

4.1.2 Effet anti-inflammatoire in-vitro de l'eau thermale de La Roche-Posay.

En plus de ses propriétés anti-radicalaires, l'eau thermale de La Roche-Posay exerce une activité anti-inflammatoire dont les mécanismes sont démontrés *in vitro* dans les études suivantes.

> Effets *in vitro* de l'eau thermale de La Roche-Posay sur les capacités de stimulation des cellules cutanées de Langerhans.

A. Wollenberg¹, A. Richard², T. Bieber¹.

¹Département de dermatologie, Université Ludwig-Maximilian, Université de Munich, Allemagne

²La Roche-Posay Laboratoire pharmaceutique [Wollenberg, 1992]

> Les auteurs ont étudié l'effet *in vitro* de l'eau thermale de La Roche-Posay sur la prolifération spontanée ou provoquée par un mitogène, de cellules sanguines mononuclées périphériques (CMSP) et sur la capacité de stimulation des cellules de Langerhans épidermiques (CL), dans des réactions mixtes lymphocytes - cellules cutanées.

> Matériels et méthodes.

Trois milieux de culture ont été comparés :

- > Le milieu DMEM lyophilisé reconstitué avec l'eau thermale de La Roche-Posay,
- > Le milieu DMEM lyophilisé reconstitué avec de l'eau distillée Millipore,
- > Le milieu DMEM liquide normal.

Les capacités de prolifération spontanée des cellules sanguines mononuclées et provoquée par le phorbol 12-myristate 13-acétate avec et sans la présence de cellules allogéniques épidermiques, ont ensuite été observées.

> Résultats.

Il n'existe pas de différence de l'indice de prolifération des CMSP en fonction des milieux d'incubation.

La réponse au phorbol n'a pas non plus été différente selon le milieu.

> Par contre, en présence de cellules allogéniques épidermiques, une forte inhibition de la réponse proliférative des CMSP a été observée dans le milieu contenant l'eau thermale de La Roche-Posay.

La capacité de stimulation des cellules de Langerhans étant régulée par différentes cytokines comme l'interleukine-1, le GM-CSF ou le TNF α libérées par les kératinocytes au cours des différents stades de l'activation, l'effet suppressif montré dans ce travail peut être provoqué par :

- > un effet direct de un ou plusieurs composants de l'eau thermale de La Roche-Posay sur la maturation fonctionnelle des CL,
- > un effet indirect par l'induction de sécrétion de TNF α par les kératinocytes qui bloque l'activité stimulante des CL [KOCH, 1990],
- > l'inhibition de la sécrétion des cytokines par les kératinocytes responsables de la maturation fonctionnelle des CL *in vitro* comme IL-1 α et/ou GM-CSF [WITMER-PACK, 1987] [HEUFLER, 1988],
- > un effet combiné de tous ces mécanismes.

Ces résultats démontrent clairement l'action suppressive de l'eau thermale de La Roche-Posay sur l'activité stimulante des cellules de Langerhans *in vitro*.

> Effets modulants des sels de sélénium et de strontium sur les cytokines inflammatoires des kératinocytes.

P. Celerier¹, A. Richard², P. Litoux¹, B. Dreno¹.

¹Département de dermatologie, CHU Nantes

²La Roche-Posay Laboratoire pharmaceutique [Celerier, 1995]

> Ce travail *in vitro* avait pour but de déterminer le rôle du sélénium et du strontium contenus dans l'eau thermale de La Roche-Posay sur la modulation de la production des cytokines kératinocytaires de l'inflammation (IL-1 α , IL-6 et TNF α).

> Matériels et méthodes.

Le modèle des peaux reconstituées a été utilisé. Des biopsies obtenues à partir de lésions de dermatite atopique et des biopsies de peau saine ont été incubées dans trois milieux de culture différents sans hydrocortisone :

- > un milieu de base EMEM avec de l'eau distillée Millipore (milieu contrôle),
- > le même milieu supplémenté en strontium (chlorure ou nitrate 260 μ g/l) ou en sélénium (sélénate, sélénite et chlorure 60 μ g/l),
- > un milieu de base EMEM dont l'eau distillée était remplacée par de l'eau thermale de La Roche-Posay.

A J14 de l'incubation, les cultures ont été stoppées et les peaux reconstituées ont été traitées avec des anticorps marqués anti IL-1 α , IL-6 et TNF α .

Les marquages obtenus ont été cotés en négatif, faible, modéré et fort.

La production intracellulaire d'IL-1 α , IL-6 et TNF α a été étudiée par une méthode immuno-histochimique sur coupe congelée.

La production extracellulaire dans le milieu de culture de ces cytokines a été étudiée par méthode ELISA.

> Résultats.

Dans le cas de la peau normale incubée dans le milieu contrôle, la production intracellulaire est faible pour l'IL-1 α et négative pour l'IL-6 et le TNF α .

L'adjonction dans le milieu de culture d'eau thermale ou supplémenté en sélénium ou strontium n'induit pas de production d'IL-6 ou TNF α , mais inhibe la production d'IL-1 α .

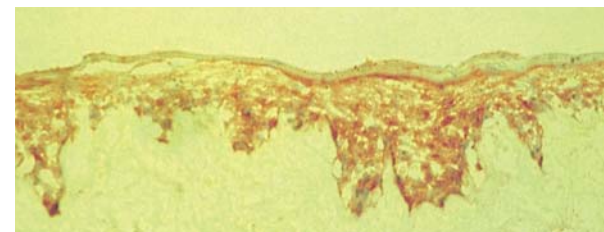
Dans le cas de la peau inflammatoire incubée avec le milieu contrôle, la production intracellulaire de cytokines est modérée pour IL-1 α , et forte pour l'IL-6 et le TNF α .

La production des différentes cytokines varie selon le sel de sélénium ou le strontium ajouté, ainsi qu'avec l'eau thermale de La Roche-Posay (figure 3).

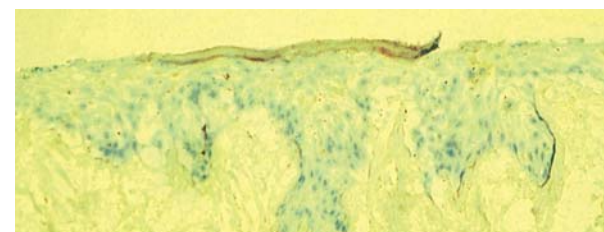
Il existe notamment une nette inhibition de la production d'IL-6 avec l'eau de La Roche-Posay et les sels de sélénium (Se NaO₃) et de strontium (Sr NO₃).

Une inhibition plus faible est retrouvée avec le TNF α .

Toutes les concentrations de cytokines, et en particulier IL6, étaient diminuées dans le surnageant aussi bien pour la peau normale que pour les peaux inflammatoires après 10 jours d'incubation dans un milieu contenant des sels de strontium, des sels de sélénium et de l'eau thermale de La Roche-Posay.



Milieu contrôle



Milieu riche en sels de Sélénium

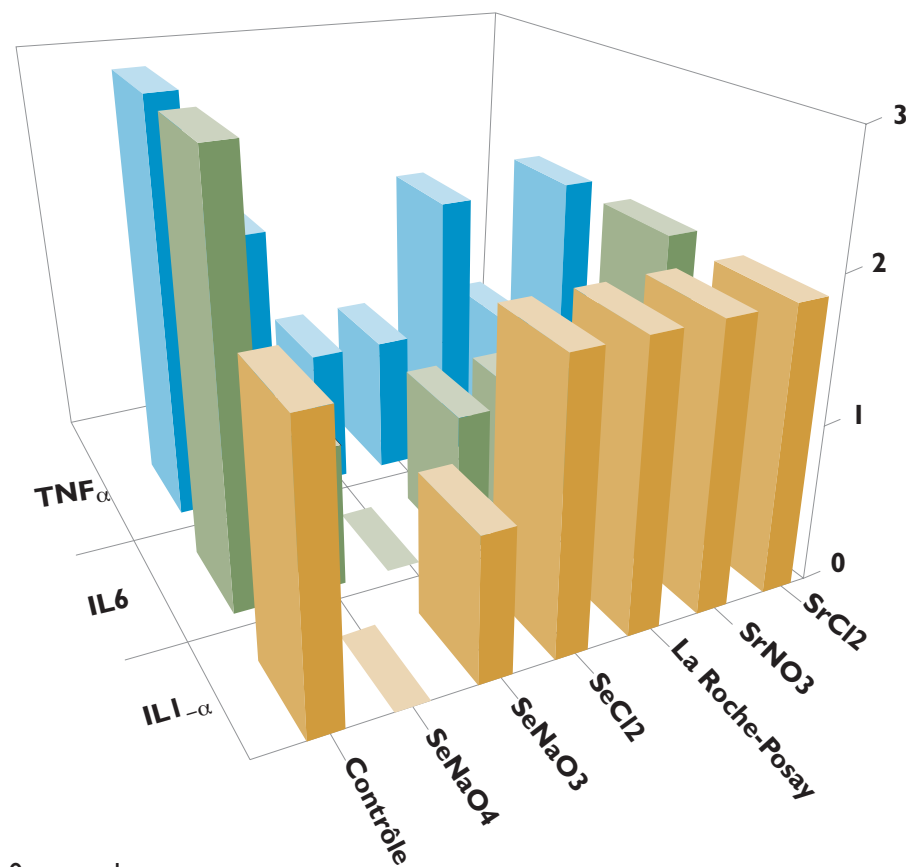
Les auteurs ont envisagé deux explications à cette activité anti-inflammatoire :

> l'augmentation de l'activité bactéricide et phagocytaire des granulocytes par les sels de sélénium, comme cela a été démontré *in vitro* chez l'animal,

> la catalyse de la décomposition des peroxydes par la GPX séléno-dépendante et donc un effet protecteur cellulaire contre les réactions inflammatoires *in situ*.

Cette étude menée sur peaux reconstituées à partir de kératinocytes issus de dermatite atopique démontre la capacité de l'eau thermale de La Roche-Posay à moduler la production de cytokines pro-inflammatoires, mécanisme pouvant expliquer les résultats obtenus dans le traitement des dermatoses inflammatoires.

Figure 3 : Evolution des marquages sur peau inflammatoire des différentes cytokines en fonction des milieux d'incubation *in vitro*.



0 = pas de marquage
1 = faible
2 = modéré
3 = fort

> Effets *in vitro* d'une eau thermale sur les capacités de migration et de stimulation des cellules épidermiques humaines de Langerhans.

MJ. Staquet¹, J. Peguet-Navarro¹, F. Latourre¹, A. Richard², A. Rougier², D. Schmitt¹.

¹INSERM U-346 affilié CNRS, Hôpital E. Herriot Lyon

²La Roche-Posay Laboratoire pharmaceutique [Staquet, 1997]

Le but de cette étude a été d'observer les effets de l'eau thermale de La Roche-Posay *in vitro* sur la modulation du phénotype des cellules de Langerhans et leurs capacités de migration et de stimulation.

> Matériels et méthodes.

Des cultures de cellules de Langerhans humaines ont été incubées dans un milieu de base (RPMI) et dans le même milieu enrichi en eau thermale de La Roche-Posay.

Celles-ci ont été sensibilisées par exposition à un haptène (TNBS) puis lavées plusieurs fois avant d'être soumises aux tests de migration, de prolifération des lymphocytes T avec mesure de l'expression des antigènes HLA-DR, B7-2 et ICAM-I.

> Résultats.

Le traitement préalable par un haptène type TNBS a induit la migration des cellules de Langerhans.

Les propriétés migratrices des cellules de Langerhans sont significativement diminuées après incubation dans le milieu enrichi en eau thermale de La Roche-Posay ($p < 0,028$).

Concernant l'expression des antigènes de surface HLA DR, B7-2 et ICAM-I qui jouent un rôle dans la stimulation et l'initiation de la réponse proliférative des lymphocytes T. Il existe une diminution significative de l'expression de HLA DR (25% - $p < 0,023$), de ICAM-I (25% - $p < 0,001$) et de B7-2 (35% - $p < 0,014$).

Comme il est décrit dans une autre publication, les cellules de Langerhans en présence de TNBS induisent une réponse primaire des lymphocytes T [KOBAYASHI, 1994]. Par contre dans cette étude, la présence d'eau thermale de La Roche-Posay ne modifie pas cette stimulation.

Il est donc démontré dans cette étude :

> une inhibition significative de la migration des cellules cutanées de Langerhans sensibilisées par un haptène en présence d'un milieu contenant de l'eau thermale de La Roche-Posay.

Ce fait est essentiel puisque la migration des cellules de Langerhans vers les ganglions lymphatiques est la première étape de la réponse immunitaire cutanée ;

> une réduction significative de l'expression des antigènes HLA-DR et des autres molécules co-stimulantes (B7-2 et ICMA-1) après incubation dans l'eau thermale de La Roche-Posay.

L'eau thermale de La Roche-Posay inhibe la migration des cellules de Langerhans sensibilisées et réduit l'expression des molécules d'activation HLA-DR, B7-2 et ICAM-1 contribuant ainsi à ses propriétés anti-inflammatoires.

4.2 Etudes *in vivo*.

D'autres études menées chez le rongeur dans le cadre d'essais contrôlés chez l'homme ont confirmé les propriétés de l'eau thermale de La Roche-Posay décrites *in vitro*.

4.2.1 Effet protecteur de l'application percutanée de l'eau thermale de La Roche-Posay vis-à-vis de la peroxydation lipidique et de la carcinogénèse cutanée, induites par les UVB.

R. Cadi², J.C. Béani², S. Belanger¹, M.J. Richard¹, A. Richard³, A. Favier², P. Amblard².

¹CHRUG de Grenoble (Laboratoire de biochimie C).

²CHRUG de Grenoble (Service de dermatologie).

³La Roche-Posay Laboratoire pharmaceutique (Cadi, 1991).

Reprenant les notions déjà exposées du rôle protecteur du sélénium par le biais de la glutathion peroxydase vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène, les auteurs ont étudié l'effet protecteur de l'application percutanée d'une crème à base d'eau thermale de La Roche-Posay, sur la peroxydation lipidique et la carcinogénèse cutanée induites par les UVB chez les souris hairless HRO.

> Matériels et méthodes.

Deux groupes de 15 à 16 rongeurs hairless HRO traités soit par une crème à base d'eau thermale de La Roche-Posay, soit par la même crème témoin à l'eau déminéralisée, ont été exposés à une quantité connue d'UVB pendant 25 semaines (3 fois / semaine à raison de 0.2J/cm² d'UVB).

Par ailleurs, ces rongeurs ont été comparés à un groupe contrôle constitué de rongeurs irradiés et/ou non traités par ces crèmes. Les crèmes sont appliquées 30 minutes avant et 5 minutes après chaque irradiation. Le développement de tumeur a été évalué une fois par semaine et le temps de latence T50 déterminé (nombre de semaines d'exposition pour que la moitié des rongeurs exprime au moins une tumeur photo-induite) ainsi que la T100 (nombre de semaines pour que tous les rongeurs expriment une tumeur photo-induite).

Par ailleurs, la peroxydation lipidique, par mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) et l'activité de la glutathion peroxydase (GPX), ont été mesurées à partir de biopsies.

> Résultats.

Les trois groupes témoins non irradiés n'ont pas développé de tumeur.
 Les trois groupes témoins irradiés ont développé des tumeurs (Tableau III) :
 Le taux de MDA témoins de la peroxydation lipidique augmentait de façon significative avec l'âge des rongeurs témoins ; doublait après 11 semaines d'irradiation.
 Par contre, il restait stable durant les 25 semaines d'irradiation chez les souris traitées avec la crème à l'eau thermale de La Roche-Posay.

L'activité GPX restait stable chez les rongeurs témoins et les rongeurs irradiés non traités par la crème à l'eau thermale de La Roche-Posay alors que dans le groupe traité par celle-ci, l'activité GPX augmentait significativement au cours du traitement.

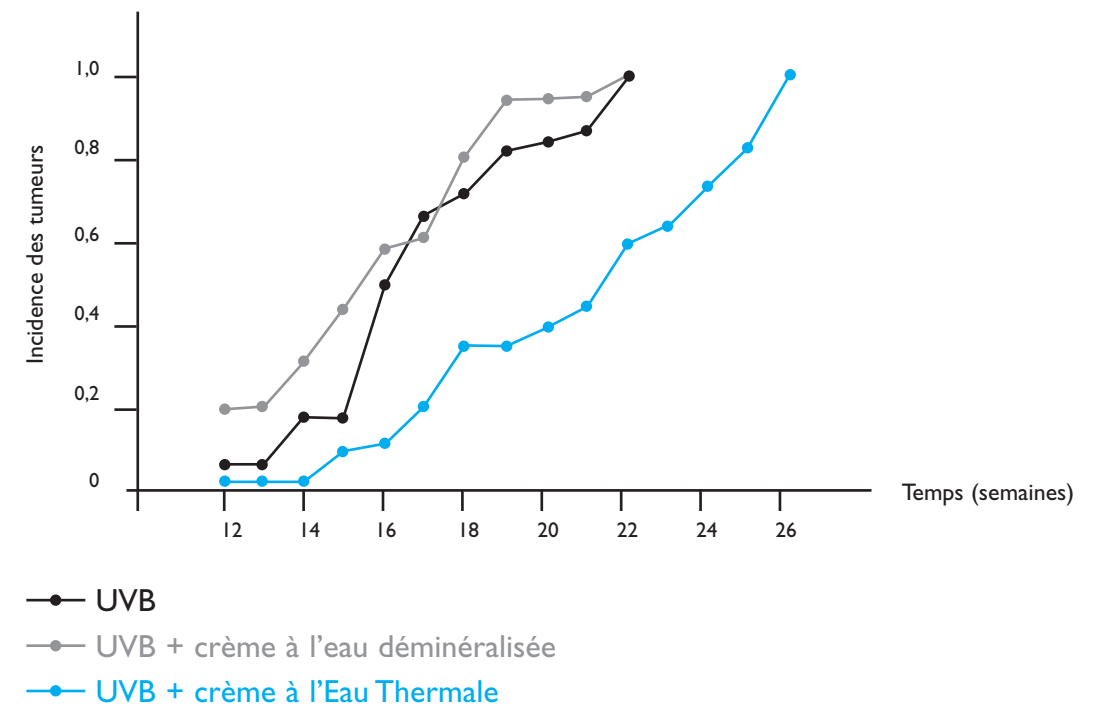


Figure 4 : Incidence des tumeurs après exposition aux UVB en fonction du traitement appliqué.

Groupes	Temps d'apparition de la première tumeur (semaine)	T50 (semaine)	T100 (semaine)
Irradié non traité	12	16	22
Irradié, traité par crème témoin	12	16	22
Irradié, traité par crème La Roche-Posay	15	22	26

Tableau III : Effet protecteur de l'eau thermale de La Roche-Posay vis-à-vis des tumeurs photo-induites par les UVB chez les souris Hairless.

L'application de crème à base d'eau thermale de La Roche-Posay avant et après chaque exposition, si elle n'a pas modifié l'incidence des tumeurs (type carcinome spinocellulaire), a retardé de 6 semaines leurs apparitions par rapport aux groupes témoins (Figure 4).

Cet effet pourrait être dû à la diminution de la peroxydation lipidique par une augmentation de l'activité GPX séléno-dépendante, confirmant des résultats obtenus *in vitro*. La peroxydation lipidique est objectivée par le taux de MDA qui est par ailleurs un agent cytotoxique et mutagène. Ce travail confirme les résultats d'autres travaux expérimentaux lesquels démontrant que le Se inhibe la phase d'initiation mais aussi de promotion de la carcinogenèse [Temple, 1987]. Il a aussi été démontré un effet inhibiteur réversible sur la croissance des cellules transformées [Medina, 1986]. Enfin l'administration concomitante de Se avec la vitamine E inhibe la photocarcinogenèse [Perchellet, 1987]. Pour certains auteurs, le rôle anticarcinogène du Se pourrait être relié à un contrôle direct sur la synthèse de l'ADN [Medina, 1983].

L'application percutanée de l'eau thermale de La Roche-Posay inhibe la peroxydation lipidique et retarde la carcinogenèse induite par les UVB.

4.2.2 Evaluation *in vivo* de l'activité anti-inflammatoire de 2 gels à base d'eau sur peau humaine.

V. Pornet, MC. Poelman. Faculté de pharmacie, Paris.

Le but de cette étude était de démontrer les effets anti-inflammatoires de l'eau thermale de la Roche-Posay chez le volontaire sain soumis à une irritation cutanée.

> Matériels et méthodes.

Chez 10 adultes volontaires sains a été appliqué 2 fois par jour pendant 4 jours, soit un gel à base d'eau thermale Roche-Posay soit un gel à base d'eau distillée. Une réaction inflammatoire a ensuite été provoquée par application de laurylsulfate de sodium (0,75% dans de l'eau déminéralisée) sous occlusion pendant 24 heures. Le flux sanguin cutané, proportionnel à l'inflammation locale, a ensuite été mesuré par vélocimétrie laser doppler.

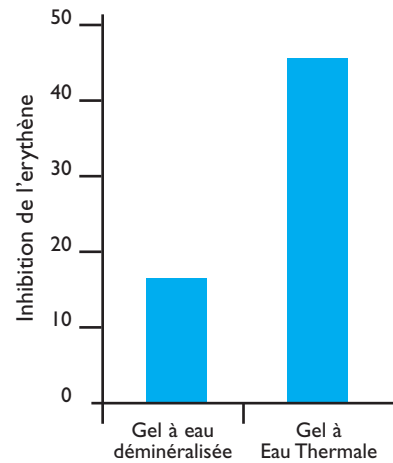


Figure 6 : Effet de l'eau thermale de La Roche-Posay sur l'inflammation cutanée.

> Résultats.

Il existe une inhibition de 46% de l'inflammation induite par le laurylsulfate de sodium lorsque la peau est pré-traitée par l'application de gel à l'eau thermale de La Roche-Posay, alors qu'elle n'est que de 16% avec un gel à l'eau distillée.

L'eau thermale de La Roche-Posay diminue significativement la réponse inflammatoire induite par le laurylsulfate de sodium chez l'homme sain.

4.2.3 Effet protecteur d'une eau thermale riche en sélénium sur les photodommages induits par les UVB chez l'homme.

A. Richard¹, D. Moyal², A. Rougier¹, JP. Césarini³.

¹La Roche-Posay Laboratoire pharmaceutique.

²Laboratoire de Recherche Appliquée de l'Oréal, Clichy.

³INSERM et Département de Dermatologie, Fondation A. de Rothschild, Paris.

Le but de cette étude randomisée en double insu est d'évaluer l'effet protecteur d'une formulation à l'eau thermale de La Roche-Posay sur les désordres cellulaires engendrés par les ultraviolets B.

> Matériels et méthodes.

Deux préparations :

> une crème à l'eau déminéralisée (82%),

> une crème à l'eau thermale de La Roche-Posay (82%)

ont été étudiées chez 10 volontaires des deux sexes, de phototype II et III, n'ayant pas reçu au niveau du dos de rayonnement ultraviolet, solaire ou artificiel, dans les 6 semaines précédant l'essai.

Les 2 crèmes ont été appliquées 1 fois par jour sur des zones randomisées sous les omoplates, à raison de 2 mg/cm², 7 jours de suite, sur une surface de 10 x 10 cm.

Le 8^{ème} jour, une irradiation a été effectuée pour déterminer la DEM et le 9^{ème} jour la DEM était interprétée.

Le 10^{ème} jour, une irradiation de l'ensemble des zones de 0,76 DEM à 1,69 DEM en progression de 1,25 a été faite.

Le 11^{ème} jour, l'évaluation visuelle et colorimétrique et le choix des zones pour prélèvement épidermique superficiel ont été effectués. Les biopsies sur la zone érythémale ont été pratiquées à isodose et à isoérythème par rapport à une troisième zone témoin non traitée. Après fixation au formol tamponné, les biopsies étaient traitées classiquement et les coupes en séries colorées en HES. Les lectures ont été effectuées par 2 lecteurs indépendamment (objectif x 40, oculaire x 10). Au moins 2 cm linéaires étaient examinés (15 sections alternées 2 à 2).

> Résultats.

> En moyenne, sur les 10 sujets, aucun des produits n'apporte de protection significative vis-à-vis de l'érythème. L'analyse des sunburn cells fait ressortir les résultats suivants (figure 7).

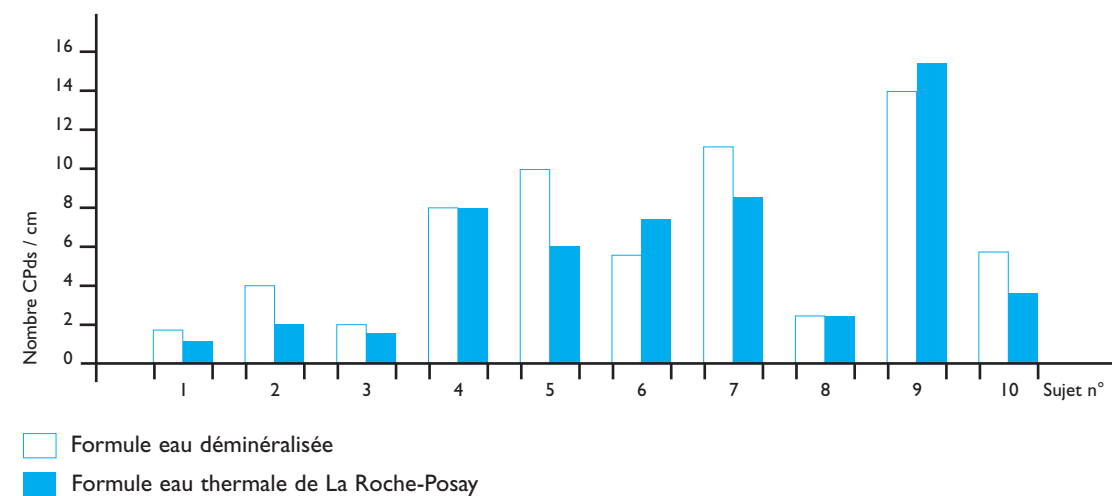


Figure 7 : Etude comparative d'un prétraitement à une émulsion contenant soit de l'eau déminéralisée, soit de l'eau thermale de La Roche-Posay sur le nombre de sunburn cells/cm linéaire d'épiderme, après irradiation à isodose d'UVB chez l'homme.

> Le nombre de sunburn cells ne suit pas une loi normale, mais celle-ci devient normale si l'on applique une transformation logarithmique.

Le test t en valeurs appariées fait ressortir les résultats suivants :

> Pour la préparation contenant de l'eau déminéralisée, il n'y a pas de différence avec le témoin, que ce soit à isodose ou à isoérythème ($p = 0,36$).

> Pour la préparation contenant de l'eau thermale de La Roche-Posay, il n'y a pas de différence avec le témoin, que ce soit à isodose ou à isoérythème ($p = 0,13$). En comparant les deux préparations, on n'observe pas d'effet significatif à isoérythème ($p = 0,18$) mais il y a, à isodose, une différence significative ($p = 0,04$) en faveur d'une réduction du nombre de sunburn cells par la préparation contenant de l'eau thermale de La Roche-Posay.

De cette expérience, on peut conclure que pour les doses UVB voisines de la DEM, un effet protecteur est exercé par le traitement de la peau pendant une semaine avec une préparation à base d'eau thermale de La Roche-Posay.



Avant traitement



Après traitement à l'eau thermale

4.2.4 Efficacité et tolérance de l'eau thermale de La Roche-Posay sur des blépharites non-infectieuses.

G. Sore¹, A. Richard¹, A. Rougier¹, M. Pericoi².

¹Laboratoires pharmaceutiques La Roche-Posay, Asnières, France.

²Laboratoire PERITESCO, Paris, France.

Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité et la tolérance de l'eau thermale de La Roche-Posay, lorsqu'elle est appliquée sur des pathologies péri-oculaires.

> Matériels et méthodes.

29 volontaires (27 femmes et 2 hommes) qui présentaient, soit une blépharite séborrhéique, soit une blépharite antérieure, soit une blépharite postérieure avec irritation conjonctivale, ont été inclus dans l'étude.

Deux fois par jour, une compresse imprégnée d'eau thermale de la Roche-Posay fut appliquée sur l'œil, pendant 4 semaines consécutives.

Aucun maquillage n'a été autorisé durant toute l'étude.

La tolérance oculaire a été évaluée à partir d'un examen clinique réalisé avant l'inclusion, puis 10 mm après la 1ère application, ainsi qu'à la fin de l'étude, et 10 mm après la dernière application.

> Evaluation objective.

- > Examen cutané péri-oculaire.
- > Examen au bio-microscope des structures oculaires.
- > Examens colorimétriques de la cornée et de la conjonctive.
- > Examen du film lacrymal au Tearscope.
- > Détermination de la concentration d'albumine dans les larmes.
- > Détermination du pH lacrymal.
- > Dosage d'IL 8.
- > Prélèvement micro-biologique au niveau du bord palpébral.
- > Photographies du bord palpébral.
- > Sébumétrie.

> Résultats.

L'eau thermale de la Roche-Posay :

- > n'a pas entraîné l'apparition de signe fonctionnel d'irritation ni de signe physique,
- > est non toxique sur l'épithélium cornéen, la conjonctive bulbaire, l'épithélium conjonctival et le bord palpébral.

D'autre part, l'eau thermale de La Roche-Posay :

- > ne modifie pas le taux d'albumine lacrymale,
- > n'induit pas la libération d'Interleukine 8 dans les larmes, après 1 mois d'utilisation,
- > n'augmente pas le pH lacrymal,
- > diminue la sécrétion lipidique du bord palpébral (de sujets à bord palpébral gras), mais ne la modifie pas chez ceux qui ont un bord palpébral sec,
- > diminue significativement le diamètre de glandes de Meibomius et en diminue la sécrétion chez 88 % des volontaires,
- > diminue significativement la présence de staphylocoques dorés sur la conjonctive.