

**Note de vulgarisation
des rapports d'étude 20E5076, 21E5272 et 21E5273**
Selon les plans d'étude D19-732-1, D21-0417 et D21-0412

**Evaluation de l'effet de l'hyperionisation d'une eau de ville, par une
étude génomique sur explants de peau humaine *ex vivo***

Produit testé **Eau de ville +/- hyperionisée**
Dispositif d'hyperionisation
Sublio Ionic WaterBox *pro*

Donneur d'ordre **SUBLIO France**
M. Frédéric Esnault
8 rue René Coty
85018 La Roche-sur-Yon Cedex
frederic@sublio.com

Installation d'essai **BIO-EC**
1, Chemin de Saulxier
91160 Longjumeau
FRANCE
Tél : +33 (0)1 69 41 42 21
Email : info@bio-ec.fr
www.bio-ec.fr

Table des matières

ETUDE	2
PRODUITS TESTES.....	3
MATERIELS & METHODES	3
RESULTATS.....	4
1. Contrôle de la morphologie.....	4
2. Etude génomique	4
CONCLUSION	10

ETUDES

Trois études ont été conduites pour évaluer l'effet de l'hyperionisation d'une eau de ville par le dispositif Sublio Ionic WaterBox *Pro*.

Une première étude identifiée 20E5076, a été réalisée en 2020 sur un premier donneur et a fait l'objet d'une étude génomique des 23 000 gènes par microarray.
Après sélection de 10 gènes d'intérêts, une étude par analyse Rt-qPCR a été réalisée.

Une deuxième étude identifiée 21E5273, a été réalisée sur un deuxième donneur et a fait l'objet d'une étude génomique par analyse Rt-qPCR des 10 gènes d'intérêts sélectionnés suite à la première étude.

Une troisième étude identifiée 21E5272, a été réalisée sur un troisième donneur et a fait l'objet d'une étude génomique par analyse Rt-qPCR des 10 gènes d'intérêts sélectionnés suite à la première étude.

Ces études ont fait l'objet de rapports d'étude complets et détaillés sous les références 20E5076, 21E5372 et 21E5173 ; remis à SUBLIO France, seul propriétaire de ces résultats.

Partenaire sous-traitant
ayant réalisé les phases génomiques

Laboratoire Genex
1, Chemin de Saulxier
91160 Longjumeau

PRODUITS TESTES

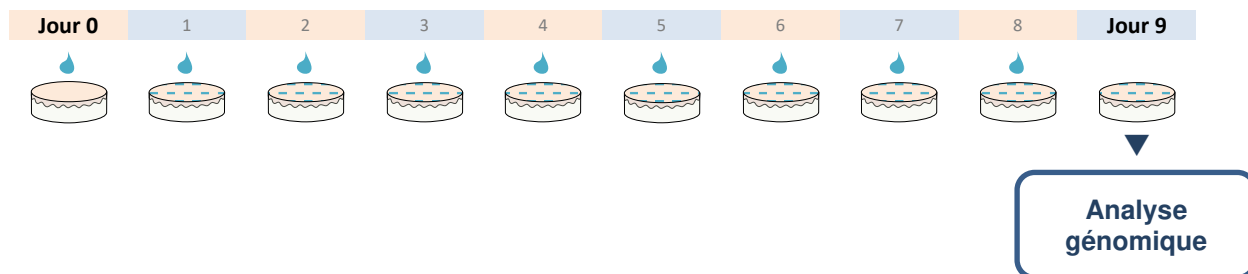
- P1 Eau de ville (Longjumeau, France), stérilisée par filtration à 0,22µm.
- P2 Eau de ville (Longjumeau, France), stérilisée par filtration à 0,22µm et hyperionisée grâce au dispositif Sublio Ionic WaterBox *Pro* fourni par la société SUBLIO France.

MATERIELS & METHODES

Les trois études ont été réalisées selon le même mode opératoire.

- 20E5076 Donneur 1 : femme de type caucasien âgée de 59 ans
- 21E5373 Donneur 2 : femme de type caucasien âgée de 45 ans
- 21E5172 Donneur 3 : femme de type caucasien âgée de 54 ans

Le principe de l'étude est d'appliquer quotidiennement de l'eau (hyperionisée ou non) sur des explants de peau humaine maintenus en survie pendant 9 jours. Ensuite, une étude génomique a été conduite par le laboratoire Genex pour évaluer l'expression de 10 gènes stimulés ou réprimés par le traitement.



Après 9 jours de traitement (2µL/explant), les explants sont prélevés et fixés dans du RNAlater pour préserver les ARN.

Après extraction des ARN, la quantité et la qualité des extraits ont été contrôlées.

Les ARNm extraits ont été rétro-transcrits (iScript, Bio-Rad) en ADNc. Ces derniers ont été analysés et semi-quantifiés par qPCR (iTaq, Bio-Rad) pour évaluer 10 gènes d'intérêt.

Une étude histologique a été réalisée en parallèle pour contrôler la morphologie cellulaire et tissulaire.

RESULTATS

1. Contrôle de la morphologie

Après 9 jours de traitement, l'eau de ville (P1) est bien tolérée par la peau.

L'eau de ville hyperionisée grâce au dispositif Sublio Ionic WaterBox *pro* fourni par la société SUBLIO France (P2) est également bien tolérée après 9 jours.

Ces résultats sont identiques sur les trois donneurs.

L'hyperionisation n'entraîne aucune modification de la tolérance cutanée de l'eau de ville.

2. Etude génomique

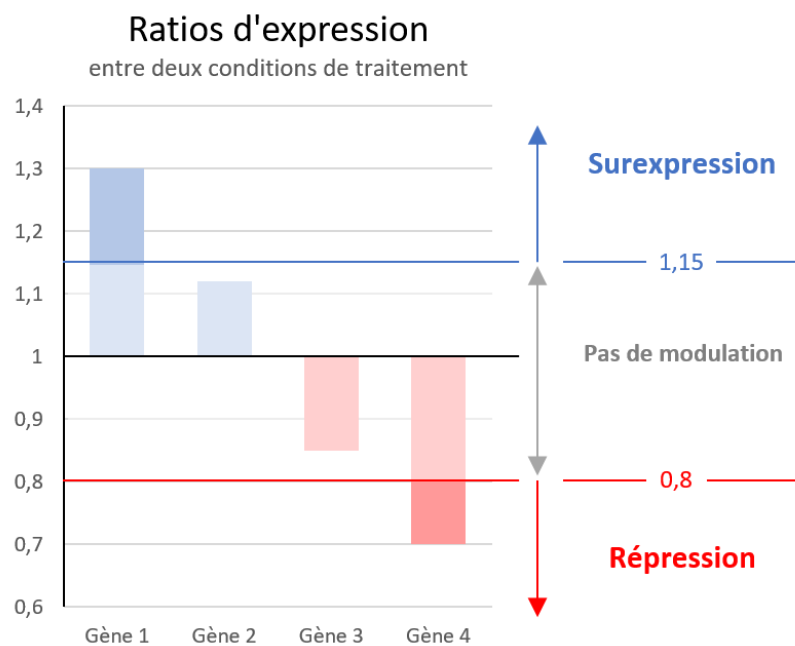
Le tableau ci-dessous regroupe le symbole et le nom de chaque gène d'intérêt (sélectionnés pour l'étude, à partir des résultats de la précédente étude de génomique 20E5076) avec leur efficacité en qPCR respective, ainsi que les fonctions biologiques associées. Deux gènes contrôles dit « de ménage » (house keeping : **B2M** et **GAPDH**) et un contrôle RT (reverse transcriptase) sont également inclus lors de cette évaluation.

gène	nom	efficacité en qPCR	Fonction
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2, exonic	94%	Inflammation médiateur de l'inflammation
FLG	filaggrin	98%	Barrière cutanée Impliqué dans la différenciation des kératinocytes en cornéocytes et la formation des FNH
HMOX1	heme oxygenase 1	90%	Stress oxydatif Enzyme détoxifiante
IVL	involucrin	96%	Barrière cutanée Impliqué dans la différenciation des kératinocytes en cornéocytes
KLK8	kallikrein-related peptidase 8, exonic	100%	Barrière cutanée impliqué dans la desquamation
KRT15	keratin 15, exonic	95%	Stimulation épidermique cytokératine spécifique de la couche germinative de l'épiderme
LOR	loricrin (exonic)	102%	Barrière cutanée Impliqué dans la différenciation des kératinocytes en cornéocytes
PADI1	peptidyl arginine deiminase, type I, exonic	98%	Barrière cutanée Impliqué dans la formation des NMF
SPRR3	small proline-rich protein 3, exonic	99%	Barrière cutanée Impliqué dans la différenciation des kératinocytes en cornéocytes
TGM1	transglutaminase 1, intron-spanning	98%	Barrière cutanée Impliqué dans la différenciation des kératinocytes en cornéocytes
B2M	house keeping	98%	
GAPDH	house keeping (exonic)	97%	

L'évaluation des gènes de ménages B2M et GAPDH montre une amplification stable et de très bonne qualité.

Une moyenne a été déduite des valeurs issues des 3 explants du même donneur (groupes biologiques) après normalisation avec les valeurs des gènes de référence. Pour chaque gène d'intérêt, un ratio entre les différentes conditions de traitement a été calculé.

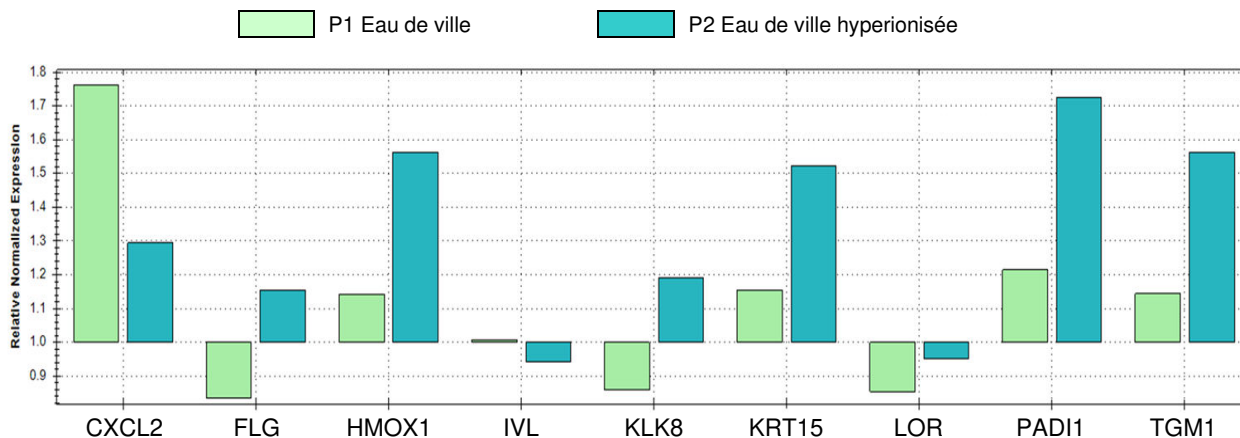
Ainsi ces ratios permettent de visualiser l'effet de l'hyper-ionisation sur les eaux. Nous avons choisi comme seuil de modulation une valeur supérieure à 1,15 pour définir une expression induite et inférieure à 0,8 pour une expression réprimée.



Le gène **SPRR3** n'a pas été exploité car il a été retrouvé trop faiblement exprimé.

3. Activité de l'eau de ville ± hyperionisée, 1^{er} donneur (20E5073)

Ratios d'expression entre la moyenne des valeurs d'expression pour eau de ville (P1) ou eau de ville hyperionisée (P2) versus contrôle (T), à J9.



Comparaison P2 ■ vs P1 ■ Donneur 1								
CXCL2	FLG	HMOX1	IVL	KLK8	KRT15	LOR	PADI1	TGM1
↘	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗	↗

Sur le donneur 1, l'eau de ville (■) induit une augmentation de l'inflammation (CXCL2) et des gènes liés à la formation des FNH (facteurs naturels d'Hydratation) en augmentant l'expression de PADI1.

Elle stimule également le renouvellement épidermique (KRT15).

Les autres gènes ne sont pas modulés.

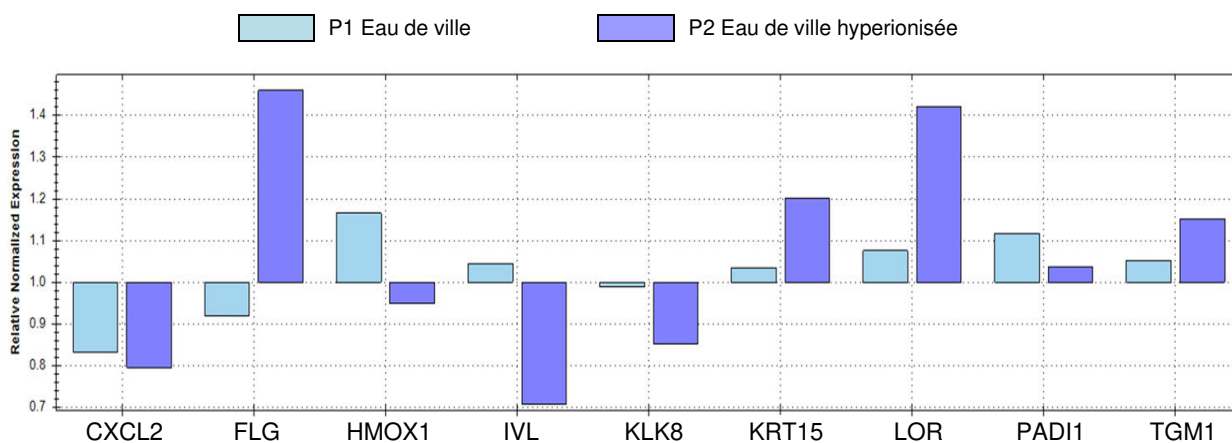
L'eau de ville hyperionisée (■) réduit significativement l'inflammation (CXCL2) et augmente significativement les gènes associés à régulation de la barrière cutanée (FLG, KLK8, PADI1, TGM1).

Elle stimule encore plus fortement le renouvellement épidermique (KRT15).

Elle augmente également l'expression du gène HMOX1 qui a des propriétés antioxydantes. De plus, la capacité d'HMOX1 à métaboliser l'hème en monoxyde de carbone lui confère également des propriétés anti-inflammatoires.

4. Activité de l'eau de ville ± hyperionisée, 2^{ème} donneur (21E5273)

Ratios d'expression entre la moyenne des valeurs d'expression pour eau de ville (P1) ou eau de ville hyperionisée (P2) versus contrôle (T), à J9.



Comparaison P2 ■ vs P1 ■ Donneur 2								
CXCL2	FLG	HMOX1	IVL	KLK8	KRT15	LOR	PADI1	TGM1
↔	↗	↘	↘	↘	↗	↗	↘	↗

Sur le donneur 2, l'eau de ville (■) induit une légère augmentation du gène HMOX1 lié aux défenses antioxydantes.

Les autres gènes ne sont pas significativement modulés.

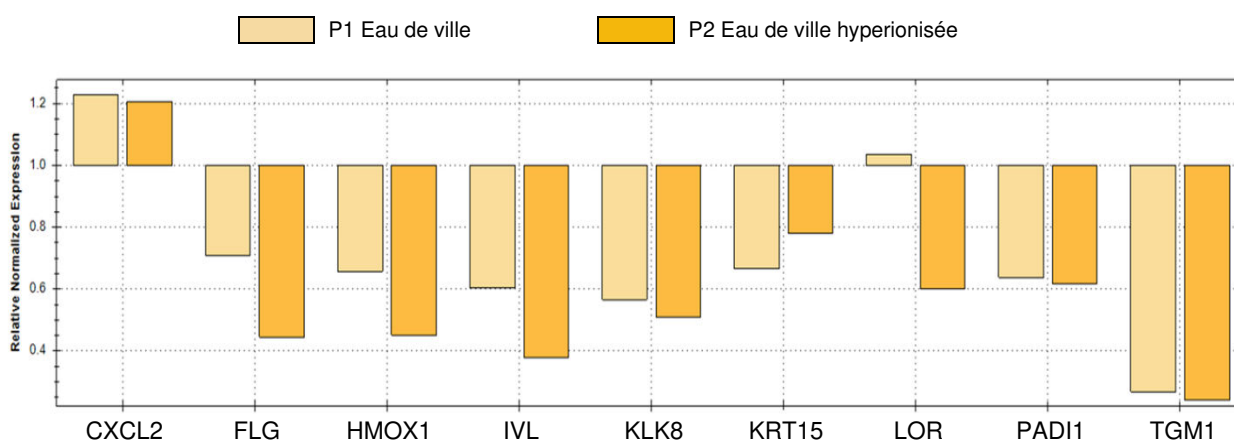
L'eau de ville hyperionisée (■) augmente significativement les gènes associés à la formation et à la régulation la barrière cutanée (FLG, LOR).

Elle stimule également le renouvellement épidermique (KRT15).

Cependant, elle réduit l'expression du gène de l'involucrine.

5. Activité de l'eau de ville ± hyperionisée, 3^{ème} donneur (21E5272)

Ratios d'expression entre la moyenne des valeurs d'expression pour eau de ville (P1) et ou eau de ville hyperionisée (P2) versus contrôle (T), à J9.



Comparaison P2 ■ vs P1 ■ Donneur 3

CXCL2	FLG	HMOX1	IVL	KLK8	KRT15	LOR	PADI1	TGM1
↔	↘	↘	↘	↔	↗	↘	↔	↔

Sur ce donneur, l'eau de ville (■) induit une augmentation significative de l'inflammation (CXCL2) et une diminution significative des gènes liés à la formation et à la régulation de la barrière cutanée (FLG, IVL, KLK8, PADI1 et TGM1).

De plus, elle diminue le renouvellement épidermique (KRT15) et le niveau basal de stress oxydatif (HMOX1). Les autres gènes ne sont pas modulés.

L'eau de ville hyperionisée (■) amplifie la diminution des gènes liés à la formation et à la régulation de la barrière cutanée (FLG, IVL et LOR).

Elle amplifie la diminution du stress oxydatif (HMOX1) et stimule également le renouvellement épidermique (KRT15).

Il a été préalablement démontré que le processus débute par un stress osmotique modéré induisant une inflammation ménagée qui s'estompe par la suite, permettant l'établissement d'une différenciation et en conséquence la régénération du tissu cutané.

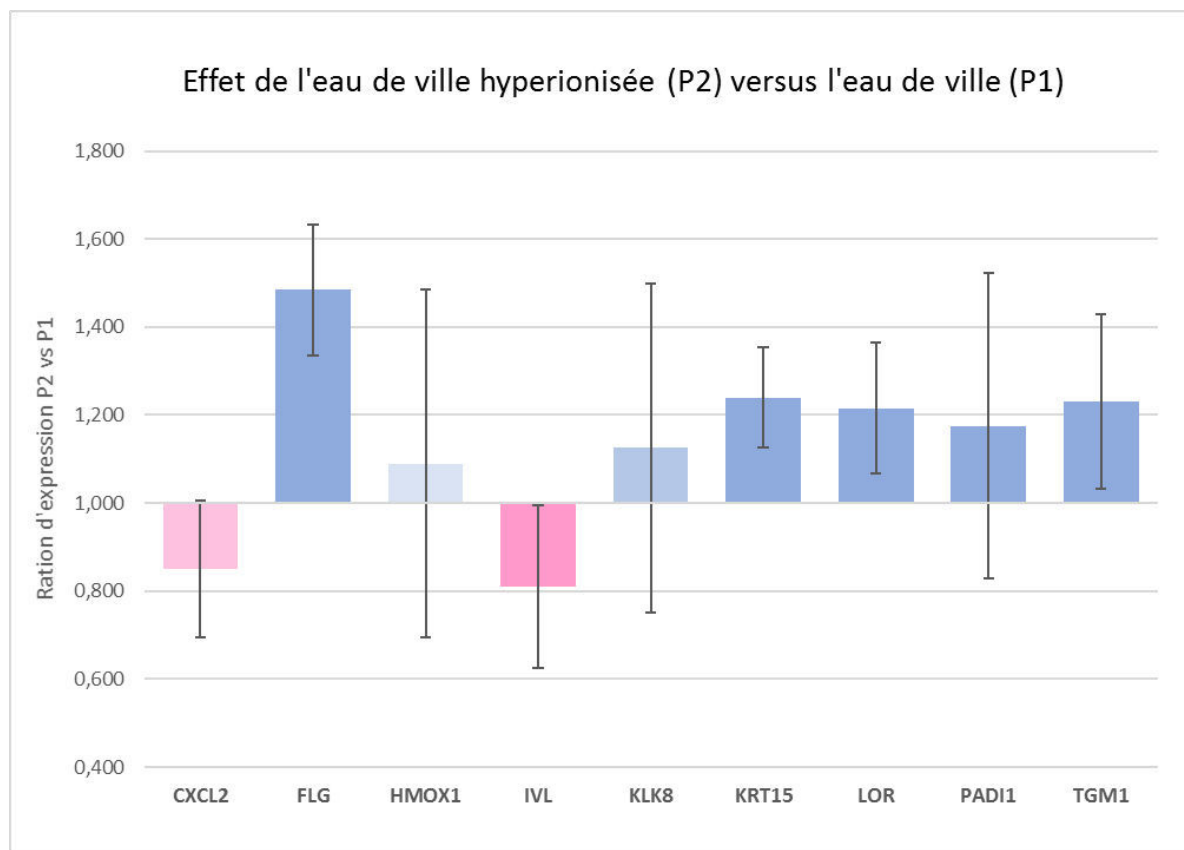
Pour ce donneur, il apparaît que la cinétique d'activité de l'eau et de l'eau hyperionisée est décalée. En effet, le profil de modulation des gènes montre que la phase initiale d'inflammation n'est pas encore terminée et que la phase d'activation de la régénération tissulaire n'est pas encore initiée.

DISCUSSION

Cette étude, concerne l'évaluation de l'eau de ville hyperionisée sur trois donneurs. Cependant, comme expliqué précédemment, le troisième donneur présentant une cinétique de modulation décalée, la conclusion ne portera que sur les deux premiers donneurs.

Ratios d'expression moyens
Eau de ville hyperionisée (P2) versus Eau de ville (P1), à J9.

	CXCL2	FLG	HMOX1	IVL	KLK8	KRT15	LOR	PADI1	TGM1
Modulation	↘	↗	↔	↘	↗	↗	↗	↗	↗
Moyenne	0,85	1,49	1,09	0,81	1,13	1,24	1,22	1,18	1,23
Ecart Type	0,16	0,15	0,40	0,18	0,37	0,11	0,15	0,35	0,20



L'hyperionisation de l'eau de ville permet d'une part de diminuer le niveau d'inflammation (CXCL2) et de moduler l'expression de l'involucrine.

D'autre part, l'hyperionisation permet d'augmenter des marqueurs impliqués dans la formation du stratum corneum qui est le principal acteur de la barrière cutanée. La filaggrine (FLG), la loricrin (LOR) et la transglutaminase membranaire (TGM1) interviennent dans la différenciation terminale des kératinocytes en cornéocytes et dans la formation des enveloppes cornées, assurant ainsi, résistance et souplesse au stratum corneum.

La déiminase (PADI1) participe à la transformation de la filaggrine en facteur naturels d'hydratation (FNH : stock d'acides aminés capables de fixer l'eau) assurant une bonne hydratation du stratum corneum.

La kalikréine 8 (KLK8) est une enzyme permettant le détachement des cornéocytes de surface, participant ainsi à la régulation de la desquamation.

L'hyperionisation de l'eau de ville augmentent également l'expression du gène codant pour la cytokératine 15 (KRT15) qui est une kératine spécifique des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme (siège des divisions cellulaires). Elle est également un des marqueurs des cellules souches épidermique et dermique. La kératine 15 est donc impliquée dans le renouvellement épidermique.

CONCLUSION

Dans ces conditions opératoires, les résultats obtenus démontrent clairement que l'hyperionisation d'une eau de ville (Longjumeau) grâce au dispositif Sublio Ionic WaterBox *pro*, permet d'atténuer significativement le niveau basal d'inflammation.

L'eau hyperionisée stimule notablement de nombreux gènes liés à la formation et au maintien de la barrière cutanée.

De plus, elle induit significativement la mise en œuvre du renouvellement épidermique.