



4.1 Etudes *in vitro*.

Ces études *in vitro* mettent en évidence les propriétés de l'eau de La Roche-Posay sur des cultures cellulaires humaines soumises à une agression.

Elles démontrent le rôle protecteur de l'eau de La Roche-Posay envers l'action des rayonnements ultraviolets et des substances oxydatives responsables de la formation de radicaux libres.

4.1.1 Effet antioxydant de l'eau thermale de La Roche-Posay sur des fibroblastes cutanés humains.

Les radicaux libres sont incriminés dans les altérations du métabolisme cellulaire aboutissant à la mort ou la mutation cellulaire.

Les vitamines et certains oligo-éléments contenus dans les tissus concourent à éliminer ces radicaux libres et forment ainsi un potentiel antioxydant modulant la durée de vie des cellules.

Parmi les moyens de défense, la glutathion peroxydase sélénodépendante est un puissant antioxydant endogène.

> Effet antioxydant de l'eau thermale sélénée sur des fibroblastes cutanés humains diploïdes.

MJ. Richard¹, P. Guiraud¹, J. Arnaud¹, R. Cadi¹, AM. Monjo¹, A. Richard³, P. Amblard², A. Favier¹.

¹CHRUG de Grenoble (Laboratoire de biochimie C)

²CHRUG de Grenoble (Service de dermatologie)

³La Roche-Posay Laboratoire pharmaceutique [Richard, 1990]

Dans cette étude, les auteurs visent à démontrer le rôle du sélénium contenu dans l'eau thermale de La Roche-Posay dans la protection des fibroblastes cutanés humains envers un stress génotoxique induit par le peroxyde d'hydrogène et les rayonnements UVB.

> Matériels et méthodes.

Trois souches de fibroblastes humains issus de biopsies cutanées ont été incubées à 37°C dans une atmosphère enrichie en CO₂ (7,5%) avec trois milieux de cultures différents reconstitués à partir d'eau distillée et d'eau thermale de La Roche-Posay issue de la source Mélusine contenant le sélénium.

Le milieu I était obtenu à partir d'eau distillée, le milieu III à partir d'eau thermale de La Roche-Posay et le milieu II à partir du milieu I enrichi en Se par ajout de sélénite de sodium afin d'obtenir une concentration en Se comparable au milieu III.

Chaque milieu était ensuite additionné de sérum de veau foetal (10%) pour obtenir des concentrations finales de Se détaillées dans le [tableau I](#) :

L'analyse a porté sur la teneur en oligoéléments, l'activité glutathion peroxydase séléno-dépendante (GPX), superoxyde dismutase et la peroxydation lipidique après lavage et broyage des cultures cellulaires.

L'induction du stress oxydant a été réalisée d'une part par le peroxyde d'hydrogène (1.5×10^{-4} M) et d'autre part par un rayonnement ultraviolet de type B (0.12 joules/cm², 3 jours de suite).

Deux points de mesure ont été effectués pour chaque souche et chaque milieu. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins non irradiées.

Milieux Sélénium (Se) µg/L

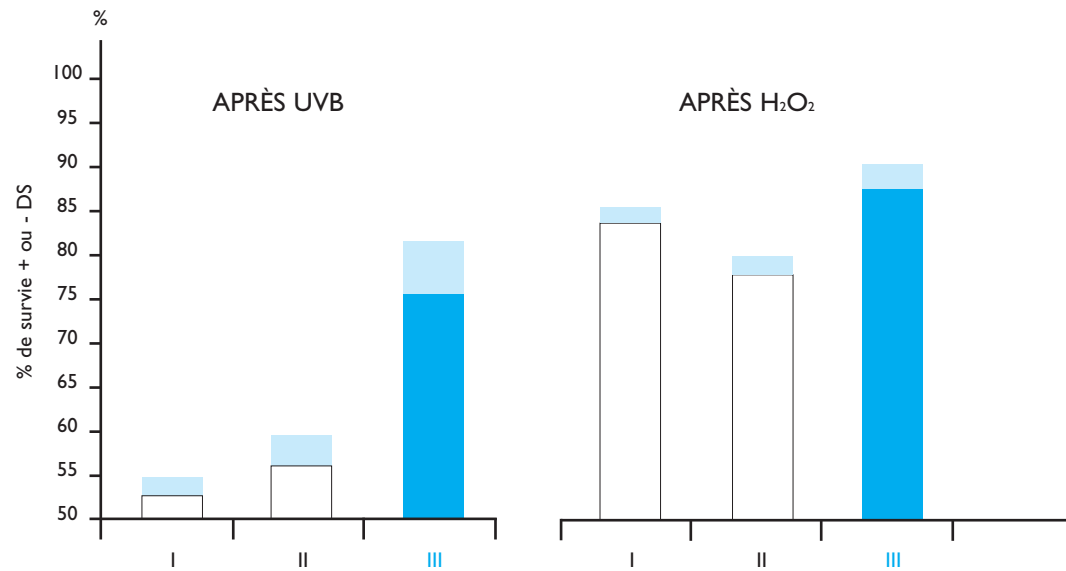
I Milieu témoin	52
II Milieu sélénié	102
III Milieu Roche-Posay	90

Tableau I : Concentration en Se des différents milieux d'incubation.

> Résultats.

Les résultats montrent que, quel que soit le milieu utilisé, les courbes de croissance cellulaire sont identiques.

Les teneurs en oligo-élément des fibroblastes diffèrent selon les milieux de culture utilisés, avec un maximum pour le milieu reconstitué à partir d'eau thermale de La Roche-Posay.



Milieu I : Eau déminéralisée (Se = 52 µg/l)
Milieu II : Milieu sélénié (Se = 102 µg/l)
Milieu III : eau thermale La Roche-Posay (Se = 90 µg/l)

Figure 1 : Pourcentage de survie des fibroblastes après action cumulative des UVB (3 irradiations de 0,12 J/cm²) ou adjonction d'H₂O₂ (1,5*10⁻⁴ M).

L'activité comparée de la GPX entre les milieux I et II est proportionnelle à la concentration en Se.

Bien que les concentrations en Se soient comparables entre les milieux II et III, les activités GPX diffèrent.

L'activité superoxyde dismutase fibroblastique est supérieure pour le milieu III de l'eau thermale de La Roche-Posay comme le montre le [tableau II](#).

Après le stress radicalaire, induit par le peroxyde d'hydrogène ou le rayonnement UVB, l'effet cellulaire létal était significativement moindre pour les fibroblastes issus du milieu III contenant l'eau thermale de La Roche-Posay.

Souches	Milieu I	Milieu II	Milieu III La Roche Posay
Souche A			
Se	0,088	0,141	0,295
GPX	117	161	-
SOD	2,3	2	-
Souche B			
Se	0,073	0,061	0,187
GPX	153	217	128
SOD	1,8	2,2	5,8
Souche C			
Se	0,068	0,063	0,417
GPX	128	187	110
SOD	2,1	1,8	3,1

Tableau II : Teneur en Se des fibroblastes (en ng/mg de protéines solubles), activité GPX (en GPX/µM/mn/g prot. NADPH oxydé) et superoxyde dismutase (SOD en SOD/µg/mg Prot.) en fonction du milieu d'incubation.

Le vieillissement cellulaire est probablement le résultat d'une accumulation progressive de dégradations causées par les radicaux libres résultant de nombreuses réactions intracellulaires (oxygène singulet, radical superoxyde et hydroxyle et peroxydes). Comme le démontre ce travail, les mécanismes de réparations et en particulier ceux faisant appel aux oligo-éléments permettent de retarder l'effet létal. Les fibroblastes humains incubés dans un milieu composé de l'eau thermale de La Roche-Posay survivent de façon significativement plus importante après exposition aux UVB ou au peroxyde d'hydrogène. Les auteurs exposent en premier lieu l'hypothèse du rôle majeur du Se. En effet, il est démontré que la production de GPX est proportionnelle à l'apport en Se [COMBS, 1986].

Or la GPX prévient la formation de radicaux libres [URSINI, 1987].

La supplémentation en Se dans le milieu II augmente l'activité GPX mais pas la survie des cellules face au stress oxydant.

La GPX ne serait alors qu'un maillon de la chaîne antiradicalaire aux côtés de la superoxyde dismutase, des vitamines A et E, des aminoacides soufrés. Les auteurs confirment dans cette étude la présence d'un métabolisme du Se complexe en fonction de la forme organique ou minérale [FAVIER, 1988].

En effet si les teneurs en Se des milieux II et III sont comparables, il n'en est pas de même pour les teneurs intracellulaires, sans augmentation toutefois de l'activité GPX, suggérant une autre forme organique de stockage du Se.

Ce travail démontre *in vitro* le rôle protecteur antiradicalaire de l'eau thermale de La Roche-Posay sur des fibroblastes humains soumis à un stress oxydant producteur de radicaux libres responsables du vieillissement et de la dégradation cellulaire prématurés.

> Effets du sélénium sur la peroxydation lipidique induite par les UVA sur une culture de fibroblastes cutanés humains.

A. Moysan¹, P. Morlière¹, I. Marquis¹, A. Richard³, L. Dubertret^{1, 2}.

¹Laboratoire de dermatologie, INSERM U-312, Hôpital Henri Mondor

²Service de dermatologie, INSERM U-312, Hôpital Saint Louis, Paris

³La Roche-Posay Laboratoire pharmaceutique [Moysan, 1995]

Cette deuxième étude *in vitro*, reprenant la notion de protection antioxydante de la glutathion peroxydase séléno-dépendante, étudie le potentiel antioxydant du sélénium et de l'eau thermale de La Roche-Posay dans le contrôle de la peroxydation lipidique et des effets létaux induits par les UVA.

> Matériels et méthodes.

Les fibroblastes cutanés humains provenant de plusieurs donneurs ont été incubés dans différents milieux de cultures reconstitués à partir d'un milieu de base contenant des acides aminés, des vitamines et une solution tampon saline (EMEM) et une concentration variable de sang de veau foetal contenant du Se :

> EMEM + 10% de sérum de veau foetal (SVF) = S10

> EMEM + 10% de sérum de veau foetal + sélénite de sodium (56µg/l) = S10 + Se

> EMEM + 10% de sérum de veau foetal + eau thermale de La Roche-Posay = S10 + LRP

> EMEM + 2% de sérum de veau foetal = S2

> EMEM + 2% de sérum de veau foetal + sélénite de sodium (56µg/l) = S2 + Se

> EMEM + 2% de sérum de veau foetal + eau thermale de La Roche-Posay = S2 + LRP

Tous les milieux enrichis contenaient au total 320 nM de sélénium.

L'irradiation par les UVA a consisté en une exposition d'intensité de 360KJ/m².

Les tests de viabilité cellulaire ont été effectués trois jours après l'exposition.

Pendant ce laps de temps les cellules étaient incubées dans leurs milieux de culture respectifs à 37°C.

Les activités de la glutathion peroxydase (GPX), de la superoxyde dismutase (SOD), des catalases ainsi que le TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) comme index de la peroxydation lipidique [MORLIÈRE, 1991] étaient mesurées avant et après l'exposition aux UVA.

> Résultats.

Après exposition aux UVA les taux de survie des fibroblastes en division, l'activité GPX et TBARS sont donnés en fonction des différents milieux dans la [figure 2a](#) et [2b](#).

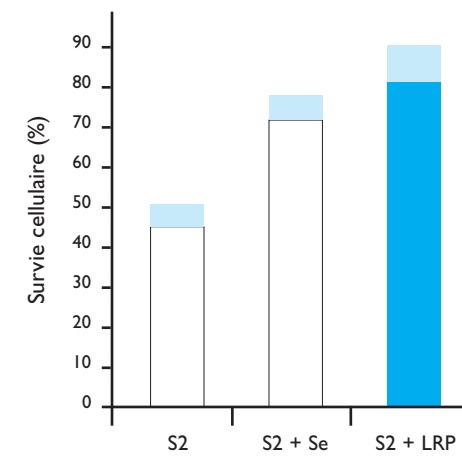


Figure 2a : Effets protecteurs du sélénium et de l'eau thermale de La Roche-Posay sur la survie de fibroblastes humains en culture soumis à une irradiation UVA (moy ± DS)

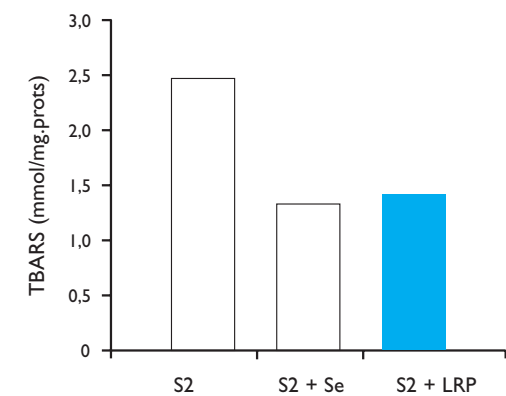
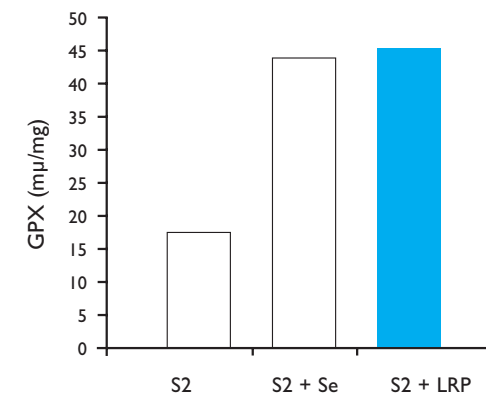


Figure 2b : Effets du sélénium et de l'eau thermale de La Roche-Posay sur la peroxydation lipidique (TBARS) et l'activité glutathion peroxydase (GPX) (moy ± DS)

Les résultats montrent une plus grande sensibilité des fibroblastes humains aux effets létaux de l'exposition aux UVA lorsqu'ils sont incubés dans un milieu pauvre en sélénium.

Cet effet est plus marqué pour les cellules en division que pour les cellules quiescentes. Ces effets délétères sont significativement corrigés par l'adjonction de Se ou d'eau thermale de La Roche-Posay.

L'activité de la GPX des cellules quiescentes est plus importante dans le milieu SFV 10% que dans le SFV 2%, différence corrigée par l'adjonction de Se ou d'eau de La Roche-Posay. Il existe donc un effet protecteur du Se contre les effets délétères des UVA sur les fibroblastes cutanés.

Cet effet est corrélé à la teneur en Se du milieu et donc des cellules étudiées, comme le démontre l'adjonction de sélénite et d'eau thermale de la Roche-Posay. De plus il augmente l'activité GPX des cellules quiescentes, les rendant moins sensibles à la peroxydation lipidique. Cette sensibilité accrue des fibroblastes cutanés lorsque l'activité GPX est faible, constitue un fait important en raison de l'application clinique et thérapeutique de l'eau thermale de La Roche-Posay dans le traitement des dermatoses en relation avec une GPX déficiente, ou comme protecteur anti-UV.

L'eau thermale de La Roche-Posay de par sa teneur exceptionnelle en sélénium exerce un effet protecteur sur les fibroblastes soumis à un rayonnement UVA.