

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR DES KÉRATINOCYTES HUMAINS PRIMAIRES IN VITRO

PROCÉDÉ ROYER COSMÉTIQUE

introduction

Les hélices terrestres, ou escargots ont été très utilisés en médecine depuis l'antiquité. Des propriétés biologiques nombreuses leur ont été attribuées et ont fait l'objet de travaux scientifiques et de communications portant sur leur intérêt thérapeutique potentiel. L'entreprise Royer dispose d'un savoir faire et d'un procédé d'élevage spécifique et de recueil naturel de la bave d'escargot depuis de nombreuses années. Cette expertise a été utilisée au développement de préparations à usage cosmétique. L'objectif de cette étude était d'étudier les propriétés anti oxydantes, anti peroxydation lipidique, anti inflammatoires, et les propriétés hydratantes de la bave d'escargot obtenue selon le procédé ROYER. Ces effets ont été étudiés sur des kératinocytes humains primaires en culture, à l'aide de tests in vitro réalisés conjointement sur la même plaque selon une technologie propriétaire développée par HCS Pharma.

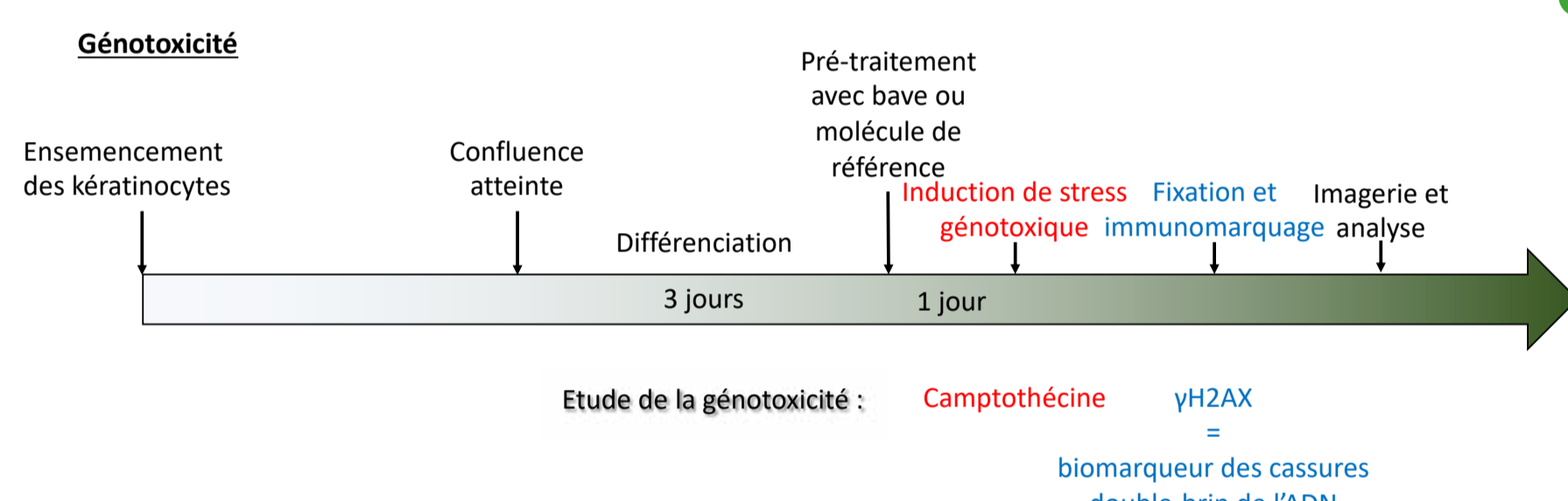
Etude des propriétés de la bave d'escargot sur culture cellulaire – méthodes

- Technologie HCS Pharma: criblage phénotypique cellulaire à haut débit sur milieu propriétaire. (Environnement "naturel") couplé à une technique performante d'analyse d'image.
- Analyse multiplex sur kératinocytes en culture permettant d'étudier les propriétés pharmacologiques sur 8 tests in vitro.

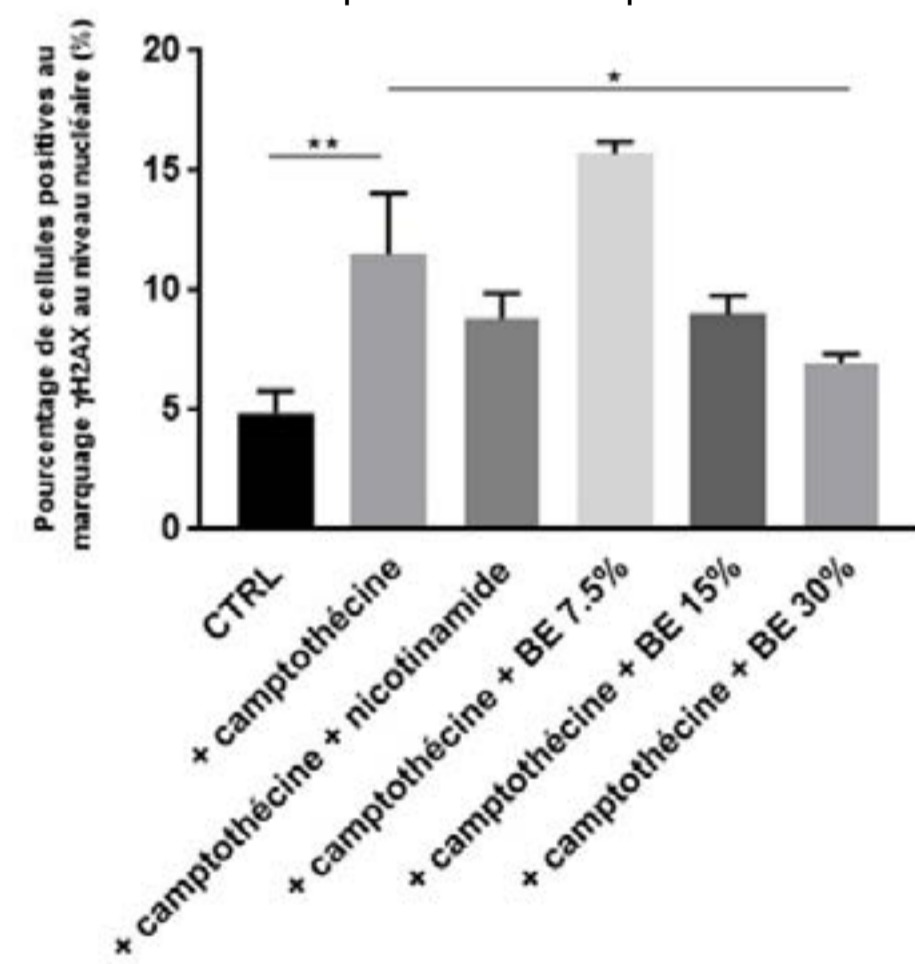
1 TEST PRÉLIMINAIRE POUR LA CULTURE DE NHEK EN PRÉSENCE DE BAVE D'ESCARGOT

- La bave d'escargot sans conservateur semble induire une mortalité cellulaire sur les NHEK avec une concentration entre 30% et 3.75% (v/v). Les cellules sont viables à une concentration de 1,95%.
- La bave d'escargot avec conservateurs ne semble pas induire de mortalité cellulaire sur les NHEK, mais semble réduire la prolifération entre 30 et 15% (v/v).
- Pour la suite des expérimentations, nous avons donc testé la bave d'escargot avec conservateurs uniquement, à raison de 4 concentrations : 60; 30; 15 et 7,5% (v/v)

3 POTENTIEL ANTI-GÉNOTOXICITÉ



Pourcentage de cellules positives à γH2AX suite à un traitement à la camptothécine +/- produits



CONCLUSIONS SUR L'EFFET ANTI-GÉNOTOXICITÉ DE LA BAVE D'ESCARGOT

- La camptothécine a bien induit une augmentation (doublement) du nombre de cellules présentant un marquage nucléaire de γH2AX
- Le nicotinamide a réduit l'effet pro-génotoxique (diminution légère du pourcentage de cellules positives pour γH2AX au noyau).
- La bave d'escargot a permis de réduire le taux de cellules avec un marquage nucléaire de γH2AX dès 15%, et de manière significative à la concentration de 30%.

ANALYSE DES COMPOSANTS DE LA BAVE D'ESCARGOT OBTENUE SELON LE PROCÉDÉ ROYER

Dans une étape préliminaire l'analyse des composants la bave a été réalisée, faisant ressortir une forte concentration en acide glycolique et en collagène, de même que la présence de diverses vitamines et en particulier celles à fort pouvoir anti oxydant (vit D,E).

Désignation : Bave d'escargot - 26/07/2019

N° d'échantillon : 191119051

Type d'échantillon : Cosmétiques

Paramètre	Technique	Méthode	Résultat	Unité
Acide glycolique	HPLC-UV	IOP-PCH-75	<0.12	mg/g
Allantoïne	HPLC-UV	IOP-PCH-24	<0.010	mg/g
Beta-carotène	HPLC-UV	IOP-PCH-42	<0.005	mg/g
Collagène	Spectrophotométrie	NF V04-415	<0.10	mg/g
Vitamine A (Rétinol)	HPLC-UV	IOP-PCH-14	<1.5	µg/g
Vitamine B1 (Thiamine)	HPLC-FLUO	IOP-PCH-16	<0.002	mg/g
Vitamine B2 (Riboflavine)	HPLC-UV	IOP-PCH-34	<0.020	mg/g
Vitamine B3 (Nicotinamide)	HPLC-UV	IOP-PCH-34	<0.003	mg/g
Vitamine B5 (Acide pantothénique)	HPLC-UV	IOP-PCH-34	<0.004	mg/g
Vitamine B6 (Pyridoxine)	HPLC-UV	IOP-PCH-34	<0.002	mg/g
Vitamine B8 (Biotine)	HPLC-UV	IOP-PCH-34	<20.0	µg/g
Vitamine B9 (Acide folique)	HPLC-UV	IOP-PCH-37	<3.00	µg/g
Vitamine C (Acide ascorbique)	HPLC-UV	IOP-PCH-15	<0.003	mg/g
Vitamine D3 (Cholécalciférol)	HPLC-UV	IOP-PCH-22	<0.08	µg/g
Vitamine E (Tocophérol)	HPLC-FLUO	IOP-PCH-18	<0.005	mg/g

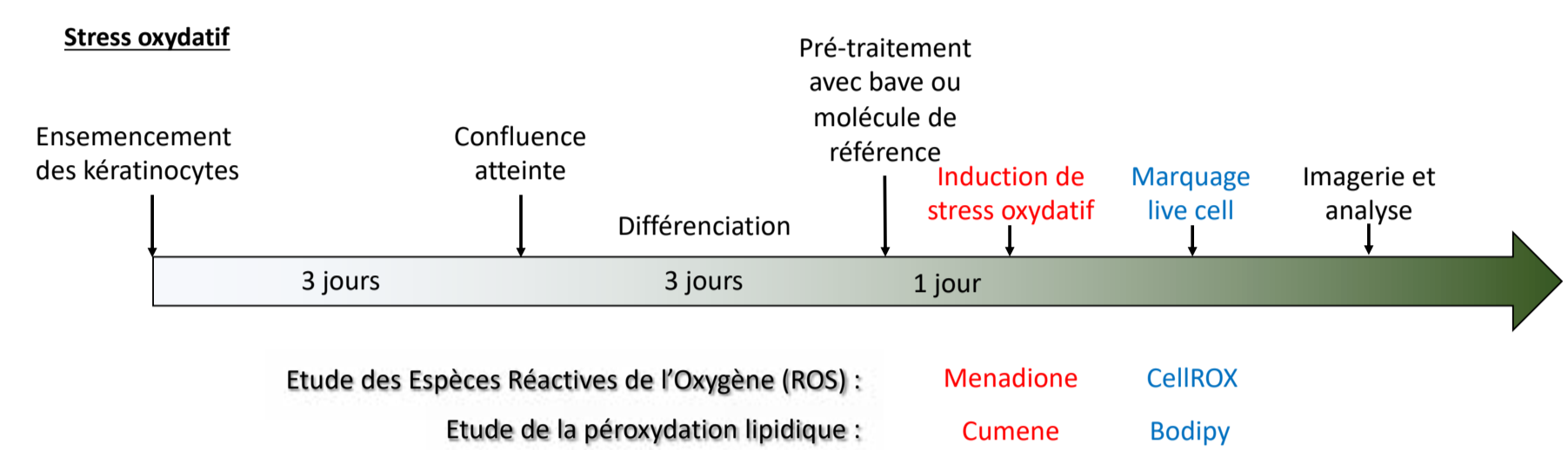
2 ÉTUDE DE L'EFFET DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR LE STRESS OXYDATIF DANS LE NHEK (MARQUAGE LIVE CELL)

CONCLUSIONS SUR L'EFFET ANTI-OXYDANT DE LA BAVE D'ESCARGOT

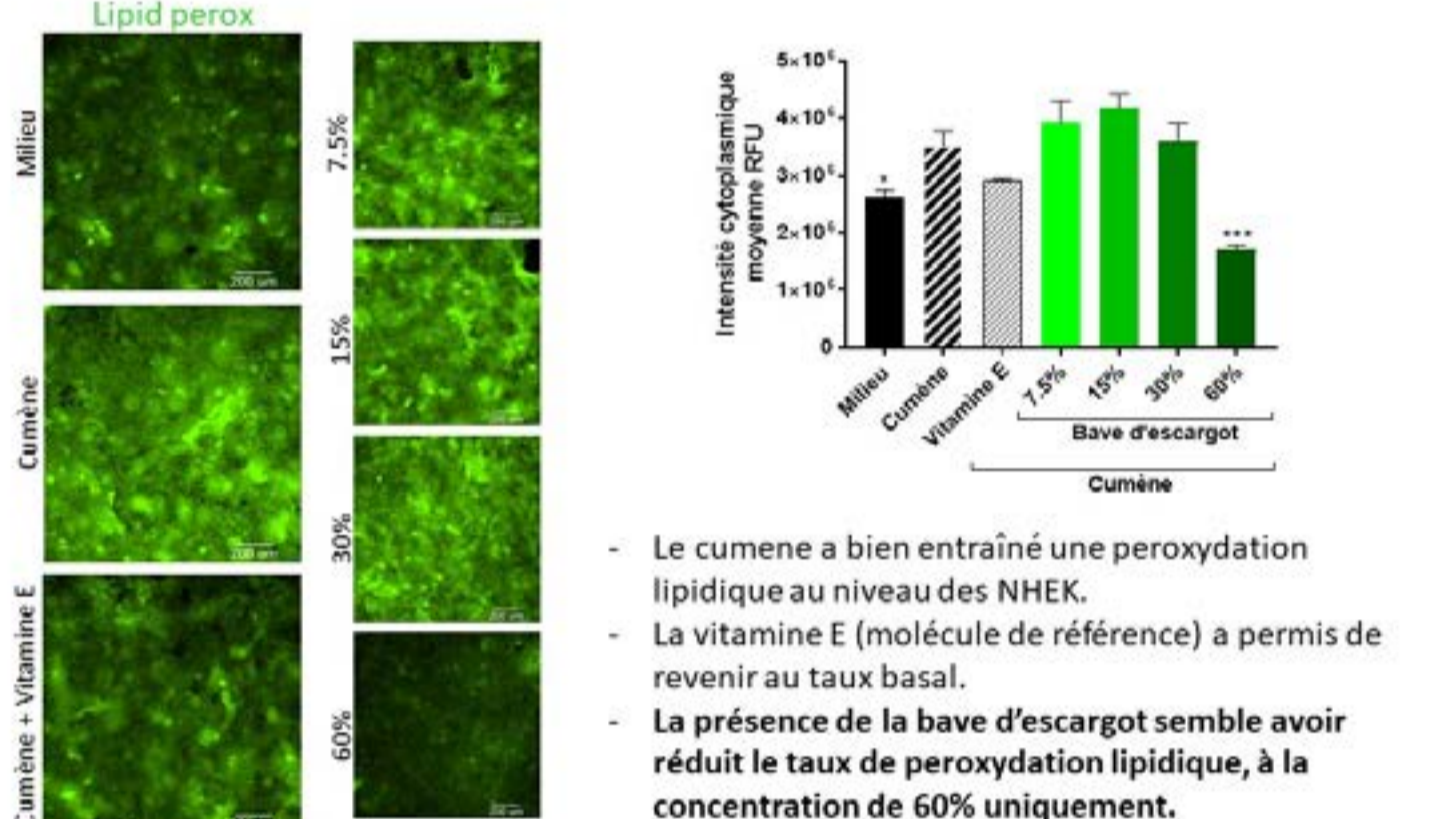
- La bave d'escargot (+ conservateurs) a permis de contrer l'effet pro-oxydatif de la ménadione au niveau du taux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les kératinocytes humains primaires, selon un effet dose-réponse. L'effet observé était supérieur à celui de la NAC (molécule de référence anti-oxydante, testée à 10 mM) aux concentrations de 30 et 60%.

La bave d'escargot (+ conservateurs) semble avoir contré l'effet du cumène au niveau de la peroxydation lipidique dans les kératinocytes humains primaires, à la seule concentration de 60%.

- D'après les résultats obtenus en terme de contenu cellulaire en ROS, la bave d'escargot (+ conservateurs) présente un potentiel anti-oxydant.



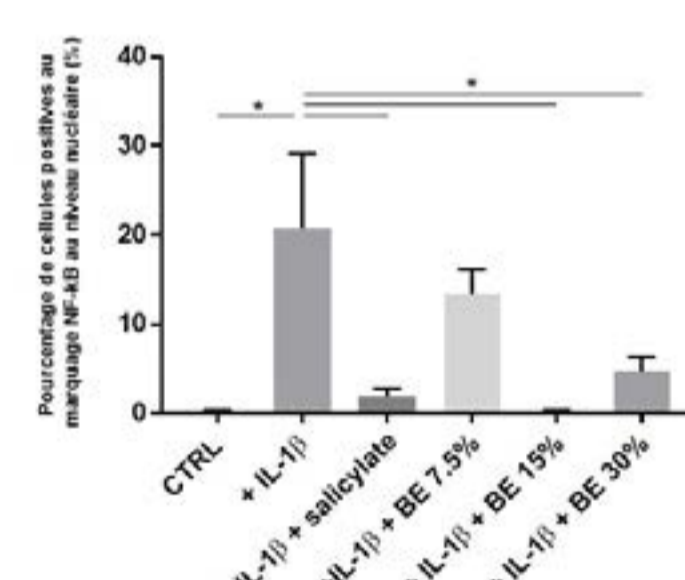
Résultats : peroxydation lipidique suite à un stress induit par le cumène



- Le cumène a bien entraîné une peroxydation lipidique au niveau des NHEK.
- La vitamine E (molécule de référence) a permis de revenir au taux basal.
- La présence de la bave d'escargot semble avoir réduit le taux de peroxydation lipidique, à la concentration de 60% uniquement.

4 ETUDE DE L'EFFET DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR LE STRESS INFLAMMATOIRE DANS LES NHEK

Résultats : pourcentage de cellules présentant un immunomarquage nucléaire de NF-kB



- L'IL-1β a bien induit une augmentation du nombre de cellules positives pour NF-kB au niveau nucléaire.
- Le sodium salicylate a permis de contrer cet effet pro-inflammatoire, comme attendu.
- La bave d'escargot a contré l'effet de l'IL-1β de manière significative aux concentrations de 15 et 30% (v/v), suggérant un potentiel anti-inflammatoire.

CONCLUSIONS SUR L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DE LA BAVE D'ESCARGOT

- La bave d'escargot (+ conservateurs) à 15 et 30% a permis de contrer l'effet pro-inflammatoire de l'IL-1 (30 ng/mL), d'après l'immunomarquage de NF-kB au niveau des noyaux dans les kératinocytes humains primaires.
- D'après les résultats obtenus en terme d'expression de NF-kB suite à un stress inflammatoire, la bave d'escargot (+ conservateurs) présente un potentiel anti-inflammatoire.
- La bave d'escargot à 60% a interféré avec l'immunomarquage de NF-kB, comme ce fut le cas pour celui de γH2AX.

5 ÉTUDE DE L'EFFET DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR L'EXPRESSION D'AQP3 DANS LE NHEK (HYDRATATION)

CONCLUSIONS SUR L'EFFET DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR L'EXPRESSION D'AQP3 (HYDRATATION)

- La bave d'escargot (+ conservateurs) n'a pas augmenté l'expression de l'aquaporine 3 au niveau des kératinocytes humains primaires.
- Même si la bave d'escargot n'a pas d'effet sur l'expression d'AQP3 directement, nous ne pouvons pas conclure définitivement sur son effet sur l'hydratation de la peau via d'autres mécanismes.
- La bave d'escargot à 60% a interféré avec l'immunomarquage de NF-kB, comme ce fut le cas pour les autres immunomarquages indirects.

6 ÉTUDE DE L'EFFET DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR LA CICATRISATION D'UNE CULTURE DE NHEK

CONCLUSIONS SUR L'EFFET CICATRISANT DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR LES KÉRATINOCYTES

- La bave d'escargot (+ conservateurs) n'a pas induit d'augmentation du taux de cicatrisation, d'après le comblement de la griffure observé suite au marquage des noyaux des les kératinocytes humains primaires.
- L'analyse d'image conclue même à une augmentation de la surface sans cellules - car elle prend en compte les abords de la griffure.
- Qu'en serait-il sur une culture de fibroblastes, qui sont des acteurs majeurs de la cicatrisation de la peau?

conclusion:

ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS DE LA BAVE D'ESCARGOT SUR CULTURE CELLULAIRE KÉRATINOCYTES

Selon les données obtenues in vitro, la bave d'escargot avec conservateurs a montré de potentiels effets anti-oxydatifs (selon le test de mesure du contenu cellulaire en ROS et de la peroxydation lipidique en conditions oxydatives), ainsi que de potentiels effets anti-inflammatoires et anti-génotoxiques. Ces données pharmacologiques sous tendent de manière scientifique les effets cutanés observés en pratique sous l'effet de la bave et justifient le développement du produit pour des applications de cosmétologie et en clinique humaine.

TEST	BE + C
Stress oxydatif (ROS)	+
Peroxydation lipidique	+ à 60% (v/v)
Stock de glutathion	0
Cicatrisation	-
Stress inflammatoire*	+
Stress génotoxique*	+ à 30% (v/v)
Hydratation (expression AQP3)	0

DISCUSSION

Plusieurs éléments sont à considérer pour le développement ultérieur

- Impact du procédé d'obtention Royer sur la spécificité des résultats
- Effet du conservateur
- Effet de la concentration de la bave et de la viscosité
- Impact du type cellulaire: réalisation d'études sur fibroblastes (cicatrisation ++)