# RAPPORT D'ETUDE

STUDY REPORT

Version finale du 17 Mars 2009
Final version: March 17, 2009

# EVALUATION IN VITRO DU POTENTIEL DEPIGMENTANT D'UNE PREPARATION COSMETIQUE SUR EPIDERMES HUMAINS PIGMENTES RECONSTRUITS IN VITRO.

# IN VITRO ASSESSMENT OF DEPIGMENTING EFFECT OF A COSMETIC FINISHED PRODUCT ON HUMAN RECONSTITUTED TANNED EPIDERMIS.

REFERENCE DEVIS MMVIII-572

**RAPPORT :** **MEL-EPI 08.922**
***(REPORT)***

**PRODUIT ETUDIE :** **MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT LOT 106 18 08 8**
***(TEST PRODUCT)***

**DEMANDEUR DE L'ETUDE :**
***(SPONSOR OF THE STUDY)***

**SETALG**
PRESQU'ÎLE DE PEN LAN
22610 PLEUBIAN

**EXPERIMENTATEUR :**
***(RESEARCH LABORATORY)***

**BIO-HC**
PARC d'ACTIVITES DE MAGELLAN
14 RUE CLAUDE CHAPPE
33600 PESSAC
FRANCE

# SOMMAIRE - *CONTENTS*

**1. INTRODUCTION - *INTRODUCTION* 3**

**2. MATERIEL ET METHODES - *MATERIAL AND METHODS* 3**

**2.1 PRODUIT ETUDIE - *TEST PRODUCT* 3**
**2.2 DEROULEMENT DE L'ETUDE - *STUDY DEVELOPMENT* 3**
**2.2.1 EPIDERMES HUMAINS PIGMENTES - *HUMAN TANNED EPIDERMIS* 3**
**2.2.2 ACTIVITE DEPIGMENTANTE - *DEPIGMENTING EFFECT* 4**

**3. RESULTATS - *RESULTS* 5**

**3.1 ACCEPTABILITE CUTANEE DU PRODUIT - *CUTANEOUS ACCEPTABILITY OF PRODUCT* 5**
**3.2 ACTIVITE DEPIGMENTANTE - *DEPIGMENTING EFFECT OF TEST PRODUCT* 6**

**4. ARCHIVAGE - *ARCHIVES* 8**

**5. CONCLUSION - *CONCLUSION* 8**

**ANNEXE *(APPENDIX)* : DONNEES BRUTES - TABLEAUX ET FIGURES *(DATA - TABLES AND FIGURES)* 3 pages**

# 1. INTRODUCTION - *INTRODUCTION*

L'objet de l'étude était d'évaluer le potentiel dépigmentant d'un produit cosmétique fini sur un modèle d'épiderme humain pigmenté reconstruit *in vitro*. Une approche expérimentale basée sur la mesure du taux de mélanine et de la coloration des épidermes après traitement topique a été proposée.

*The purpose of the study was to assess the whitening potential of a cosmetic finished product using reconstructed human tanned epidermis. An in vitro experimental approach based on the measurement of melanin content, and coloration of tissues after topical treatment with the test product, was proposed.*

# 2. MATERIEL ET METHODES - *MATERIAL AND METHODS*

## 2.1 PRODUIT ETUDIE - *TEST PRODUCT*

Afin d'évaluer l'activité dépigmentante du produit identifié [**MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT LOT 106 18 08 8**], la Société **SETALG**, PRESQU'ILE DE PEN LAN, 22610 PLEUBIAN, nous a adressé, le 04 Décembre 2008, un échantillon dont les caractéristiques étaient les suivantes :

- Récipient : sachet plastique
- Forme : poudre
- Couleur : blanc
- Quantité : 6 x 30 g
- pH : -

Il a été identifié sous le code BIO-HC : **08.922**

Les résultats exposés ci-après ne concernent que l'échantillon fourni par le commanditaire, ce dernier demeure responsable de l'identité entre cet échantillon et le(s) produit(s) mis sur le marché.

*In order to assess the "depigmenting" effect of the test product labeled [**MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT LOT 106 18 08 8**], a sample sent by the Company **SETALG**, PRESQU'ILE DE PEN LAN, 22610 PLEUBIAN, was received on December 04, 2008. Its characteristics were as follows :*

- *Container : plastic bag*
- *Aspect : powder*
- *Color : white*
- *Quantity : 6 x 30 g*
- *pH : -*

*It was identified under the number : **08.922***

*The results presented concern only the sample supplied by the sponsor of the study, the concordance between the test sample and the final commercial product(s) remains on his own responsibility.*

## 2.2 DEROULEMENT DE L'ETUDE - *STUDY DEVELOPMENT*

L'étude a été réalisée, entre le 06/01/2009 et le 11/02/2009 selon le protocole expérimental décrit ci-après.

*The study was performed between 01/06/2009 and 02/11/2009 according to the experimental protocol described below.*

### 2.2.1 EPIDERMES HUMAINS PIGMENTES - *HUMAN TANNED EPIDERMIS*

L'étude a été réalisée sur des épidermes humains pigmentés reconstitués *in vitro* fournis par les Laboratoires SKINETHIC™. Les principales caractéristiques de ces épidermes pigmentés reconstruits *in vitro* (RHTEps) ont été précédemment décrites[•]. Ces tissus sont obtenus après 11 jours de culture émergée (interphase air-liquide) de kératinocytes humains normaux en présence de mélanocytes humains normaux (phototype VI) ensemencés sur des filtres en polycarbonate de 0.63 $cm^2$.

*The study was performed on reconstructed human tanned epidermis (RHTEps) supplied by SKINETHIC™ laboratories. The main characteristics of this model have already been described elsewhere[•]. In brief, a fully differentiated epithelium having the features of the human tanned epidermis was obtained by co-culturing normal human epidermal keratinocytes in the presence of melanocytes (phototype VI) for 11 days in serum-free medium, on a microporous polycarbonate filter at the air-liquid interface.*

[•] Rosdy M., et al. British J. Dermatol., 129, 227-234, 1993.

### 2.2.2 ACTIVITE DEPIGMENTANTE - *DEPIGMENTING EFFECT*

Le test repose sur l'évaluation du degré de pigmentation des épidermes SKINETHIC™ après traitement avec le(s) produit(s) à l'essai. La méthode est basée sur la mesure du taux de mélanine et de la coloration des tissus. Ces deux paramètres sont évalués sur des épidermes pigmentés témoins et sur des épidermes traités.

Dès réception, les épidermes sont transférés dans des plaques 6 puits contenant du milieu de croissance SKINETHIC (1ml/puits) et placés à l'incubateur à 37°C, 5% $CO_2$ saturé d'humidité, pendant 3-4 heures avant de procéder au traitement des tissus. Après incubation, le milieu de croissance est éliminé et remplacé par du milieu neuf. Le produit à l'étude est appliqué, à raison de 5 mg/cm$^2$, directement à la surface des épidermes : 2.5 µl de produit sont déposés à l'aide d'une micropipette et étalés, sur la surface du stratum corneum, à l'aide d'un applicateur. Les tissus sont ensuite remis à incuber à 37°C, en étuve air-$CO_2$. La formule-test est appliquée à J0, J1, J2, J3, J6 et à J7.
A la fin du traitement (J8), les paramètres (taux de mélanine et coloration des tissus) sont analysés.

- **Coloration des épidermes**

La couleur des épidermes est mesurée à J0 (avant application des produits) et 24h après la dernière application, à l'aide d'un chromamètre Minolta CR 200. Cet appareil convertit les couleurs situées dans la plage de perception humaine en un code numérique composé de trois paramètres : L* qui indique la clarté et a* et b* qui sont les coordonnées de chromaticité. a* et b* indiquent les sens des couleurs : +a* va vers le rouge, -a* vers le vert, +b* va vers le jaune et -b* vers le bleu. Les paramètres L*, a* et b* sont mesurés sur chaque épidermes. Les mesures sont réalisées en triplicate et les valeurs moyennes de chaque paramètre sont calculées. L'angle Typologique Individuel (ITA°) qui définit le degré de pigmentation de la peau (plus l'ITA° est faible, plus la peau est pigmentée) a été calculé selon la formule : ITA° = [Arc tan (L* - 50)/b*] x 180/π

- **Taux de Mélanine**

A la fin de l'essai, les épidermes sont détachés de leur support à l'aide d'un scalpel. Les tissus sont mis à chauffer pendant 45-60 minutes à 100°C, dans du SOLVABLE™. Après refroidissement des extraits et centrifugation, des aliquots (100µl) sont prélevés et déposés dans une plaque 96 puits. L'absorbance des solutions est lue à 405nm à l'aide d'un lecteur de microplaque. Parallèlement, une gamme étalon construite à l'aide de mélanine synthétique (Sigma) et mise à incuber à 100°C pendant le même laps de temps que les extraits cellulaires, permet de transformer les densités optiques ($D.O_{405nm}$) en Mélanine (µg/ml).

*The assay is based on the measurement of melanin content of RHTEps tissues, and on the evaluation of epidermis color after treatment of epidermis with the test product(s). The two parameters (melanin content and skin color) are evaluated on control and treated RHTEps after repeated topical applications of the test product(s).*

*Upon arrival, the inserts containing RHTEp tissues are transferred in 6-well culture plates filled with SKINETHIC growth medium (1ml/well), and placed, for 3-4 hours, in the incubator at 37°C in a humidified atmosphere with 5% $CO_2$ prior to testing. After incubation, the medium underneath tissues was replaced by fresh medium The product to be tested was applied topically at 5 mg/cm$^2$ onto the epidermis, using an automatic pipette: 2.5 µl of tested product were deposited with a micropipette and spread onto the surface of stratum corneum using an applicator. The tissues were consequently incubated, at 37°C with a 5% $CO_2$ atmosphere. The test product was applied daily from Day 0 to Day 3 and at day 6 and day 7 (i.e 6 applications).*
*At the end of the treatment period (Day 8), skin coloration and melanin content were analyzed.*

- ***Epidermis coloration***

*Epidermis color measurement is performed before starting treatment (Day 0) and 24 hours after the last application of the test product (Day 8). The coloration is quantified with a chromameter CR-200 Minolta, which converts colors located within the range perceived by humans to a digitized code composed of three parameters L* for relative lightness (from dark to pale), a* for the balance between red (+a*) and green (-a*), and b* for the balance between yellow (+b*) and blue (-b*). The L*, a* and b* values of the three-dimensional space defined by the CIE are registered on each epidermis. The measurements are performed in triplicate, and the mean values of L*, a* and b* are calculated. The Individual Typology Angle (ITA°) which defines the degree of skin pigmentation (darker skins have lower ITA°) is calculated as follows: ITA° = [Arc tan (L* - 50)/b*] x 180/π*

- ***Melanin content***

*For each tested product or controls, at the end of the test period, the cultures were removed from the polycarbonate insert by cutting out the filter on which the tissues were grown, with a sharp scalpel. Each filter was plunged into SOLVABLE™ and heated at 100 degrees Celsius for 45-60 minutes. After cooling and centrifugation, aliquots (100 µl) were added into 96-well microplate. Optical density ($O.D_{405}$) is recorded at 405 nm with a microplate reader. Concurrently, synthetic melanin standards (Sigma) are incubated in the same conditions. This standard curve allows the transformation of the $O.D_{405nm}$ into Melanin Unit (µg/ml).*

# 3. RESULTATS - *RESULTS*

## 3.1 ACCEPTABILITE CUTANEE DU PRODUIT - *CUTANEOUS ACCEPTABILITY OF PRODUCT*

L'essai a été réalisé sur des épidermes EPISKIN non pigmentés fournis par SKINETHIC™ (Lot N° 09-EPI-001, surface 1.07 $cm^2$) afin d'évaluer l'acceptabilité cutanée du produit [08.922].
La viabilité des tissus a été évaluée par un test MTT.

La préparation-test [08.922] a été préparé au laboratoire par mélange de 3 g de poudre [08.922] avec 9 g d'eau distillée. 5.35 µl de la préparation-test ont été appliqués à la surface des épidermes.

- Traitement "48h - 2 applications" : application du produit à $J_0$ et $J_1$. Incubation des tissus à 37°C (48h). Test MTT à $J_{+2}$.

*Les données sont consignées dans le tableau 1.*
Le tableau suivant regroupe les résultats.

*The assay was performed on un-pigmented EPISKIN epidermis (1.07 $cm^2$ tissues, Batch n° 09-EPI-001) supplied by SKINETHIC™ to evaluate the cutaneous acceptability of the product [08.922].*
*Viability of tissues was assessed by using the MTT assay.*

*The test-formulation was prepared by mixing 3g of test powder [08.922] with 9 g of distilled water. 5.35µl of the test-formulation were applied directly to the surface of the stratum corneum.*

- *Treatment "48h - 2 applications" : application of test product at $D_0$ and $D_1$. Incubation at 37°C (48h). MTT test at $D_{+2}$.*

*Raw data are collected in table 1 (appendix).*
*Results are collected in the following table.*

| | TEMOIN (CONTROL) | TRAITE [08.922] |
|---|---|---|
| D.O (moyenne)<br>St. Dev. | 1.473<br>0.085 | 0.085<br>0.041 |
| **Viabilité (Viability)** | ***100%*** | ***83%*** |

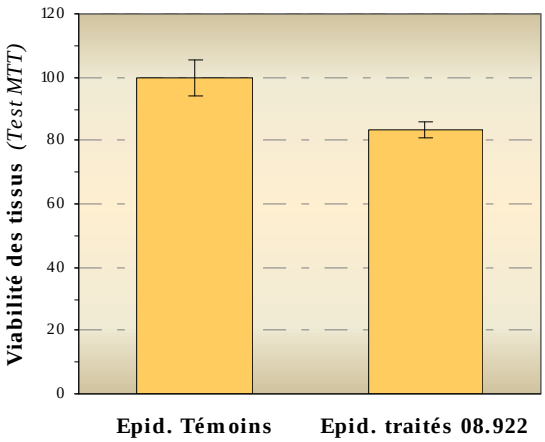



Fig. 1. Viabilité des épidermes après application topique de [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT]

*Fig.1. Viability of epidermis after topical application of [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT]*

Une très légère diminution de la viabilité des épidermes a été enregistrée après traitement des tissus avec le produit [08.922] (Fig 1). La réponse MTT est réduite de 17%, après 48h de contact.

Ces résultats indiquent une bonne acceptabilité cutanée de la préparation-test.

*The epidermis responded to the product application by a slight decrease in tissue viability (Fig. 1). The tissue MTT response was reduced by 17% after 48h exposure.*

*These results indicate a good cutaneous acceptability of the test product.*

## 3.2 ACTIVITE DEPIGMENTANTE - *DEPIGMENTING EFFECT OF TEST PRODUCT*

L'essai a été réalisé sur des épidermes pigmentés SKINETHIC™ (lot n° 09 022M 0108, surface 0.5 $cm^2$) répartis en 3 lots (3 épidermes/lot) :

- Lot [Témoin] : épidermes non traités
- Lot [08.922] : épidermes traités avec [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT]
- Lot [Contrôle Positif] : épidermes traités avec MELANEX® TRIO Crème.

Les produits testés ont été appliqués, tels quels, à raison de 5mg/$cm^2$, sur le *stratum corneum* des épidermes. Les formules-tests ont été appliquées à J0, J1, J2, J3, J6 et J7. Les paramètres analysés (coloration des épidermes, taux de mélanine) ont été mesurés à J8 (après 6 applications).

▪ **TAUX DE MELANINE**

*Les données sont consignées dans le tableau II.*

Les taux de mélanine (exprimé en µg/ml d'extrait) ont été mesurés dans chaque lot expérimental (n=3). L'activité dépigmentante (A.D) a été calculée selon :

*The assay was performed on SKINETHIC™ RHTEps (Batch n° 09 022M 0108, surface 0.5 $cm^2$) divided into 3 experimental groups (3 tissues/group) :*

- *[Control] group : untreated epidermis.*
- *[08.922] Treated group : epidermis treated with [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT]*
- *[Positive Control] group : epidermis treated with MELANEX® TRIO cream.*

*The tested products were applied, as supplied, at 5mg/$cm^2$, onto the stratum corneum of epidermis. The test-formulations were applied topically onto RHTEps at D0, D1, D2, D3, D6 and D7. The parameters (skin coloration, melanin content) were measured at D8 (i.e. after 6 applications).*

▪ ***MELANIN CONTENT***

Raw data are collected in table II (appendix).

*Melanin content (expressed in µg melanin per ml of tissue extract) were calculated in each experimental group (n=3). The depigmenting activity (D.A) was calculated as follow:*

$$\text{A.D } (D.A)\ (\%) = [\ Mel_{\text{Témoin } (Control)} - Mel_{\text{Traité } (Treated)} / Mel_{\text{Témoin } (Control)}\ ] \times 100$$

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des résultats du dosage de la mélanine après traitement des épidermes.

*Melanin content of RHTEps after treatment with the different tested products, are collected in the following table.*

| | **Mélanine** (µg/ml) ***Melanin*** *(µg/ml)* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Moyenne *Mean* | +/- | Ecart-type *St. Dev* | **A.D** (%) ***D.A*** *(%)* |
| **Témoin** *(Control)* | **561.79** | +/- | 18.80 | - |
| **Traité [MELANEX TRIO]** | **251.22** | +/- | 26.11 | **55%** |
| **Traité [08.922]** | **404.10** | +/- | 8.20 | **28%** |

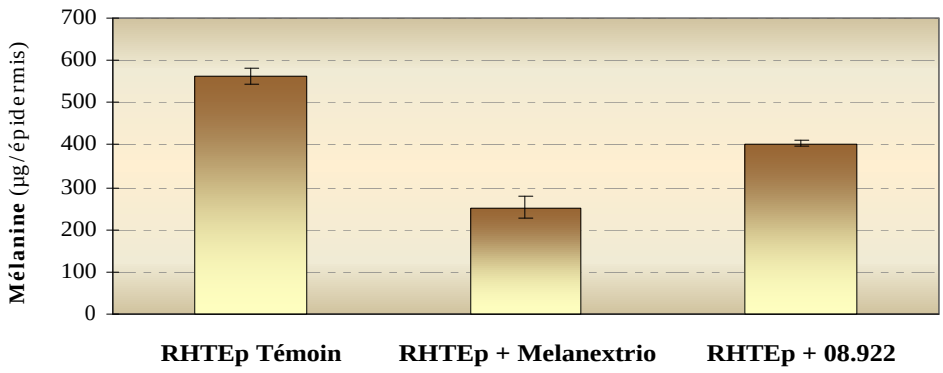



Fig. 2. Effet de [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT] sur la mélanine.

*Fig.2. Effect of [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT] on melanin content*

**EPIDERMES TRAITES AVEC MELANEX TRIO :**

Le traitement des tissus par la préparation [MELANEX TRIO] se traduit par une importante diminution du taux de mélanine. Comparativement aux épidermes témoins, le taux de mélanine est diminué de 55% ($p \leq 0.01$, test t de Student). Ce résultat confirme la bonne réactivité des tissus mis en œuvre dans l'essai.

**EPIDERMES TRAITES AVEC [08.922]:**

La formule [08.922] manifeste une nette activité dépigmentante puisque le traitement des épidermes se traduit par une diminution de 28% du taux de mélanine. Cet effet du produit [08.922] vis-à-vis de la mélanine s'est révélé statistiquement significatif ($p \leq 0.01$, test t de Student).

▪ **COLORATION DES EPIDERMES**

*Les données sont consignées dans le tableau III.*

Le tableau ci-après regroupe les valeurs d'ITA° enregistrées avant (J0) et après traitement (J8).

***IN [MELANEX TRIO] TREATED EPIDERMIS :***

*The treatment of RHTEps with the preparation [MELANEX TRIO] led to a significant decrease in melanin content. Compared with control, melanin level was decreased by 55% after topical application (Student's t test, $p \leq 0.01$). This result confirms the good reactivity of the tissues all over the experiment duration.*

***IN [08.922] TREATED EPIDERMIS :***

*Topical application of the test product [08.922] reduced melanin content by 28%, indicating that this test formulation has a significant depigmenting effect. The difference proved to be statistically significant (Student's t test, $p \leq 0.01$), comparatively to the control.*

▪ ***EPIDERMIS COLOR***

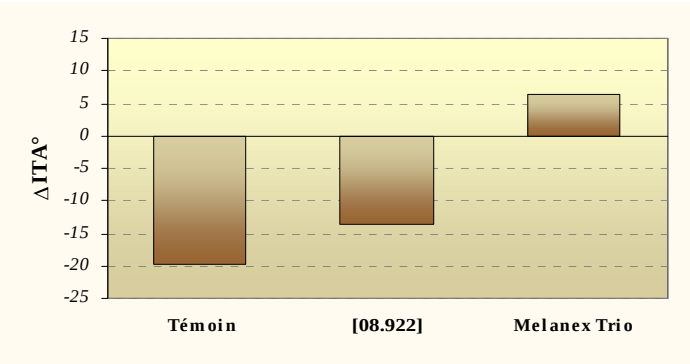
Raw data are collected in table III (appendix).

*ITA° recorded before (D0) and after treatment (D8) are collected in the following table.*

| | ITA° - J0 | ITA° - J8 | ΔITA° |
|---|---|---|---|
| [TÉMOIN] | -46.90 +/- 3.11 | -66.65 +/- 2.09 | **-19.75** |
| [MélanexTrio] | -50.48 +/- 2.21 | -44.05 +/- 4.19 | **+6.43** |
| [Traité 08.922] | -46.85 +/- 2.66 | -60.37 +/- 1.12 | **-13.51** |

La figure ci-dessous illustre les variations de ITA° [$\Delta ITA° = ITA°(J_{fin}) - ITA°(J_0)$] dans les différents lots.

*The following figure illustrated the variation of ITA° values [$\Delta ITA° = ITA°(D_{end}) - ITA°(D_0)$] in RHTEps.*




**Au niveau du lot [Témoin]:**

La coloration des épidermes non traités mesurée à J8 apparaît supérieure à celle mesurée à J0 indiquant que les tissus ont conservé une bonne activité de synthèse de la mélanine durant l'essai.

**Au niveau du lot [MELANEX TRIO]:**

La valeur moyenne de l'angle typologique des tissus traités avec la formule [MELANEX TRIO] (ΔITA°=+6.43) est nettement supérieure à celle des tissus Témoins (ΔITA°=-19.75) ce qui confirme l'effet éclaircissant de la formule [MELANEX TRIO]

***In [Control] group :***

*The darkness of RHTEps increased with time. The ITA° value follows the order Day 8 < Day 0, confirming the good melanin synthesis activity of tissues all over the experiment duration.*

***In [MELANEX TRIO] group :***

*The variation in typology angle of reconstructs treated with [MELANEX TRIO] (ΔITA°=+6.43) was markedly higher than that of control (ΔITA°=-19.75) indicating that the tested formulation demonstrates a whitening effect.*

**Au niveau du lot [08.922]**:
La variation de l'angle typologique des tissus traités avec la formule [08.922] (ΔITA°=-13.51) est légèrement supérieure à celui des épidermes Témoins (ΔITA°=-19.75) ce qui indique que la coloration des tissus traités est plus claire que celle des tissus témoins.
Il convient de noter que les résultats chromamétriques concordent avec le dosage de mélanine et avec l'observation mascroscopique des tissus.

***In [08.922] group*** *:*
*The variation in typology angle of tissues treated with the tested product [08.922] (ΔITA°=-13.51) appeared slightly higher than that of control tissues (ΔITA°=-19.75). These finding suggest that treated epidermis should appear more pale than untreated tissues.*
*It is noteworthy that these chromametric results are globally in concordance with melanin analysis and with direct macroscopic observation of the tissues.*

## 4. ARCHIVAGE - *ARCHIVES*

Toutes les données relatives à cette étude sont archivées sous la référence **MEL-EPI 08.922**.

*All the documents related to this study are stored under the reference **MEL-EPI 08.922.***

## 5. CONCLUSION - *CONCLUSION*

Le potentiel dépigmentant de la préparation [**MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT LOT 106 18 08 8**] a été évalué sur un modèle d'épiderme humain pigmenté reconstruit *in vitro*. L'activité dépigmentante du produit a été appréciée par la mesure des taux de mélanine et de la coloration des épidermes après traitement pendant 8 jours.

Cette étude montre que le produit [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT LOT 106 18 08 8], en application topique sur des épidermes humains pigmentés *in vitro*, est capable de réduire, de manière significative, le taux de mélanine des tissus. L'effet sur la mélanine s'accompagne d'une diminution de la coloration des tissus.
L'ensemble de ces résultats peut être considéré comme des éléments très favorables à l'activité dépigmentante recherchée.

*The depigmenting potential of the preparation [**MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT LOT 106 18 08 8**] was assessed using human tanned in vitro reconstructed epidermis. This in vitro experimental study was based on the measurement of melanin content, and on the coloration of tissues after 8 days topical treatment with the tested product.*

*This study has shown that the topical treatment of human tanned epidermis with the test product [MASQUE PEEL-OFF ECLAIRCISSANT LOT 106 18 08 8] resulted in a significant reduction in melanin content. In addition, a tissue enlightenment was observed after treatment which corroborates the down-regulating effect on melanin level.*
*All these results could be interpreted as good promises for the claimed "whitening - depigmenting" properties.*

**Marc BOUE-GRABOT**
Docteur en Pharmacie
*Doctor in Pharmacy Science*

Date : 19 Mars 2009

Approuvé par *(approved by)*:

**Brigitte HALAVIAT**
Assurance Qualité
*Quality Assurance*

Date :

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.