



Reçu le :
4 février 2009
Accepté le :
18 septembre 2009
Disponible en ligne
4 juin 2010

Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Bains de bouche aux extraits naturels microencapsulés : évaluation in vitro des propriétés antioxydantes (plaque dentaire et gingivite)

Mouthwash solutions containing microencapsulated natural extracts: In vitro evaluation of antioxidant properties (dental plaque and gingivitis)

J. Mouhyi^{a,b}, M. Del Corso^c, M.-P. Hippolyte^c, G. Sammartino^d, D.M. Dohan Ehrenfest^{a*,c,d}

^a Department of Biomaterials, Institute for Clinical Sciences, the Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg, Medicinaregatan 8B, 41390 Gothenburg, Suède

^b Department of Advanced Periodontology, University of Southern California (USC), California, États-Unis

^c The LoB5 foundation for research, Paris, France

^d Department of Odontostomatological and Maxillofacial Sciences, Faculty of Medicine, University Federico II of Naples, Naples, Italie

Summary

Introduction. New mouthwash solutions containing microencapsulated natural extracts were developed to provide both anti-septic activity and in depth treatment of oral tissues, due to their antioxidant and immunoregulatory properties. The objective of this study was to quantify the antioxidant action of the GingiNat solution (LoB5 Foundation, Paris, France) in an in vitro cell model.

Materials and methods. Diluted GingNat solutions (0.12%, 0.06% and 0.012%) were put in contact with Jurkat type human lymphoid cells in basal radical state (cells at rest) and in provoked oxidative stress conditions (after an UVA + UVB irradiation). The lipid peroxidation was quantified by flow cytometry using a fluorescent probe.

Results. The diluted GingNat solutions at 0.12%, 0.06%, and 0.012% showed a significant antioxidant effect with respectively 122.9%, 117.8% and 119.3% on average. The difference was statistically significant compared to controls for the three concentrations without any significant difference among them. This antioxidant effect was even more significant when cells were in oxidative stress with respectively 155.3%, 139.3%, and 132.5% on average. There was a significant difference between the tested concentrations ($p < 0.01$).

Résumé

Introduction. De nouveaux bains de bouche à base d'extraits naturels microencapsulés ont été développés pour associer à l'activité antiseptique, une action antioxydante et immunorégulatrice. Nous avons quantifié in vitro l'action antioxydante de la solution GingiNat[®] (LoB5 Foundation, Paris, France).

Matériels et méthodes. Des solutions diluées à 0,12 %, 0,06 % et 0,012 % de GingiNat[®] ont été mises en présence de cellules lymphoïdes humaines de type Jurkat en état radicalaire basal (cellules au repos) et en conditions de stress oxydatif provoqué après irradiation UVA/UVB. Nous avons mesuré le taux de peroxydation lipidique de ces cellules par cytométrie de flux en utilisant une sonde fluorescente.

Résultats. Les solutions de GingiNat[®] à 0,12 %, 0,06 % et 0,012 % ont eu respectivement un effet antioxydant moyen de 122,9 %, 117,8 % et 119,3 %. La différence avec les témoins était statistiquement significative pour les 3 concentrations sans différence statistiquement significative entre elles. L'effet antioxydant était plus élevé lorsque les cellules étaient en état de stress oxydatif, respectivement 155,3 %, 139,3 % et 132,5 % en moyenne. Les différences d'effets antioxydants entre les trois concentrations étaient significatives ($p < 0,01$).

* Auteur correspondant.
e-mail : LoB5@mac.com.

Discussion. These first in vitro results confirmed the antioxidant properties of the GingiNat solution. These antioxidant properties are significantly higher at stronger concentrations. Further studies are required to analyze the influence of microencapsulation on these results. Clinical trials are needed to confirm these antioxidant properties.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Mouthwash, Plant extracts, Antioxidants, Oxidative stress

Introduction

Les bains de bouche sont couramment utilisés dans le traitement de la gingivite et de la parodontite pour leurs propriétés antiseptiques [1–3]. Peu d'entre eux ont été conçus pour traiter le terrain, c'est-à-dire rétablir l'homéostasie des tissus buccaux agressés. Les mécanismes de la détérioration du terrain sont très complexes, associant, entre autres, variations de pH, réactions inflammatoires et stress oxydatif. Celui-ci est un mécanisme très important mais méconnu [4] ; en effet, l'agression bactérienne induit la production d'une quantité accrue de radicaux libres qui sont toxiques pour les tissus et qui débordent les capacités de neutralisation de l'organisme. La baisse du potentiel antiradicalaire (i.e. antioxydant) des tissus fait partie intégrante des mécanismes pathologiques [5].

De nombreux extraits naturels sont connus pour leurs propriétés antioxydantes [6,7]. Le bain de bouche GingiNat® (LoB5 Foundation, Paris, France) associe dix familles d'extraits naturels, dont certains, à forte concentration en polyphénols (par exemple le pycnogénol), sont reconnus pour leurs effets antioxydants [8]. L'une des principales caractéristiques du concept GingiNat® est le mode d'application de ses principes actifs naturels. Ceux-ci sont microencapsulés afin d'améliorer leur conservation et leur distribution (brevet en cours). Les microcapsules adhèrent aux tissus buccaux et se désagrègent couche par couche, ce qui permet un relargage progressif des principes actifs.

L'objectif de cette étude était d'évaluer les propriétés antioxydantes de la solution GingiNat® in vitro sur des cellules au repos (état radicalaire basal) et sur des cellules stressées par une irradiation UV.

Matériels et méthodes

La solution étudiée était le GingiNat® Mk.03. L'effet antioxydant a été évalué par le taux de peroxydation lipidique dans des cellules humaines (Jurkat) exposées ou non à une irradiation UVA + UVB. La mesure a été faite par cytométrie de flux en utilisant une sonde fluorescente spécifique au C11-fluor [9].

Discussion. Les propriétés antioxydantes de GingiNat® ont été mises en évidence in vitro. Cet effet est significativement le plus élevé à la plus forte concentration. Le rôle de la microencapsulation des principes actifs dans ce résultat nécessite des études complémentaires. Une confirmation de ces résultats par des essais cliniques est nécessaire.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Bain de bouche, Extraits de plantes, Antioxydants, Stress oxydatif

Préparation des réactifs

Le bain de bouche GingiNat® Mk.03 (LoB5 Foundation, Paris, France) contient 6 % de microcapsules en solution. Trois solutions différentes ont été préparées à des concentrations finales de 0,12 %, 0,06 % et 0,012 %. Un test de cytotoxicité MTT (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, États-Unis) standard avait été réalisé préalablement à l'étude, afin de valider les concentrations de microcapsules à tester.

La solution de référence était constituée de 50 mM d'hydroxyanisole butyle (BHA) (BHA, Sigma, États-Unis) dans de l'éthanol absolu, diluée pour obtenir une solution à 100 µM de BHA dans le milieu d'essai.

La sonde fluorescente (5 N-dodecanoyl aminofluorescein, C11-fluor) a été préparée à 5 mM dans une solution stock d'éthanol absolu et diluée pour obtenir une solution à 1 µM de C11-fluor dans le milieu d'essai.

Cultures cellulaires

Des cellules lymphoïdes humaines de type Jurkat ont été ensemencées à 37 °C et 5 % de CO₂ dans des plaques à la concentration de 14.10⁶ cellules/ml. Le milieu de culture était du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640), adapté aux cultures de lignées lymphoïdes, enrichi en L-glutamine à 2 mM, en pénicilline à 100 UI/ml et streptomycine à 100 µg/ml, et en sérum de veau fœtal à 10 %. Le milieu d'essai était composé de MEM (Minimum Essential Medium) sans rouge phénol ni sérum de veau fœtal, enrichi en bicarbonate de sodium à 1,87 mg/ml, en L-glutamine à 2 mM et en pénicillines à 50 UI/ml. Tous les produits utilisés provenaient de Life Technologies Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis.

Protocoles de l'étude

Les cellules Jurkat ont été placées en pré-culture en milieu RPMI 1640 complet. Elles ont ensuite été lavées dans du milieu d'essai, puis placées en présence du produit testé, selon les modalités décrites précédemment. La sonde C11-fluor a été ensuite ajoutée à chaque culture test pour le dosage de la peroxydation lipidique. L'incubation a duré 45 minutes à 37 °C et 5 % de CO₂. Puis la sonde C11-fluor a été éliminée par lavages des cellules en milieu d'essai.

Des cultures ont été ensuite irradiées à 0,26 J/cm² en UVB et 2,72 J/cm² en UVA. Après nouvelle incubation de 20 minutes à 37 °C et 5 % de CO₂, les paramètres de fluorescence ont été mesurés sur 10 000 cellules individuelles par échantillon à l'aide d'un cytomètre de flux FACScan (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, États-Unis).

Quatre séries de mesures ont été réalisées pour chaque dilution de GingiNat[®].

Analyse statistique

Les comparaisons intergroupes ont été faites par analyse de variance (Anova).

Résultats

L'application de la solution de référence (BHA) ou de GingiNat[®] diluée à 0,12, 0,06 et 0,012 % sur les cellules Jurkat en conditions de stress oxydatif basal (sans irradiation) a induit une augmentation significative de l'intensité de fluorescence de la sonde par rapport au témoin ($p < 0,01$), c'est-à-dire une réduction du taux basal de peroxydation lipidique. Le pourcentage moyen d'augmentation était respectivement de 131,5 %, 122,9 %, 117,8 % et 119,3 %. Il n'y avait pas de différence significative entre les différentes dilutions de GingiNat[®]. L'irradiation UV a induit une diminution significative (41,6 %, $p < 0,01$) de l'intensité de fluorescence de la sonde par rapport au témoin (peroxydation des membranes cellulaires).

L'application de la solution de référence (BHA) ou de GingiNat[®] diluée à 0,12, 0,06 et 0,012 % sur les cellules Jurkat irradiées aux UV a induit une augmentation de l'intensité de fluorescence de la sonde par rapport au témoin. Le pourcentage moyen d'augmentation était respectivement de 191,5 %, 155,3 %, 139,3 % et 132,5 %. Les différences entre la solution BHA ou les solutions diluées de GingiNat[®] par rapport au témoin étaient statistiquement significatives ($p < 0,01$). Les différences intergroupes des trois solutions diluées étaient également significatives ($p < 0,01$).

Discussion

Dans cet essai in vitro, le bain de bouche GingiNat[®] a été testé aux dilutions 0,12, 0,06 et 0,012 %. Il possède une activité antioxydante significative, caractérisée par une nette diminution de la peroxydation lipidique naturelle ou induite par une irradiation UV, quelle que soit la concentration.

La solution BHA, puissant antioxydant cellulaire, a permis d'établir des valeurs moyennes d'efficacité antioxydante maximale que l'on peut considérer comme références, soit 131,5 % aux conditions basales et 191,5 % après stress oxydatif par irradiation UV. Le Bain de bouche GingiNat[®] possède des propriétés antioxydantes proportionnelles aux concentrations en microcapsules de principes actifs. Les solutions utilisées aux

dilutions 0,12, 0,06 et 0,012 % ont donné respectivement les valeurs moyennes 122,9 %, 117,8 % et 119,3 % en conditions basales et 155,3 %, 139,3 % et 132,5 % après stress oxydatif par irradiation UV. Les différences sont statistiquement significatives pour les trois concentrations testées en comparaison avec le témoin et entre les différentes concentrations elles-mêmes dans les conditions de l'irradiation.

Le protocole utilisé est fiable. Nous avons pris le soin de vérifier l'absence de cytotoxicité directe des différentes dilutions de GingiNat[®] par test MTT. En effet, le modèle cellulaire utilisé pour cette étude in vitro est très sensible à des doses excessives de principes actifs. De plus, les microcapsules sont d'une taille importante et ont des similitudes biochimiques avec les parois cellulaires ce qui pourrait induire des effets mécaniques et biochimiques délétères sur ces cellules en culture.

La cytométrie de flux par sonde fluorescente au C11 fluor est d'une grande sensibilité. Le C11-fluor est une molécule non fluorescente en solution qui s'intègre dans les membranes cellulaires. Elle devient alors fluorescente mais perd cette fluorescence lorsqu'elle est exposée à une attaque radicalaire (peroxydation lipidique). Les composés antiradicalaires comme la solution BHA ou Ginginat[®] limitent la perte de fluorescence. Celle-ci est directement mesurée sur les 10 000 cellules de chaque échantillon testé.

Nos résultats préliminaires sont intéressants mais limités, car ils ne permettent pas d'apprécier l'effet antioxydant réel in vivo. En effet, l'incubation des cellules avec la solution diluée ne permet pas aux microcapsules de libérer l'intégralité de leur contenu. Selon nos essais dans le milieu buccal, les enveloppes des microcapsules sont progressivement rompues sous l'action enzymatique. La libération des principes actifs dure huit heures en moyenne. Dans les conditions expérimentales de notre étude in vitro, l'effet mesuré est dû au relargage primaire de composés actifs dans les minutes qui suivent l'application du bain de bouche. L'effet sur une plus longue durée n'a pu être évalué. De plus, les interactions mécaniques et biochimiques entre les microcapsules et les parois cellulaires peuvent être différentes in vivo.

Conflit d'intérêt

D.M. Dohan Ehrenfest est coinventeur du produit testé dans cette étude. Cependant, les résultats de cette étude ont été intégralement recueillis par une équipe indépendante de tout conflit d'intérêt. Les autres co-auteurs n'ont aucun conflit d'intérêt à déclarer.

Remerciements

Ce travail a été soutenu par l'Association LoB5, reconnue d'intérêt général (Paris, France), et l'Association Universitaire de Parodontologie, de Chirurgie Buccale et d'Implantologie (AUPCBI, Paris, France).

Références

- [1] Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000* 1997;15:55–62.
- [2] Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol* 2004;31:878–84.
- [3] Minah GE, DePaola LG, Overholser CD, Meiller TF, Niehaus C, Lamm RA, et al. Effects of 6 months use of an antiseptic mouthrinse on supragingival dental plaque microflora. *J Clin Periodontol* 1989;16:347–52.
- [4] Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000* 2007;43:160–232.
- [5] Guentsch A, Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. *Clin Oral Investig* 2008;12:345–52.
- [6] Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:158–68.
- [7] Lambert JD, Sang S, Yang CS. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol Pharm* 2007;4:819–25.
- [8] Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: a review. *J Dent* 2009;37:413–23.
- [9] Maulik G, Kassis AI, Savvides P, Makrigiorgos GM. Fluoresceinated phosphoethanolamine for flow-cytometric measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1998;25:645–53.