Note de vulgarisation du rapport d'étude 21E5273 SUBLIO
Selon le plan d'étude **D21-0412**

Exploration de l'activité d'une eau de ville et de l'eau thermale de Balaruc-les-Bains hyperionisées Sublio, par une étude génomique sur explants de peau humaine ex vivo

Produit testé	**Dispositif Sublio Ionic WaterBox *pro*** **Eau de ville de Longjumeau +/- hyperionisée** **Eau thermale de Balaruc-les-Bains +/- hyperionisée**

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 8

ETUDE

Cette étude a fait l'objet d'un rapport d'étude complet et détaillé sous la référence 21E5273, remis à SUBLIO France, seul propriétaire de ces résultats.

Date de **début d'étude**	25 juin 2021
Date de **fin d'étude technique**	21 septembre 2021
Partenaires sous-traitants ayant réalisé la phase génomique	**Laboratoire Genex** 1, Chemin de Saulxier 91160 Longjumeau

Cette étude comporte une étude *ex vivo* avec les produit P1 et P2 (soit le deuxième donneur pour l'eau de ville) et l'eau thermal de Balaruc-les-Bains, P3 et P4 et une étude génomique avec une analyse en RT-qPCR des échantillons de cette étude et ceux de l'étude 20E5076 (P1 et P2 du donneur 1)

PRODUITS TESTES

P1 Eau (ville de Longjumeau), stérilisée par filtration à 0,22µm.

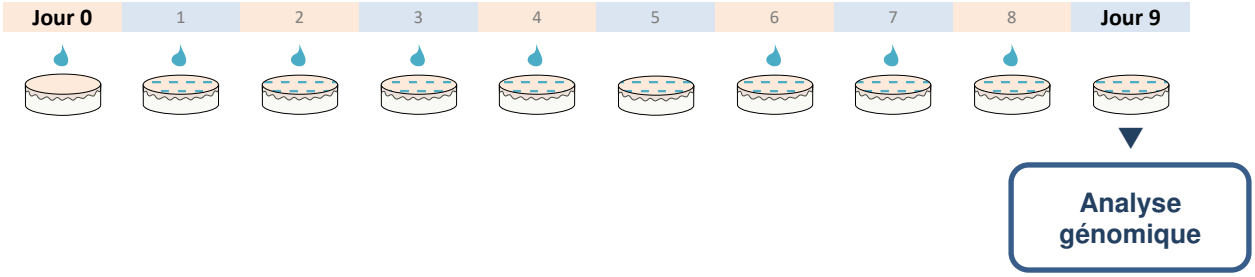
P2 Eau (ville de Longjumeau), stérilisée par filtration à 0,22µm et hyperionisée grâce au dispositif Sublio Ionic WaterBox *Pro* fourni par la société SUBLIO France.

P3 Eau de Balaruc-les-Bains fournie par la société SUBLIO France, stérilisée par filtration à 0,22µm (stocké à 4°C et utilisée dans les 48h après prélèvement).

P4 Eau de Balaruc-les-Bains fournie par la société SUBLIO France, stérilisée par filtration à 0,22µm et hyperionisée grâce au dispositif Sublio Ionic WaterBox *Pro* fourni par la société SUBLIO France.

MATERIELS & METHODES

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, la quantité et la qualité des ARN a été contrôlée.

Les ARNm extraits ont été rétro-transcrits (iScript, Bio-Rad) en ADNc. Ce dernier a été analysé et semi-quantifié 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.

Les échantillons de l'étude 20E5076, réalisée dans les mêmes conditions (eau de ville ± hyperionisée sur un 1er donneur), ont été ajoutés à l'analyse génomique de cette étude (2ème donneur).

RESULTATS

1. Contrôle de la morphologie

Après 9 jours de traitement, l'eau de ville de Longjumeau (P1) et l'eau de Balaruc-les-Bains (P3) sont bien tolérées par la peau.

De plus, ces eaux hyper-ionisées grâce au dispositif Sublio Ionic WaterBox *pro* fourni par la société SUBLIO France, à savoir l'eau de ville de Longjumeau hyperionisée (P2) et l'eau de Balaruc-les-Bains hyperionisée (P4) sont aussi bien tolérées après 9 jours.

L'hyper-ionisation n'entraine aucune modification de la tolérance cutanée de ces eaux de ville et eau de Balaruc-les-Bains

2. Etude génomique

Liste des 10 gènes marqueurs sélectionnés pour l'étude, à partir des résultats de la précédente étude de génomique 20E5076.
Deux gènes contrôle dit « de ménage » (B2M et GAPDH) et un contrôle RT avec leur efficacité en qPCR respective.

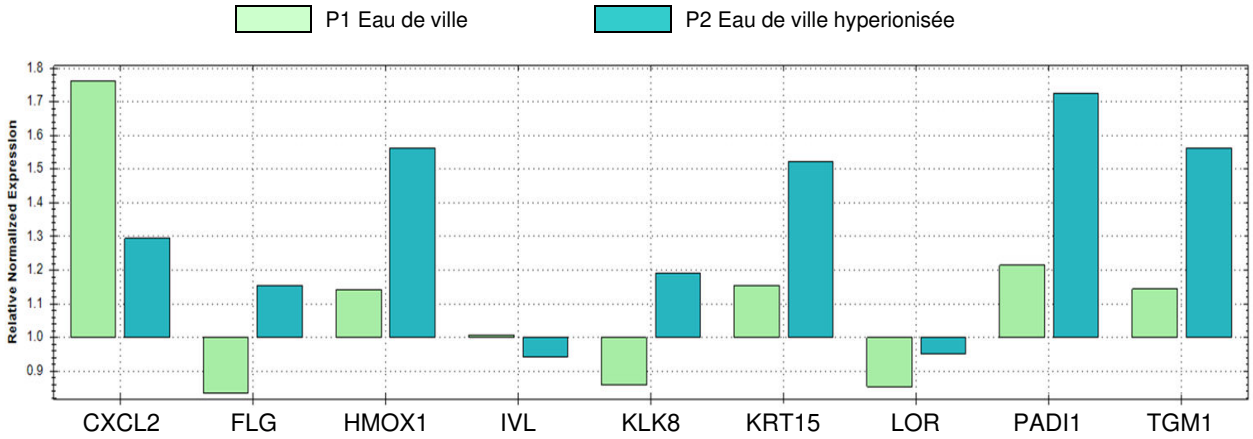
gène	nom	efficacité en qPCR	Fonction
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2, exonic	94%	
FLG	filaggrin	98%	
HMOX1	heme oxygenase 1	90%	
IVL	involucrin	96%	
KLK8	kallikrein-related peptidase 8, exonic	100%	
KRT15	keratin 15, exonic	95%	
LOR	loricrin (exonic)	102%	
PADI1	peptidyl arginine deiminase, type I, exonic	98%	
SPRR3	small proline-rich protein 3, exonic	99%	
TGM1	transglutaminase 1, intron-spanning	98%	
B2M	house keeping	98%	
GAPDH	house keeping (exonic)	97%	

L'évaluation des gènes de ménages B2M et GAPDH montre une amplification 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.

Activité de l'eau de ville ± hyperionisée (1er donneur 1 = 20E5073)

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



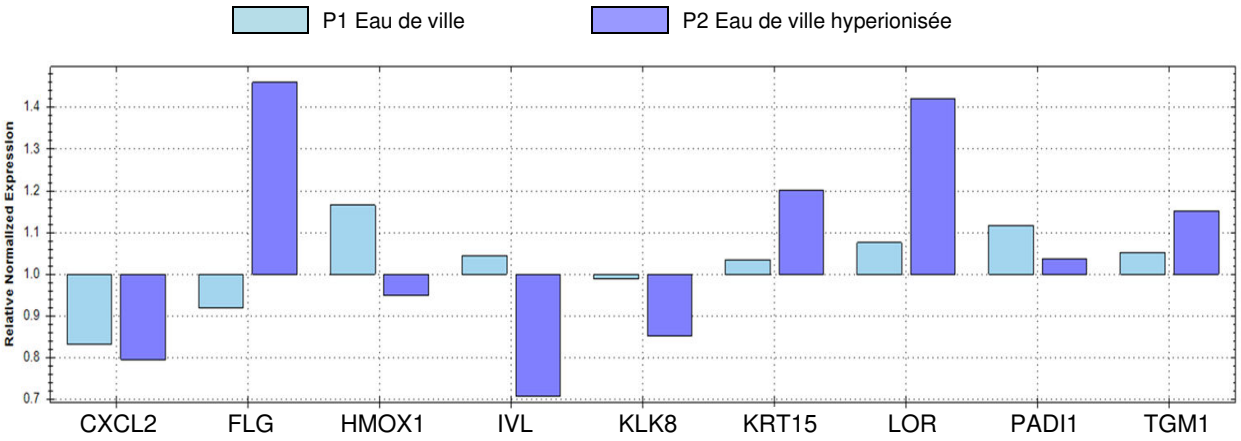
Comparaison P2 vs P1 Donneur 1								
CXCL2	**FLG**	**HMOX1**	**IVL**	**KLK8**	**KRT15**	**LOR**	**PADI1**	**TGM1**
↘	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗	↗

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 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).
Cependant, elle augmente le gène HMOX1 qui a des propriétés antioxydantes. De plus, sa capacité à métaboliser l'hème en monoxyde de carbone lui confère également des propriétés anti-inflammatoires.

Activité de l'eau de ville ± hyperionisée (2ème donneur 2 = 21E5273)

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



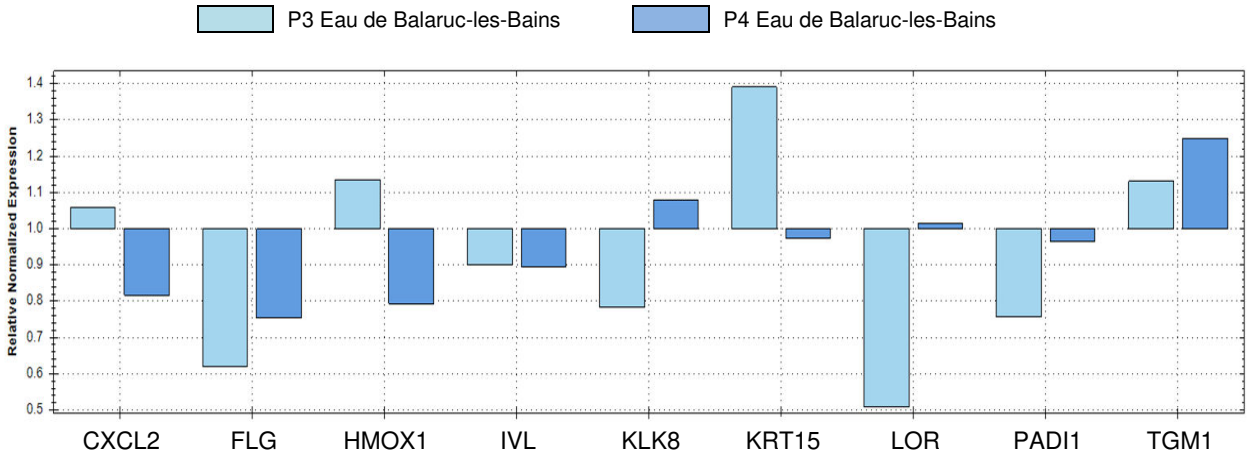
Comparaison P2 vs P1 Donneur 2								
CXCL2	**FLG**	**HMOX1**	**IVL**	**KLK8**	**KRT15**	**LOR**	**PADI1**	**TGM1**
↔	↗	↘	↘	↘	↗	↗	↘	↗

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.

Activité thermale de Balaruc-les Bains ± hyperionisée

Ratios d'expression entre la moyenne des valeurs d'expression pour eau thermale (P3) et eau thermale hyperionisée (P4) versus contrôle (T), à J9.



Comparaison P4 ■ vs P3 ■								
CXCL2	**FLG**	**HMOX1**	**IVL**	**KLK8**	**KRT15**	**LOR**	**PADI1**	**TGM1**
↘	↗	↘	↔	↗	↘	↗	↗	↗

L'eau thermale de Balaruc-les-Bains (■) réduit les gènes associés à la formation et à la régulation de la barrière cutanée (FLG, LOR et PADI1).
Elle stimule significativement le renouvellement épidermique (KRT15).

L'eau de thermale de Balaruc-les-Bains hyperionisée (■) réduit significativement le niveau basal inflammatoire (CXCL2), non impacté par l'eau thermal de Balaruc-les-Bains.
Elle diminue significativement le niveau basal de stress oxydatif (HMOX1) qui était légèrement induit avec l'eau non-ionisée.
Elle augmente significativement les gènes associés à la formation et à la régulation de la barrière cutanée (FLG, LOR, PADI1).
De plus, elle augmente KLK8, une sérine protéase liées à la régulation de la desquamation.
Cependant, elle atténue la stimulation du renouvellement épidermique (KRT15).

CONCLUSION

Eau de ville

Cette étude, concerne l'évaluation de l'eau de ville hyperionisée sur un premier et un deuxième donneur.

Il convient de se reporter à l'analyse compliée des résultats des trois donneurs.

Cependant, 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 une partie des gènes liés à la formation et au maintien de la barrière cutanée de plus, elle induit significativement la mise en œuvre du renouvellement épidermique.

Eau thermale de Balaruc-les-Bains

Cette première analyse montre que l'eau thermale de Balaruc-les-Bains appliquée sur les explants de peau stimule le renouvellement épidermique.

Mais elle induit également une répression d'une partie des marqueurs de la barrière cutanée.

Cependant, ces résultats ne concernent que 10 des 23 000 gènes humains ciblés dans cette étude, ils ne représentent qu'une petite partie des nombreux effets biologiques mis en œuvre au cours d'une balnéothérapie.

Ceci étant, la répression de la filaggrine, de KLK8, de la loricrine et de PADI1 démontrent clairement une altération de la barrière cutanée induite par le contact prolongé de la peau avec l'eau thermale de Balaruc-les-Bains.

L'hyperionisation de l'eau thermale de Balaruc-les-Bains permet d'inhiber ces effets indésirables en réduisant notablement le niveau d'inflammation cutanée, en réduisant la répression de la filaggrine, en annulant la répression de la loricrine et PADI1 tout en contrebalançant totalement celle de KLK8.

L'eau thermale de Balaruc-les-Bains hyperionisée, en diminuant significativement l'inflammation cutanée et en régulant son hydratation, permet d'améliorer notablement l'expérience bénéfique de la balnéothérapie.