Micro-spectromètre Raman vivo, gen2-SCA (RiverD International BV, Pays-Bas) - EA6295 NMNS, Faculté de Pharmacie, Université de Tours

Par Emilie Munnier, Hichem Kichou & Franck Bonnier

Avec l'application du règlement européen (CE) N°1223/2009 exigeant des preuves scientifiques des allégations et revendications d'un produit cosmétique, le domaine dit « du test » des cosmétiques s'est fortement développé. Cette compétence, depuis longtemps ancrée en Région Centre Val de Loire avec des entreprises comme Spincontrol, Transderma Systems et Orion Concept, a trouvé un nouvel essor grâce au programme de financement régional « Ambition Recherche et Développement Cosmétosciences » mis en place en 2015. Dans ce contexte, l'équipe NMNS cherche à développer de nouvelles méthodes d'analyse non invasives qui viendront compléter les méthodes actuellement utilisées, que ce soit *in vitro*, sur cellules et peaux reconstruites, *ex vivo* sur biopsies de peau, ou *in vivo* sur des panélistes volontaires pour tester le produit. Notamment, l'équipe s'emploie à développer des méthodes d'analyses permettant d'observer les phénomènes moléculaires au sein du tissu de manière non invasive au moyen de la spectroscopie Raman. Après avoir confirmé l'intérêt de cette approche sur des modèles *in vitro* et *ex vivo* au cours des projets COSMICC (ARD 2020 Cosmétosciences phase 1) et MISTIC-O (APR-IR 2018), elle a acquis un nouveau spectromètre dédié à l'analyse de la peau permettant des mesures Raman *in vivo*, directement sur des volontaires. Ainsi, au cours du projet MINIONs (ARD CVL Cosmétosciences), NMNS et ses partenaires industriels travaillent au développement d'un test standardisé basé sur cette technologie. L'approche viendra compléter les tests d'efficacité et de tolérance des cosmétiques déjà existants. En effet, à l'heure actuelle les méthodes utilisées sont basées sur l'observation des effets des produits au niveau macroscopique. Une évaluation clinique par un dermatologue est suivie d'études biométrologiques. Les propriétés mécaniques (cutométrie, torquemétrie, ballistométrie) ou encore électriques (cornéométrie) de la peau sont mesurées. L'analyse d'images photographiques (étude du relief cutané) ou encore échographiques (épaisseur de la peau) est également largement utilisée. L'analyse Raman de la peau viendra, sans acte invasif, ajouter une dimension moléculaire aux résultats qui pourrait permettre d'expliquer les phénomènes observés. L'information apportée pourra concerner la structure du tissu, sa composition ou encore le degré de pénétration d'un actif cosmétique.

1. Analyse moléculaire à l'échelle micrométrique par spectroscopie de diffusion Raman

La spectroscopie Raman est une technique d'analyse chimique non destructive et sans marquage qui délivre une empreinte moléculaire de l'échantillon sous la forme d'une signature spectrale qui résulte de l'interaction de la lumière avec les liaisons chimiques au sein de la matière analysée. La spectroscopie Raman a de nombreuses applications allant de la caractérisation structurale et organisationnelle des molécules dans le domaine de la chimie, jusqu'à l'étude des systèmes biologiques complexes.

Lorsque la peau est soumise à une irradiation par une source laser de forte intensité, une grande partie de la lumière est diffusée de manière élastique, c'est-à-dire que la lumière diffusée possède la même longueur d'onde (ou couleur) que la source excitatrice. Il s'agit de la diffusion de Rayleigh (Figure 1). Cependant, une faible quantité de la lumière est diffusée de manière inélastique, avec un changement de longueur d'onde, c'est la diffusion Raman.

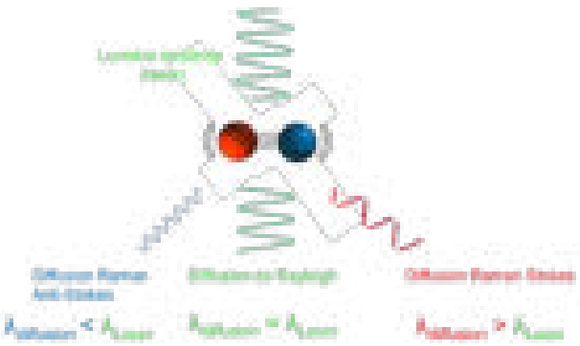

Figure 1 : *Principe de la diffusion Raman*

Ce sont ces changements de fréquence de la lumière diffusée qui permettent de collecter une signature vibrationnelle spécifique des systèmes analysés. Un spectre Raman représente l'intensité des raies Stokes en fonction du nombre d'ondes (inverse de la longueur d'onde) (Figure 2). Il faut noter que les positions des raies en nombres d'ondes correspondent aux décalages observés par rapport à la source laser excitatrice (Raman shift en anglais). Le spectre Raman est caractéristique de la structure chimique de la molécule, de sa conformation et de son organisation cristalline (polymorphisme).

Le spectre Raman peut être utilisé pour identifier une molécule par l'analyse des positions des pics et de leurs intensités relatives. Par exemple sur le spectre de la résorcine (figure 2A) des pics caractéristiques de la déformation du cycle aromatique à 532 cm^{-1}, de l'élongation C–C dans le cycle aromatique à 741 cm^{-1} et 1001 cm^{-1}, la déformation O–H à 1314 cm^{-1} et de l'étirement C–C à 1608 cm^{-1} sont observés. Lors de l'analyse de la peau, ses composants (protéines, lipides, acides nucléiques, …) vont contribuer fortement au signal Raman collecté (Figure 2B). Néanmoins, la présence d'un actif peut être détectée grâce à ses bandes caractéristiques qui entrainent des modifications dans la signature spectrale. Ces bandes caractéristiques peuvent être quantifiées (Figure 2C). Les intensités maximales relatives, notamment les rapports de bandes, renseignent sur la concentration relative de l'AC dans la peau. Le recouvrement plus ou moins prononcé des bandes requière néanmoins d'utiliser des méthodes chimiométriques pour extraire l'information des données pour construire des modèles quantitatifs[1] ou séparer les signaux des constituent biochimiques de la peau et de l'actif pour déterminer son profil de pénétration.[2]

La spectroscopie Raman peut être utilisée pour l'analyse microscopique de la peau, avec une résolution spatiale (latérale en x et y) de l'ordre du micron. Une telle analyse n'est possible qu'à l'aide d'un microscope Raman qui permet également de travailler en mode confocal, c'est-à-dire avec une résolution axiale (en z) de quelques microns. De la même façon, La microscopie confocale Raman (MCR) peut être utilisée pour l'analyse de matrices complexes, comme des échantillons multicouches (par exemple, des revêtements polymères) ou encore pour analyser des solutions directement à travers la paroi du contenant.[3]

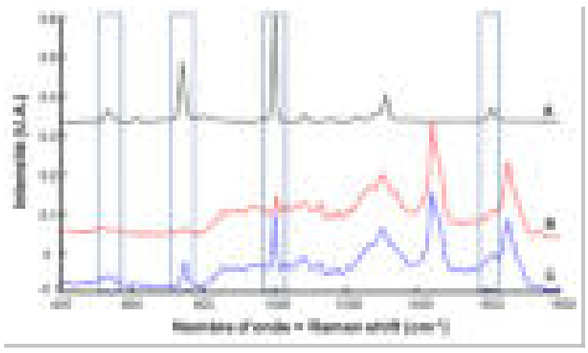

Figure 2 : *Spectre Raman de la résorcine (A), de la peau (B) et de la peau après application d'une formulation de résorcine (C).*

2. Analyse non-invasive de la peau *in vivo*

NMNS est le premier laboratoire de recherche universitaire français à acquérir en novembre 2021 le micro-spectromètre Raman gen2-SCA, qui répond aux normes et possède les certifications pour être utilisé pour l'étude de la peau de volontaires. L'analyse est réalisée en posant la zone d'analyse, par exemple l'avant-bras (Figure 3) sur la fenêtre de mesure et les étapes suivantes sont automatisées par le déplacement motorisé de l'objectif. Le système permet d'analyser la peau de manière non invasive depuis la surface vers la profondeur. Le système est équipé de deux lasers, un laser rouge et un laser proche infra-rouge pour d'une part s'adapter aux molécules que l'on souhaite détecter mais également pour s'affranchir de l'auto-fluorescence de la peau qui pourrait modifier le signal. L'objectif des analyses est d'apporter des informations sur la composition moléculaire du *stratum corneum* mais également des couches sous-jacentes avec une résolution axiale d'environ 5µm, avec une profondeur d'analyse allant jusque 200 µm (Figure 3A). Cet équipement a fait ses preuves dans l'étude et le diagnostic des pathologies cutanées et se déploie petit à petit dans le domaine cosmétique pour étudier les effets moléculaires des produits cosmétiques in vivo. Parmi les paramètres qui peuvent être analysés figure l'hydratation de la peau (Figure 4B). Il est essentiel pour classer par exemple les individus dans un panel de peaux sèches ou normales, en encore pour tester l'efficacité d'un produit hydratant ou reconstituant la barrière cutanée. Il permet également de mesurer, en fonction de la profondeur, l'évolution d'un composant cutané suite à l'application d'un cosmétique, comme par exemple les céramides (Figure 4B). Grâce à la richesse et la spécificité moléculaire de l'information contenue dans les spectres, le système

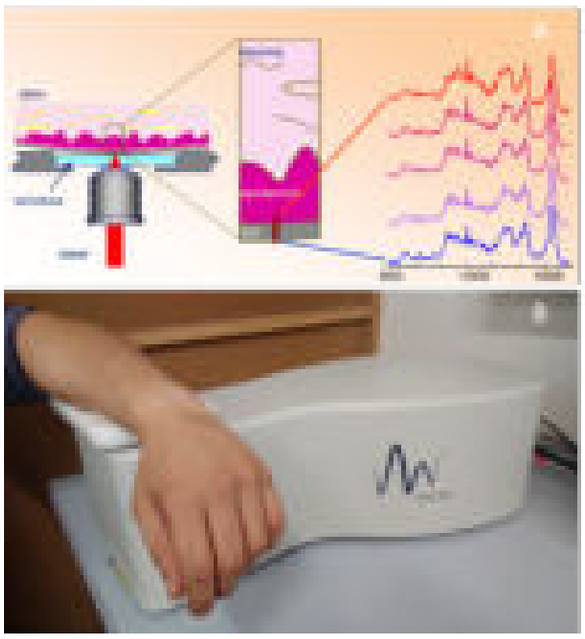

Figure 3 : *(A) Principe de la mesure (avec l'autorisation de RiverD International BV) et (B) Photo du microspectromètre gen2-SCA installé dans les locaux de NMNS.*

gen2-SCA renseigne également sur des changements morphologiques, par exemple au niveau de l'épaisseur des couches de la peau. L'objectif des travaux de recherche menés par NMNS est d'évaluer le potentiel de cette technique pour détecter et quantifier un actif cosmétique pour déterminer, par exemple, quelle formule est la plus performante. Dans cette optique, des protocoles d'acquisition des spectres et de traitement des données par des analyses statistiques multivariées sont développés dans le cadre du projet ARD CVL MINIONs. Un des modèles d'étude choisi est la caféine, actif lipolytique qui, pour être efficace contre la cellulite, doit pénétrer profondément dans le tissu (Figure 4C).

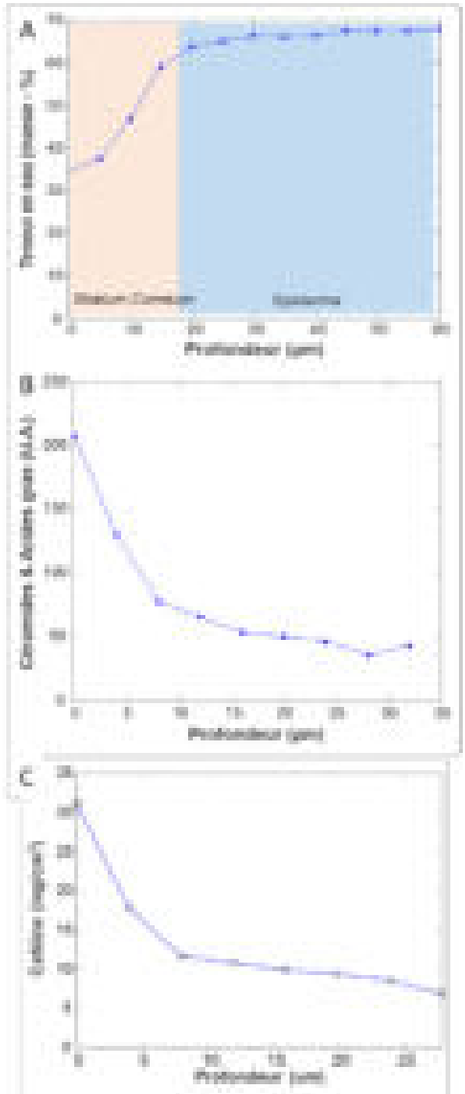

Figure 4 : *Exemples de résultats obtenus avec le microspectromètre gen2-SCA (RiverD) (A) profil d'hydratation de la peau, (B) analyse de la composition lipidique de la peau en fonction de la profondeur (C) Exemple de profil de pénétration de la caféine suite à l'application d'une crème contenant 2% de cet actif.*

Références

[1] L. Miloudi, F. Bonnier, D. Bertrand, H. J. Byrne, X. Perse, I. Chourpa, E. Munnier. Quantitative analysis of curcumin-loaded alginate nanocarriers in hydrogels using Raman and attenuated total reflection infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2017, 409 (19): 4593-4605

[2] L. Miloudi, F. Bonnier, A. Tfayli, H. Byrne, I. Chourpa, E. Munnier. Confocal Raman spectroscopic imaging for in vitro monitoring of active ingredient penetration and distribution in Reconstructed Human Epidermis model. *J Biophotonics*, 2018, 11:e201700221

[3] In situ Analytical Quality Control of chemotherapeutic solutions in infusion bags by Raman spectroscopy. A.A. Makki, S. Elderderi, V. Massot, R. Respaud, H.J. Byrne, C. Tauber, D. Bertrand, E. Mohammed, I. Chourpa, F. Bonnier. *Talanta* 2021, 228:122137.

Contact : **Émilie MUNNIER**
EA 6295 NMNS
Faculté de pharmacie
31 avenue Monge
37 200 TOURS
emilie.munnier@univ-tours.fr