



Communication / Communication

Redensifier le derme avec DermCom

Le processus de communication entre les cellules est essentiel à la régénération de la matrice cutanée, qui confère à la peau sa fermeté et son élasticité. Or ce dialogue s'altère avec l'âge. En relançant la communication entre les kératinocytes et les cellules plus profondes du derme, DermCom augmente efficacement les concentrations en collagène et élastine dans la peau.

Le vieillissement chronologique de la peau se caractérise par une diminution de l'expression des facteurs de croissance (FC). Ceci affecte la biosynthèse de la matrice extra-cellulaire (MEC) au niveau du derme, un tissu cutané auquel les actifs cosmétiques appliqués de façon topique peuvent difficilement accéder. Une nouvelle stratégie pour lutter

contre le vieillissement du derme, avec des traitements cosmétiques, consiste à utiliser les processus de communication entre les cellules de la couche la plus superficielle de la peau, l'épiderme, et les cellules du derme sous-jacent. Ce dialogue est normalement orchestré par des FC et cytokines libérés par un type de cellules, pour atteindre d'autres types cellulaires par diffusion. Des

tests en culture cellulaire ont montré que DermCom, un extrait de bulbe de crocus, incitait les kératinocytes épidermiques à libérer des FC dans le milieu de culture. L'incubation de fibroblastes dermiques avec ce milieu de culture préalablement débarrassé des cellules a conduit à une augmentation de l'expression de l'élastine, de l'enzyme responsable de l'organisation

Redensify the dermis with DermCom

The communication process between the cells is essential for the regeneration of the cutaneous matrix which gives to the skin its firmness and elasticity. But this dialogue is reduced with age. By boosting the communication between keratinocytes and the deeper cells of the dermis, DermCom increases with efficiency the contents of collagen and elastin in the skin.

Chronologically aged skin is characterized by a diminished expression of growth factors (GF). This affects the biosynthesis of matrix proteins in the dermis, a skin tissue that cannot be easily reached by topically applied cosmetic actives. A new strategy for medication of the aging dermis by cosmetic treatments consists in utilizing the communication processes between the cells of the outer skin layer, the epidermis, and the cells of the subjacent dermis. Communication is normally mediated by

GF and cytokines released by one sort of cells that reach other cell types by diffusion. In a series of cell culture assays, DermCom, an extract of crocus bulbs was shown to stimulate epidermal keratinocytes to release GF into the medium. The cell-free medium incubated with dermal fibroblasts was found to enhance the expression of elastin, of the elastin-processing enzyme Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL-2) and of the Connective Tissue Growth Factor (CTGF). Exactly the same result was obtained by

treating fibroblasts with TGF- β . DermCom directly applied to fibroblasts was without effect. The results clearly demonstrated that DermCom induced secretion of messenger compounds in the epidermis that could enhance the synthesis of matrix proteins in the dermis. The in vitro results were confirmed in placebo-controlled clinical trials: After only two weeks' application, DermCom was able to firm the skin and to significantly increase the collagen and elastin contents in the dermis.

de l'élastine, Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL-2) et du Connective Tissue Growth Factor (CTGF). Un résultat identique a été obtenu en traitant les fibroblastes avec TGF- β . Par contre, le traitement direct des fibroblastes avec DermCom a été sans effet. DermCom induit donc la sécrétion, dans l'épiderme, de messagers capables de stimuler la synthèse de protéines matricielles dans le derme. Des essais cliniques contre placebo ont confirmé ces résultats *in vitro* : après seulement deux semaines d'utilisation, DermCom raffermit la peau et augmente significativement les concentrations en collagène et élastine dans le derme.

► L'âge affecte la communication intercellulaire

Les FC sont des messagers qui permettent la communication entre les cellules dans nos tissus. Dans la peau, ils orchestrent le processus de cicatrisation⁽¹⁾ ainsi que la régénération continue et la réparation. Le vieillissement intrinsèque de la peau se caractérise par une dégradation accrue de la MEC, causée par l'augmentation

de la formation d'espèces oxygénées réactives (conséquence de la détérioration du métabolisme mitochondrial) mais également par la synthèse réduite des FC. Il a été démontré que l'expression réduite de TGF- β et CTGF des fibroblastes cutanés âgés impactait la synthèse des protéines de la MEC⁽²⁾. TGF- β est notamment impliqué dans le processus de réparation cutanée, il est libéré au cours de la phase de régénération pour stimuler la production de MEC. *In vitro*, CTGF stimule la prolifération et la migration des cellules ainsi que la production de MEC. Dans les fibroblastes cutanés, CTGF est induit par TGF- β et fonctionne ainsi comme un médiateur en aval dans l'activation de la formation de la MEC.

► Une nouvelle stratégie pour cibler et stimuler la matrice cutanée

L'utilisation de FC humains en cosmétique est interdite. En théorie, les FC produits de façon biotechnologique pourraient être utilisés mais leur instabilité et leur taille importante, frein à leur pénétration, limiteraient leur

efficacité. Ainsi, les FC appliqués de façon topique ont très peu de chances d'atteindre les fibroblastes dermiques, aux récepteurs membranaires desquels ils doivent se lier pour induire la synthèse des protéines matricielles.

Une nouvelle stratégie consiste à stimuler la synthèse « FC-dépendante » des protéines matricielles dans le derme, en utilisant les processus de communication entre épiderme et derme. Dans une étude *in vitro*, des kératinocytes ont été incubés avec des extraits de différents bulbes de plantes. Ils ont ensuite été séparés et le surnageant des cultures a été utilisé pour cultiver des fibroblastes. A la fin de l'incubation, l'expression de FC et protéines matricielles dans les fibroblastes a été analysée. Dans ce screening réalisé avec des extraits de bulbes de plantes des familles *Amaryllidaceae*, *Asparagaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae* et *Myrsinaceae*, les meilleurs résultats ont été obtenus avec l'extrait du bulbe du *Crocus chrysanthus* de la famille des *Iridaceae*. L'actif cosmétique DermCom a donc été développé à partir du bulbe de cette plante.

► Age depletes the cell-cell communication

GF are messenger compounds that allow the communication between cells in our tissues. In the skin, they orchestrate the wound-healing process⁽¹⁾ and also the continuous regeneration and repair.

*Intrinsic skin aging is characterized by a stronger degradation of the ECM caused by the enhanced formation of reactive oxygen species (consequence of an impaired mitochondrial metabolism) and also by the reduced synthesis of GF. A decreased expression of TGF- β and CTGF by aged skin fibroblasts was shown to be responsible for the reduced synthesis of the ECM proteins⁽²⁾. TGF- β is notably involved in the repair process of the skin, it is released during the regeneration phase to enhance the ECM production. *In vitro*, CTGF stimulates cell proliferation, migration and ECM production. In skin fibroblasts, CTGF is primarily induced by TGF- β and functions thus as*

a downstream mediator in the activation of the ECM formation.

► A new strategy to target and stimulate the skin matrix

The use of human GF in cosmetic products is forbidden. Theoretically biotechnologically produced GF could be used but their efficacy is very limited because of instability and lack of penetration due to their big size, preventing them to reach fibroblasts of the dermis, where they should bind to membrane receptors to induce the synthesis of matrix proteins.

A new strategy relies on the stimulation of the GF-dependent synthesis of matrix proteins in the dermis by using epidermis / dermis communication processes. In a screening assay, keratinocytes were incubated with extracts of different plant bulbs. The keratinocytes were then separated and the culture supernatants were used to culture fibroblasts in them. At the end of the incubation, the expression of GF and matrix proteins in the fibroblasts was analyzed. In

this screening assay performed with bulb extracts of plants of the Amaryllidaceae, Asparagaceae, Iridaceae, Liliaceae and Myrsinaceae, the best results were found for the Crocus chrysanthus bulb extract from the Iridaceae family. An active ingredient called DermCom was thus developed from the bulb of this plant.

► The growth factor-like activity of DermCom

Keratinocytes from a 50 year old donor were treated or not with DermCom. At the end of the incubation, the cell cultures were centrifuged to separate the cell pellets from the supernatant (keratinocyte secretions). Then, the keratinocytes were washed and the expression of GF typically expressed in these cells was analyzed by quantitative PCR (Polymerase chain reaction). Fibroblasts of donors over 50 years old were treated or not with either the previously obtained keratinocyte secretions, or TGF- β or DermCom. At the end of the incubation, fibroblasts were

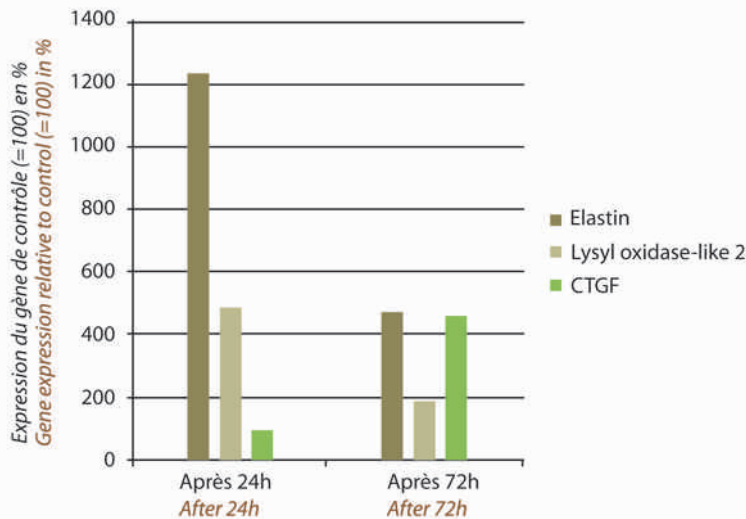


Figure 1 :

EFFET SUR L'EXPRESSION DES GÈNES DES FIBROBLASTES APRÈS LEUR INCUBATION PENDANT 24 ET 72H AVEC LES SÉCRÉTIONS DE KÉRATINOCYTES PRÉCÉDEMMENT TRAITÉS AVEC DERMCOM. CES VALEURS SONT COMPARÉES AUX VALEURS DE L'EXPRESSION DES GÈNES DES FIBROBLASTES APRÈS LEUR INCUBATION AVEC LES SÉCRÉTIONS DE KÉRATINOCYTES NON TRAITÉS (= CONTRÔLE = 100%).

EFFECT ON GENE EXPRESSION IN FIBROBLASTS AFTER INCUBATION FOR 24 AND 72H WITH THE SÉCRETIONS OF KERATINOCYTES PREVIOUSLY TREATED WITH DERMCOM. THE VALUES ARE COMPARED TO GENE EXPRESSION VALUES OF FIBROBLASTS AFTER INCUBATION WITH THE SÉCRETIONS OF UNTREATED KERATINOCYTES (= CONTROL = 100%).

► L'activité « FC-like » de DermCom

Les kératinocytes d'un donneur âgé de 50 ans ont été traités ou pas avec DermCom. A la fin de l'incubation, les cultures de cellules ont été centrifugées pour séparer le culot de cellules du surnageant (sécrétions des kératinocytes). Les kératinocytes ont ensuite été lavés et l'expression de FC typiques de ces cellules a été analysée par PCR (Réaction en Chaîne par Polymérisation) quantitative. Les fibroblastes de donneurs âgés de plus de 50 ans ont été traités ou pas avec les sécrétions kératinocytaires préalablement obtenues, TGF- β ou DermCom. A la fin de l'incubation, les fibroblastes ont été isolés et lavés. L'expression de protéines matricielles dans ces cellules a été analysée par PCR quantitative. Les résultats ont montré que les sécrétions des kératinocytes traités avec DermCom stimulaient fortement l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de protéines matricielles chez les fibroblastes (Figure 1). Par rapport aux sécrétions des kératinocytes non traités, l'expression de l'élastine a été multipliée par 12 et celle de LOXL-2 par 5 après 24h d'incubation. Après

isolated and washed. The expression of matrix proteins in these cells was analyzed by quantitative PCR. Results showed that the secretions of keratinocytes treated with DermCom strongly

stimulated the expression of genes involved in the synthesis of matrix proteins in the fibroblasts (Figure 1). Compared to the secretions of untreated keratinocytes, the expression

of elastin was enhanced 12-fold and of LOXL-2, 5-fold after 24 hours' incubation. After 72 hours' incubation, the expression of CTGF was also enhanced 5-fold. The expression of LOXL enzymes, which are important for elastic fiber formation, is reported to be reduced in aged skin⁽³⁾. Besides, reduced collagen and elastin levels in aging skin might be well caused by limiting CTGF levels as shown by Quan et al.⁽²⁾. Treatment of fibroblasts with TGF- β induced a very similar expression pattern (Figure 2). TGF- β was used as a positive control because it is a known promoter of the synthesis of ECM proteins⁽⁴⁾. Incubation of fibroblasts with DermCom did not affect gene expression, indicating that the effect in fact depends on compounds secreted by keratinocytes. Treatment of keratinocytes with DermCom was found to upregulate the expression of several GF known to play important roles in epidermis / dermis communication (Figure 3). These assays with all the relevant control conditions showed

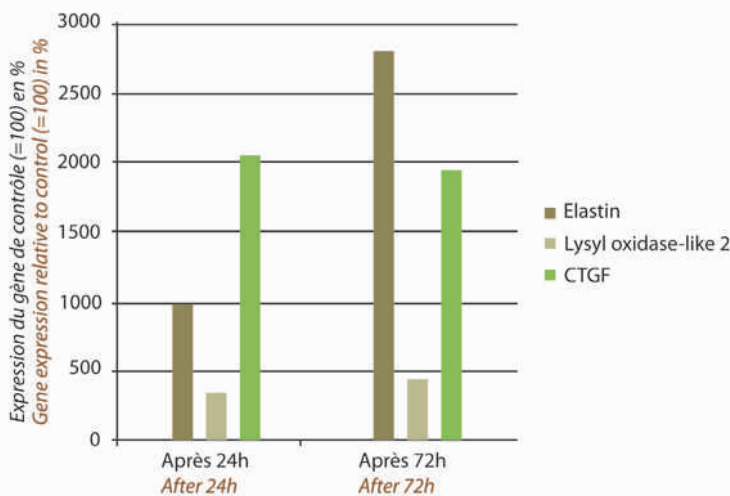
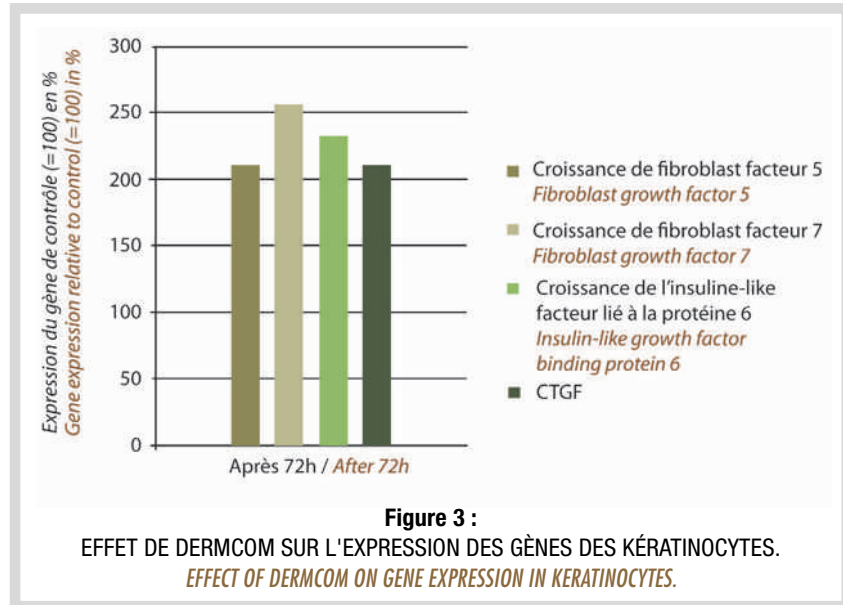


Figure 2 :

EFFET DE TGF- β SUR L'EXPRESSION DES GÈNES DES FIBROBLASTES.

EFFECT OF TGF- β ON GENE EXPRESSION IN FIBROBLASTS.

72h d'incubation, l'expression de CTGF a été multipliée par 5. L'expression des enzymes LOXL, requises pour la formation des fibres élastiques, serait réduite chez les peaux âgées⁽³⁾. D'autre part, la réduction des teneurs en collagène et élastine dans les peaux âgées serait due aux niveaux limités de CTGF comme démontré par Quan *et al.*⁽²⁾. Un résultat identique a été obtenu en traitant les fibroblastes avec TGF- β (Figure 2). TGF- β a été utilisé comme contrôle positif du fait de son effet connu sur l'activation de la synthèse des protéines de la MEC⁽⁴⁾. L'incubation des fibroblastes avec DermCom n'a pas affecté l'expression des gènes de ces cellules indiquant ainsi que l'effet observé précédemment dépend des composés sécrétés par les kératinocytes. Le traitement de ces derniers avec DermCom a conduit à une activation de différents FC impliqués dans la communication épiderme/derme (Figure 3). Ces expérimentations, réalisées avec les contrôles pertinents, ont montré que l'effet stimulateur de DermCom sur la synthèse de protéines matricielles reposait sur les signaux de FC libérés par les kératinocytes, un type de cellules auxquelles les actifs cosmétiques peuvent accéder.



► **Après deux semaines de traitement : augmentation des concentrations en collagène et élastine dans la peau + effet raffermissant**

Une crème contenant 0,4% de DermCom a été appliquée deux fois par jour sur

l'intérieur de l'avant-bras d'une femme caucasienne de 53 ans pendant deux semaines. Son autre avant-bras a été traité avec le placebo correspondant. Les images obtenues par la microscopie à deux photons permettent de visualiser les structures profondes de la peau. Cette technique non-invasive repose

in fact that the stimulatory effect of DermCom on the synthesis of matrix proteins is mediated by growth factor signals released by keratinocytes, a cell type that can be reached by cosmetic actives.

► **After two weeks of treatment: Collagen and elastin content increase + firming effect**

A cream with 0.4% DermCom was applied twice a day to the inner forearm skin of a 53 year old Caucasian woman for two weeks. The other forearm was treated with the corresponding placebo. Two-photon microscopy pictures were taken in order to visualize deeper skin structures. This non-invasive technique is based on the principle that infrared laser irradiation can cause autofluorescence of some molecules (e.g. elastin) or second harmonic generation (e.g. collagen). After two weeks' application, results showed, in the papillary and reticular layers of the upper dermis, that the amount of collagen was

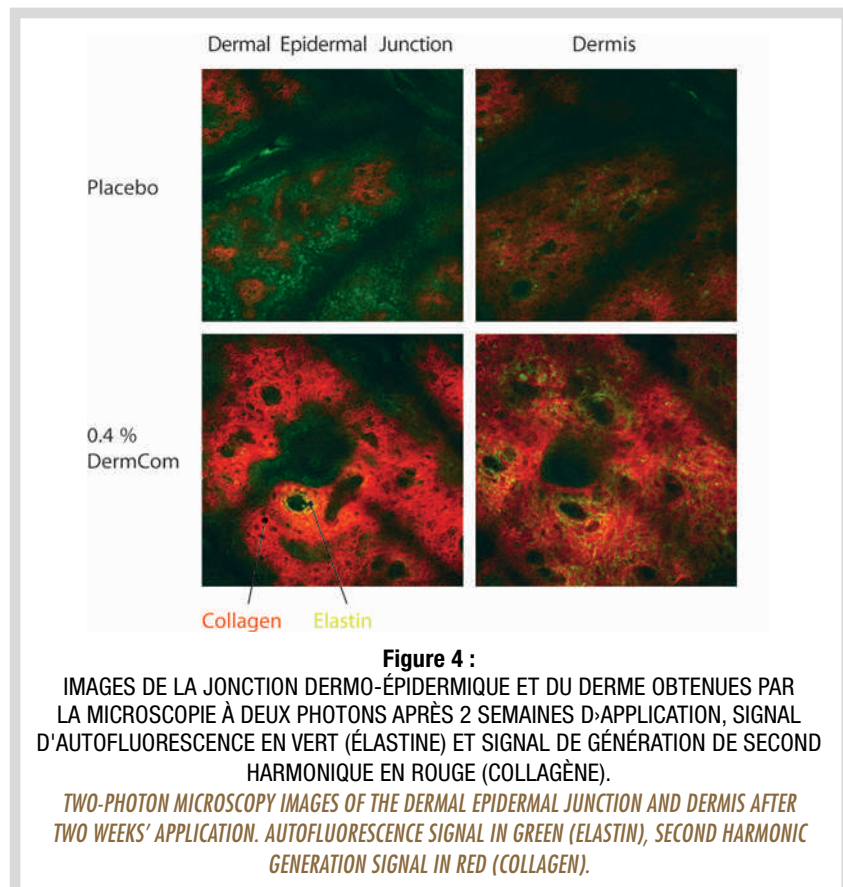


Figure 4 : IMAGES DE LA JONCTION DERMO-ÉPIDERMIQUE ET DU DERMIS OBTENUES PAR LA MICROSCOPIE À DEUX PHOTONS APRÈS 2 SEMAINES D'APPLICATION, SIGNAL D'AUTOFLUORESCENCE EN VERT (ÉLASTINE) ET SIGNAL DE GÉNÉRATION DE SECOND HARMONIQUE EN ROUGE (COLLAGÈNE).
TWO-PHOTON MICROSCOPY IMAGES OF THE DERMAL EPIDERMAL JUNCTION AND DERMIS AFTER TWO WEEKS' APPLICATION. AUTOFLUORESCENCE SIGNAL IN GREEN (ELASTIN), SECOND HARMONIC GENERATION SIGNAL IN RED (COLLAGEN).

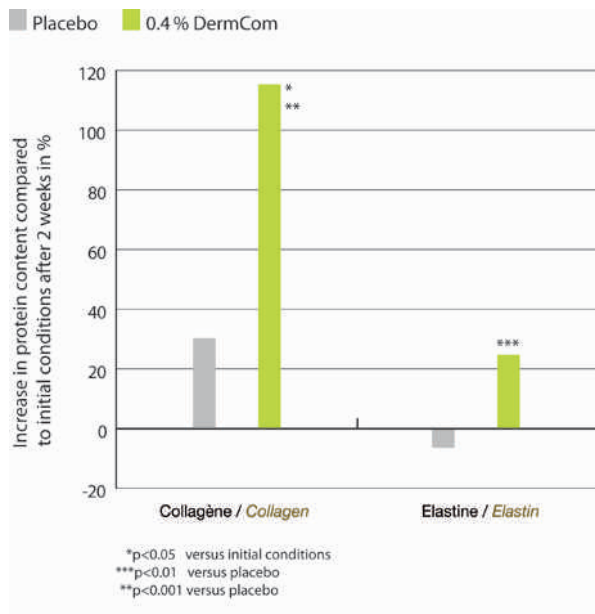


Figure 5 :
 AUGMENTATION DES CONCENTRATIONS EN COLLAGÈNE ET ÉLASTINE DANS LA PARTIE SUPÉRIEURE DU DERMIS APRÈS 2 SEMAINES D'APPLICATION.
 INCREASE OF COLLAGEN AND ELASTIN AMOUNTS IN THE UPPER DERMIS AFTER TWO WEEKS' APPLICATION.

sur le principe que le rayonnement laser infrarouge produit l'autofluorescence de certaines molécules (e.g. élastine) ou la génération de second harmonique (e.g. collagène). Après deux semaines d'application, les concentrations en collagène ont augmenté de 115% pour DermCom et de 30% pour le placebo dans le derme papillaire et dans la partie supérieure du derme réticulaire. La concentration en élastine a, elle, augmenté de 25% pour DermCom et légèrement diminué de 7% pour le placebo (Figures 4 et 5). Dans les deux cas, la différence entre les deux avant-bras était significative ($p<0.001$ pour le collagène et $p<0.01$ pour l'élastine). Une crème contenant 2% de DermCom a été testée pendant quatre semaines sur 20 femmes âgées de 36 à 65 ans. La crème a été appliquée deux fois par jour sur l'intérieur de l'avant-bras. L'autre avant-bras a été traité avec le placebo correspondant. Dès deux semaines

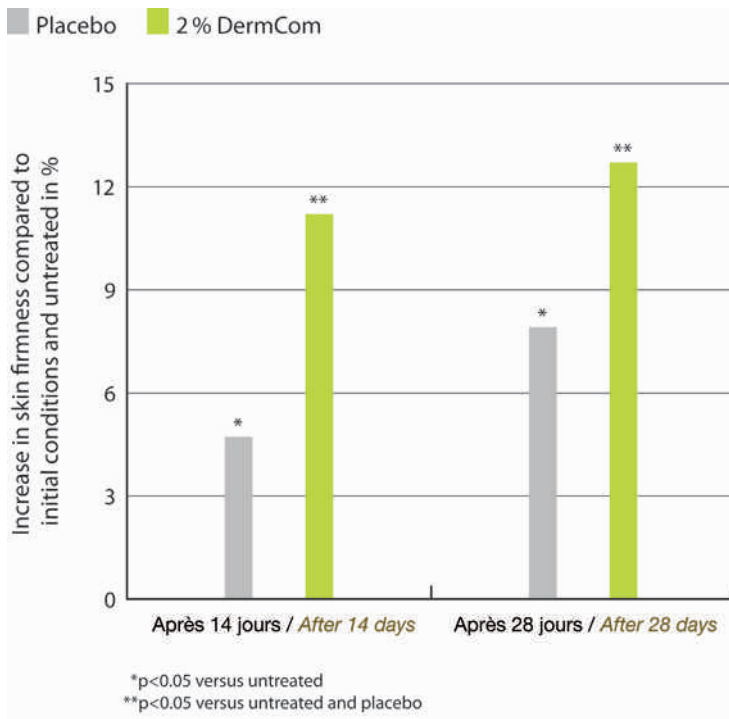


Figure 6 :
 AUGMENTATION DE LA FERMETÉ DE LA PEAU.
 INCREASE IN SKIN FIRMNESS.

increased by 115% for DermCom and by 30% for the placebo. The amount of elastin was increased by 25% for DermCom and slightly decreased by 7% for the placebo (Figures 4 and 5). In both cases, the difference between the two forearms was significant ($p<0.001$ for collagen and $p<0.01$ for elastin). A cream with 2% DermCom was tested in a study over four weeks on 20 women aged between 36 and 65. The cream was applied twice daily to the inner side of the forearm. The other forearm was treated with the corresponding placebo. Already after two weeks' application, DermCom was found to improve significantly skin firmness compared to the placebo (Figure 6).

► Conclusion

The age-related decline in the synthesis of GF is the chief cause for intrinsic skin aging. This leads to the appearance of wrinkles which are formed in the dermis, a skin layer that cannot be easily reached by cosmetic actives. DermCom, an extract of crocus bulbs

d'application, une augmentation significative de la fermeté de la peau traitée avec DermCom a été constatée par rapport au placebo (Figure 6).

► Conclusion

La synthèse réduite des FC liée à l'âge est une cause majeure du vieillissement intrinsèque de la peau. Les rides qui sont la principale manifestation du vieillissement se forment dans le derme, une couche de la peau à laquelle les actifs cosmétiques peuvent difficilement accéder. Nous avons montré que DermCom, un extrait de bulbe de crocus, pouvait résoudre ces deux problèmes : la raréfaction des FC et l'inaccessibilité de la zone. En effet, DermCom s'est avéré capable de stimuler la libération, par les kératinocytes, de FC qui ont induit la néosynthèse de protéines matricielles dans le derme. ■

was shown to solve both problems, the missing GF and the inaccessible problem zone. DermCom was found to stimulate the release of keratinocyte-derived growth factor messengers that induced the neo-synthesis of matrix proteins in the dermis. ■

**Daniel Schmid,
Elodie Mauger**
MIBELLE BIOCHEMISTRY,
Suisse

Bibliography

- ⁽¹⁾ S. Werner, T. Krieg et al., J Invest Dermatol, 127, pp. 998-1008 (2007).
- ⁽²⁾ T. Quan, Y. Shao et al., J Invest Dermatol, 130, pp. 415-424 (2010).
- ⁽³⁾ G. Pascual, C. Mendieta et al., Histol Histopathol, 23, pp. 179-186 (2008).
- ⁽⁴⁾ R.A. Clark, G.A. McCoy et al., J Cell Physiol, 170, pp. 69-80 (1997).

Notes :