir d'un précédent essai (INF.767.12.04). Les données de fluorescence recueillies lors de l'essai ont été analysées selon la méthode décrite dans la section "Procédure". Les valeurs moyennes des réplicats dans le témoin (non traité, non irradié) et le Contrôle + HEV (non traité, irradié) ont été obtenues et ces valeurs ont été utilisées pour normaliser chaque mesure de fluorescence des réplicats dans les échantillons et conditions correspondants.

Un graphique à barres a été généré pour représenter graphiquement l'accumulation de ROS dans chacune des conditions testées. Une analyse statistique a été effectuée pour déterminer la signification des différences dans le niveau de ROS détecté entre les échantillons et les traitements.

Les résultats ont indiqué que l'irradiation HEV pendant 60 minutes a induit de manière significative des niveaux de ROS multipliés par $154,1 \pm 7,8$ fois, par rapport au groupe témoin non irradié, comme illustré dans la Figure 4.

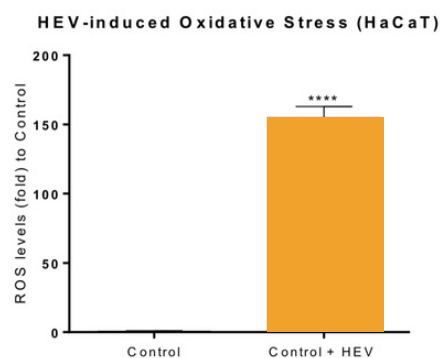


Figure 4. Graphiques à barres représentant l'accumulation de ROS dans le groupe non irradié témoin et le groupe irradié HEV dans les kératinocytes humains (ligne HaCaT), après 60 minutes d'irradiation. **** Représente une signification statistique avec une valeur de $p < 0.0001$.

Lorsque les cellules ont été préalablement traitées avec de l'Oleopine pendant 24 heures, les résultats ont indiqué que le traitement à concentrations de 0,01 %, a significativement réduit les niveaux de ROS de $28,4 \pm 5,6$ %, , respectivement, par rapport au témoin irradié.

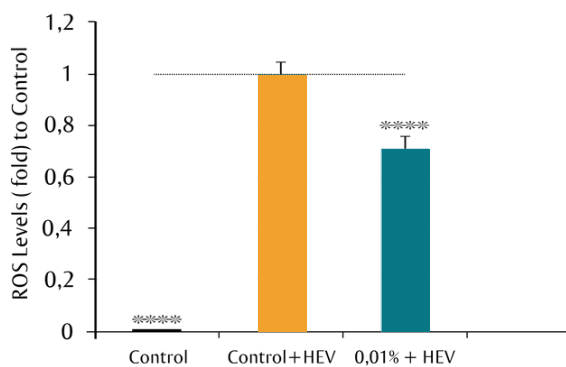


Figure 5. Graphiques à barres représentant l'accumulation de ROS dans les échantillons traités avec l'Oleopine à des concentrations de 0,01 %, 0,1 % et 1 % pendant 24 heures, et irradiés avec HEV pendant 30 minutes, dans les kératinocytes HaCaT, normalisés au groupe irradié. **** Représente une signification statistique avec une valeur de $p < 0,0001$.

Discussion et Conclusions

La peau humaine est exposée de manière répétée aux rayonnements solaires qui influencent la fonction et la survie de nombreux types cellulaires et est considérée comme le principal facteur causal de l'induction du vieillissement cutané. Environ 6 % du spectre solaire est constitué de rayonnement UV (200 - 400 nm), 52 % est constitué de lumière visible (400 - 760 nm) et les 42 % restants correspondent au rayonnement infrarouge (760 nm - 106 nm).

La lumière bleue ou la lumière visible à haute énergie (HEV) fait référence aux longueurs d'onde comprises entre 390 et 500 nm. Elle est émise par un grand nombre de sources lumineuses artificielles, telles que les LED bleues, ainsi que par la lumière directe du soleil. En raison de son énergie élevée, la HEV présente une dispersion plus importante que d'autres longueurs d'onde du spectre visible et peut pénétrer les tissus animaux. Certaines études ont démontré que la lumière visible peut induire un dysfonctionnement cellulaire et la mort cellulaire à la fois in vitro et in vivo, par l'accumulation de H_2O_2 , entre autres. De la même manière, des études ont montré que l'irradiation de cellules de mammifères par la lumière visible induit principalement des dommages cellulaires par le biais des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Des ROS tels que le radical hydroxyle, l'anion superoxyde et l'oxygène singulet peuvent être produits lorsque la lumière visible excite des photosensibilisateurs cellulaires.

Bien que les mécanismes ne soient pas entièrement compris, il semble que la lumière visible à haute énergie (HEV) soit impliquée dans le photo-vieillessement humain. Pour ces raisons, dans cette étude, des kératinocytes humains (ligne HaCaT) ont été exposés à la lumière HEV, afin d'étudier la réponse des cellules au stress oxydatif induit et de tester le potentiel de l'Oleopine pour prévenir l'accumulation de ROS. Les résultats ont indiqué que l'irradiation HEV pendant 60 minutes a induit de manière significative des niveaux de ROS multipliés par $154,1 \pm 7,8$, par rapport au groupe témoin non irradié.

Lorsque les cellules ont été préalablement traitées avec de l'Oleopine pendant 24 heures, les résultats ont montré que le traitement à concentration de 0,01 % a significativement réduit les niveaux de ROS de $28,4 \pm 5,6$ %, par rapport au témoin irradié.

En conclusion, le traitement in vitro avec l'Oleopine pendant 24 heures dans des kératinocytes humains (ligne HaCaT) présente des capacités antioxydantes et protectrices, en offrant une protection significative contre les dommages induits par la HEV, sous forme de diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Résultats

La capacité antioxydante et protectrice de l'Oleopine et de l'Oleodrum a été évaluée sur des kératinocytes humains en culture (ligne HaCaT), après traitement et irradiation avec la lumière ultraviolette A (UVA), en quantifiant le stress oxydatif sous forme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Des concentrations non toxiques ont été sélectionnées à partir d'un essai précédent (INF.767.12.04).

Les données de fluorescence recueillies lors de l'essai ont été analysées selon la méthode décrite dans la section "Procédure". Les valeurs moyennes pour les réplicats dans le groupe témoin (non traité, non irradié) et le groupe Contrôle + UVA (non traité, irradié) ont été obtenues et ces valeurs ont été utilisées pour normaliser chaque mesure de fluorescence des réplicats dans les échantillons et les conditions correspondantes.

Un graphique en barres a été généré pour représenter graphiquement l'accumulation de ROS dans chacune des conditions testées. Une analyse statistique a été réalisée pour déterminer la signification des différences dans le niveau de ROS détecté entre les échantillons et les traitements.

Les résultats ont indiqué que l'irradiation UVA pendant 30 minutes a significativement induit une augmentation des niveaux de ROS de $75,1 \pm 3,0$ fois par rapport au groupe témoin non irradié, comme illustré dans la **Figure 6**.

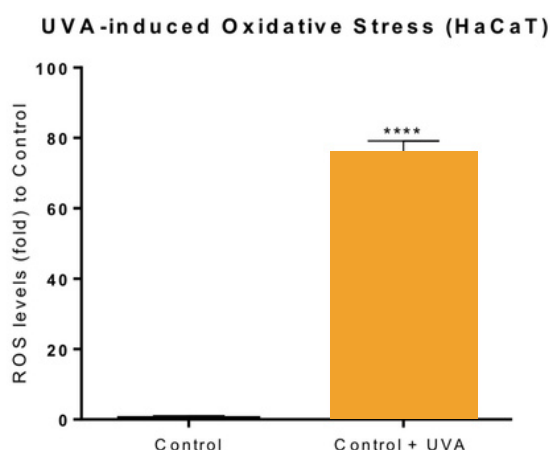


Figure 6. Graphiques en barres représentant l'accumulation de ROS dans le groupe témoin sans irradiation et le groupe irradié aux UVA dans les kératinocytes humains (ligne HaCaT), après 30 minutes d'irradiation. **** Représente une signification statistique avec une valeur $p < 0.0001$.

Résultats

Lorsque les cellules étaient préalablement traitées avec Oleopine pendant 24 heures, les résultats ont indiqué que le traitement à concentrations de 0,01 %, a significativement réduit les niveaux de ROS de $22,0 \pm 3,6$ %, par rapport au témoin irradié comme indiqué dans les **Figures 7**.

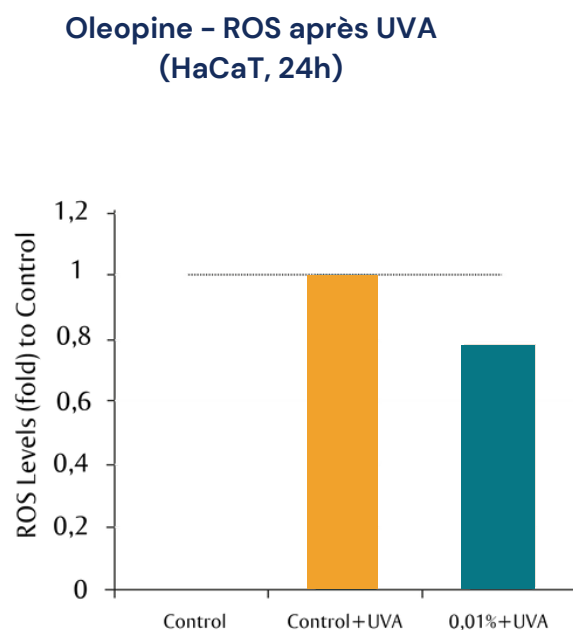


Figure 7. Graphiques à barres représentant l'accumulation de ROS dans les échantillons traités avec Oleopine a concentration de 0,01 %, pendant 24 heures, et une irradiation UVA pendant 30 minutes, dans les kératinocytes HaCaT, normalisés au groupe irradié. ** Représente une signification statistique avec une valeur de $p < 0,01$. *** Représente une signification statistique avec une valeur de $p < 0,001$. **** Représente une signification statistique avec une valeur de $p < 0,0001$.

Discussion et Conclusions

La peau humaine est exposée de manière répétée aux radiations ultraviolettes (UV) qui influencent la fonction et la survie de nombreux types de cellules, et est considérée comme le principal facteur causatif de l'induction du vieillissement cutané. L'exposition aiguë de la peau humaine aux radiations UV provoque des coups de soleil, une pigmentation altérée, une inflammation, une suppression immunitaire et des lésions du tissu conjonctif cutané. Une exposition chronique aux radiations UV perturbe l'architecture normale de la peau et entraîne finalement un vieillissement prématuré de la peau (photo-vieillessement). De la même manière, le stress oxydatif est l'une des principales causes contribuant au processus de vieillissement.

Dans ce test, les kératinocytes humains (lignée HaCaT) ont été exposés à la lumière UVA afin d'étudier la réponse des cellules au stress oxydatif induit et de tester le potentiel d'Oleopine AP104 pour prévenir l'accumulation de ROS.

Les effets sur la viabilité cellulaire ont été évalués au préalable par un test MTT pour déterminer les concentrations non toxiques et efficaces.

Les résultats ont indiqué que l'irradiation UVA pendant 30 minutes a induit de manière significative une augmentation des niveaux de ROS de $75,1 \pm 3,0$ fois par rapport au groupe témoin non irradié.

Lorsque les cellules étaient préalablement traitées avec Oleopine pendant 24 heures, les résultats ont montré que le traitement a concentration de 0,01 %, a significativement réduit le niveaux de ROS de $22,0 \pm 3,6$ %, par rapport au groupe irradié.

En conclusion, le traitement in vitro avec Oleopine pendant 24 heures dans les kératinocytes humains (lignée HaCaT) montre des capacités antioxydantes et protectrices, en offrant une protection significative contre les dommages induits par l'UVA, sous forme de diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Enregistrement et réglementation

Le rapport final, les données brutes et le protocole de l'essai ont été sauvegardés au format informatique, ainsi qu'une copie papier.

L'ensemble du processus lié à cet essai a été réalisé dans le cadre du Système de Gestion de la Qualité UNE-EN-ISO 9001/2015.

Conformément à l'article 20 du Règlement (CE) n° 1223/2009 relatif aux produits cosmétiques (CPR), le Règlement de la Commission (UE) n° 655/2013 a établi des critères communs harmonisés de l'UE afin d'évaluer si l'utilisation d'une revendication est justifiée ou non.

Références

- [1] Denda M, and Fuziwara S, Visible Radiation Affects Epidermal Permeability Barrier Recovery: Selective Effects of Red and Blue Light. J Invest Dermatol 128 (5):1335–6 (2008).
- [2] Burger P, Plainfosse H, and Fernandez X, Techniques d'évaluation de l'activité anti-lumière bleue Actifs cosmétiques anti-lumière bleue. Techniques de l'ingénieur (2020).
- [3] Fisher G, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. Arch Dermatol 138:1462–1470 (2002).
- [4] Oresajo C, Yatskayer M, Galdi A, Foltis P, Pillai S, Complementary effects of antioxidants and sunscreens in reducing UV-induced skin damage as demonstrated by skin biomarker expression. J Cosmet Laser Ther 12(3):157–62 (2010).
- [5] Maini S, Fahlman BM, Krol ES, Flavonols protect against UV radiation-induced thymine dimer formation in an artificial skin mimic. J Pharm Sci 18(4):600–15 (2015).
- [6] Woelfe U et al., Reactive Molecule Species and Antioxidative Mechanisms in Normal Skin and Skin Aging. Skin Pharmacol Physiol 27(6):316–332 (2014).
- [7] Han D, Williams E, Cadenas E, Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. Biochem J 353:411–6 (2001).
- [8] Muller F, The nature and mechanism of superoxide production by the electron transport chain: Its relevance to aging. J Am Aging Assoc . 23(4):227–53 (2004).
- [9] Pensé-Lhéritier A.-M. ; Evaluation des produits cosmétiques: L'objectivation. Lavoisier, Paris (2016).
- [10] Masson F. ; Acide hyaluronique et hydratation cutanée. Annales de dermatologie, 137, supplément 1, S23–S25 (2010).
- [11] Peyrefitte G. ; Biologie de la peau, 3ème éd. Cahiers d'esthétique cosmétique, SIMEP éd, Paris, 135p (1997).