

Évaluation *in vitro* des propriétés pharmacologiques d'une pâte dentifrice contenant une association de Fluorinol® et d'enoxolone.

PHARMACOLOGIE

Mots clés :

Enoxolone
Fluorhydrate de nicométhanol
Inflammation
Fluoruration
Muqueuse buccale

Keywords:

Enoxolone
Nicomethanol fluorhydrate
Inflammation
Fluorination
Buccal mucosa

In vitro evaluation of the pharmaceutical properties of a toothpaste which contains an association of Fluorinol® and of enoxolone.

VIANNEY DESCROIX

Docteur en Chirurgie Dentaire, Université Paris Diderot - Paris 7.

RÉSUMÉ

INTRODUCTION : cette étude avait pour principal objectif d'évaluer le comportement de deux principes actifs, l'enoxolone et le fluorhydrate de nicométhanol, seuls et lorsqu'ils sont contenus associés dans une même pâte dentifrice.

MATÉRIEL ET MÉTHODE : deux modèles expérimentaux différents ont été utilisés. L'effet anti-inflammatoire des dentifrices a été évalué grâce à un premier modèle de gencive maintenue en survie ex vivo et sur lequel ont été appliquées des conditions expérimentales d'inflammation gingivale par ajout de substance P et de LPS. Les quantités de fluor libre et de fluoruration ont été mesurées dans un second modèle. Cette étude a été réalisée en aveugle contre placebo.

RÉSULTATS : les dentifrices contenant de l'enoxolone seule ou associée à du Fluorinol® ont entraîné une diminution significative des signes inflammatoires cellulaires (réduction de l'œdème et de la dilatation des capillaires) et moléculaire (diminution de libération d'interleukine 8). La libération de fluor et la fluoruration des pastilles de céramique est identique en présence et en absence d'enoxolone.

DISCUSSION : il n'existe pas dans cette étude d'antagonisme entre les deux principes actifs lorsqu'ils sont associés au sein d'une même pâte dentifrice.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The main aim of this study was to evaluate the behaviour of the two active principles, enoxolone and nicomethanol fluorhydrate, individually and when associated in the same toothpaste.

MATERIAL AND METHOD: Two different experimental models have been used. The anti-inflammatory effect of toothpastes has been evaluated thanks to a first model of gingiva maintained alive ex vivo, and on which have been applied the experimental conditions of gingival inflammation, by the addition of substance P and LPS. The measure of free fluorine and of fluorination have been measured in a second experimental model. The entirety of this study is blind and placebo controlled.

RESULTS: The toothpastes which contain only enoxolone or with Fluorinol® brought about an important reduction of both the cellular inflammatory signs (reduction of the oedema and dilation of the capillaries) and the molecular signs (reduction of the liberation of interleukin-8). The liberation of fluorine and the fluorination of the ceramic discs is identical with or without enoxolone.

DISCUSSION: In this study, there is no antagonism between the two active principles when they are associated in a toothpaste.

Introduction

Les maladies du parodonte sont des pathologies inflammatoires d'origine infectieuse (Bhatavadekar et Williams 2009).

Leur traitement repose d'abord sur une approche essentiellement mécanique (HAS 2002). Cependant de nombreuses études cliniques comme précliniques laissent suggérer que l'utilisation régulière de pâte dentifrice permet une réduction significative des symptômes inflammatoires (Davies 2008 ; Trombelli et coll., 2003). Les produits de santé destinés à l'hygiène bucco-dentaire restent un élément essentiel à la prévention en médecine bucco-dentaire (Ohrn et Sanz, 2009).

De nombreux principes actifs sont utilisés (Wu et Savitt, 2002) au sein des produits d'hygiène orale, parmi ceux-ci l'enoxolone, molécule aux propriétés anti-inflammatoires, a démontré dans différentes études cliniques son efficacité à réduire la gingivite induite par la plaque (Louise 1983 ; Mattout 1989). De la même façon, l'utilisation d'une pâte dentifrice contenant un sel de fluor est aujourd'hui reconnu comme un élément essentiel de la prévention de la carie dentaire (Newbrun 2010).

Malgré une utilisation très fréquente et répandue, les produits d'hygiène bucco-dentaire sont encore rarement évalués correctement, tant en terme d'efficacité qu'en terme de tolérance (Scully et coll., 2008), ce qui conduit à des allégations rarement démontrées.

Les objectifs de cette étude *in vitro* ont été d'évaluer l'efficacité de deux principes actifs, un anti-inflammatoire l'enoxolone et un sel de fluor le fluorhydrate de nicométhanol, lorsqu'ils sont utilisés seuls ou associés dans une même pâte dentifrice. Pour ce faire deux modèles ont été utilisés. Un premier modèle de fragment de gencive maintenue en survie *ex vivo* dans lequel une inflammation a été induite et un second modèle qui permet l'évaluation de la quantité de fluor libre et de fluor incorporé à des pastilles de céramique qui reproduisent l'émail dentaire.

Matériel et méthodes

Pâtes dentifrices

Cinq pâtes dentifrices sont évaluées (**tableau I**). Le dentifrice A est le produit placebo, sa composition est strictement identique à celle des 4 autres, mais il ne contient aucun principe actif. Le dentifrice B contient un sel de fluor appartenant au groupe des amines fluorées, le fluorhydrate de nicométhanol. Les dentifrices C et D contiennent de l'enoxolone à une concentration de 0,7 %

Introduction

The periodontal diseases are infectious inflammatory pathologies (Bhatavadekar and Williams 2009).

Their treatment relies on an essentially mechanical approach (HAS 2002). However, many preclinical and clinical studies suggest that the regular use of toothpaste allows a significant reduction of the inflammation (Davies 2008; Trombelli et al., 2003).

The health products of bucco-dental hygiene remain essential for prevention in bucco-dental medicine (Ohrn and Sanz, 2009).

Many active products are used for oral hygiene, such as enoxolone, a molecule with anti-inflammatory properties, which has demonstrated its efficiency in reducing gingivitis induced by the plaque in various clinical studies (Louise 1983; Mattout 1989).

In the same way, the use of a toothpaste which contains fluorinated salt is renowned as an essential element of the prevention of dental cavities (Newbrun 2010).

Even though products of bucco-dental hygiene are widely spread and used, they are rarely well evaluated as to their efficiency and their tolerance (Scully et al., 2008), which leads to allegations seldom based on evidence.

The aims of this *in vitro* study are to evaluate the efficiency of two active principles, enoxolone, an anti-inflammatory, and a fluorine salt, the nicomethanol fluorhydrate, both when they are used separately, or together, in a toothpaste. In order to conduct this experiment, two experimental models are used. The first model uses a fragment of gingiva maintained alive *ex vivo* in which an inflammation has been induced, and a second experimental model which allows the evaluation of the quantity of free fluorine, and fluorine incorporated to ceramic discs that reproduce dental enamel.

Equipment and methods

Toothpastes

Five toothpastes were used (**table I**). Toothpaste A was a placebo; its composition was strictly identical to the 4 others, but it contained no active principle. Toothpaste B contained a fluorine salt belonging to the group of the fluorine-amines, the nicomethanol fluorhydrate. Toothpastes C and D both contained enoxolone, at a concentration at 0.7% and 1% respectively.

et de 1 % respectivement. Enfin, le dentifrice E contient une association de fluorhydrate de nicométhanol et d'énoxolone à 0,7 %. L'ensemble de l'étude a été réalisée en aveugle.

Finally, toothpaste E contained an association of nicomethanol fluorhydrate with enoxolone at 0.7%. The entirety of the study was blinded.

TABLEAU I - TABLE I

Différents dentifrices testés et leur composition en principe actif.
Different tested toothpastes and their composition in active principle.

DENTIFRICE TESTÉ - TESTED TOOTHPASTE	COMPOSITION QUALITATIVE ET QUANTITATIVE - QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION
A	Placebo
B	Fluor 1500 ppm - Fluorine 1500 ppm
C	Enoxolone 0,7 % - Enoxolone 0,7%
D	Enoxolone 1 % - Enoxolone 1%
E	Enoxolone 0,7 % + fluor 1500 ppm - Enoxolone 0,7% + fluorine 1500 ppm

Évaluation des propriétés anti-inflammatoires

Conditions expérimentales

Le modèle de muqueuse sur lequel sont évalués les effets anti-inflammatoires des dentifrices a été décrit précédemment (Boisnic et coll., 2010). L'inflammation gingivale est obtenue par stimulation des explants à l'aide de substance P (SP) et de lipopolysaccharide bactérien (LPS) à une concentration de 10 µg/mL chacun.

Les dentifrices testés dans ces conditions expérimentales sont les dentifrices A, C, D et E. Ils sont appliqués par massage, dix minutes après avoir ajouté au milieu de culture la SP et le LPS. L'application est réalisée matin et soir pendant 3 jours.

Analyses histologiques

Après trois jours de culture, les différents explants sont fixés dans du liquide de Bouin et inclus en paraffine puis colorés par l'hémalum-éosine. Les modifications de la vascularisation ont été analysées en mesurant d'une part le nombre de vaisseaux dilatés (16 champs analysés au grossissement 40) rapportés sur le nombre total de vaisseaux (exprimé en pourcentage de vaisseaux dilatés) et d'autre part la surface moyenne occupée par la lumière des vaisseaux en µm² par analyse morphométrique. L'évaluation histologique de l'œdème a été effectuée dans le chorion sur 4 champs différents à un grossissement de 10. Il s'agit d'une évaluation semi-quantitative dont le score est repris (tableau II).

Evaluation of anti-inflammatory properties

Experimental conditions

The model of the mucous membrane on which the anti-inflammatory effects of the toothpastes have been evaluated was described precedentally (Boisnic et al., 2010). The gingival inflammation was obtained by stimulating the explants with the substance P (SP) and bacterial lipopolysaccharide (LPS), both concentrations being of 10 µg/mL.

The toothpastes tested with this experimental model were the toothpastes A, C, D and E. They were applied with a massage, ten minutes after having added to the culture medium the SP and LPS every morning and every night for three consecutive days.

Histological analysis

After three days of culture, the various explants were fixed in Bouin's fixation, included in paraffin, and then coloured by hemalun-eosin. The modifications of the vascularisation were analysed by measuring, on one hand, the number of dilated vessels (16 fields analysed with a magnification x40) compared to the total number of vessels (expressed in percentage of dilated vessels), and on the other hand, the mean surface area occupied by the light of the vessels in µm² using morphometric analysis. The histological evaluation of the oedema was made in the chorion in 4 different fields with a magnification x10. This was a semi-quantitative evaluation, and the results can be found in (table II).

TABLEAU II - TABLE II

Évaluation semi-quantitative du chorion après 3 jours de culture.
Semi-quantitative evaluation of the chorion after 3 days of culture.

TYPE D'ŒDÈME - TYPE OF ŒDEMA	SCORE AFFECTÉ - AFFECTED SCORE
Absence d'œdème - Absence of œdema	0
Œdème très léger - Very light oedema	1
Œdème modéré - Moderated oedema	2
Œdème important - Important oedema	3
Œdème très important - Very important oedema	4

Analyse biochimique

La concentration de l'interleukine 8 (IL-8) a été mesurée à partir du surnageant de culture après 3 jours. La mesure a été réalisée par une méthode ELISA selon les instructions du fabricant (kits de dosage Chemicon international, INC).

Dosage du fluor

Les différents dosages de fluor ont été effectués sur les dentifrices A, B et E. La différence de potentiel (ddp) est mesurée grâce à une électrode fluor couplée à une électrode au calomel saturé.

Le fluor total correspond au fluor présent dans le dentifrice. Pour connaître cette quantité une attaque acide est réalisée afin de libérer tout le fluor du dentifrice ; 0,4 gramme de dentifrice sont dilués dans 80 g d'eau puis sont attaqués par 1.7mL d'acide chlorhydrique concentré. La solution est ensuite complétée par de l'eau pour avoir au final 100 g de solution (dilution 250 fois). Avant d'effectuer la mesure de ddp, la solution de dentifrice est centrifugée 10 minutes à 5000 tours/minute puis diluée 2 fois en respectant le rapport (eau/tampon) utilisé pour la préparation des étalons de la courbe d'étalonnage.

De façon à estimer la quantité de fluor fixée sur l'émail après brossage, des pastilles de céramique de composition chimique et de structure analogues à l'émail sont placées 7 heures dans les solutions de dentifrice à 60 % en dentifrice. Ces solutions ont été manuellement agitées de temps en temps. Les pastilles sont ensuite lavées avec un jet d'eau distillée, séchées, pesées puis dissoutes par un minimum d'acide perchlorique chlorhydrique (environ 1,7 mL). 25 g d'eau sont ensuite ajoutés. Ces solutions sont diluées 2 fois avant la mesure de la ddp.

Biochemical analysis

The concentration of interleukin-8 (IL-8) was measured in the culture supernatant, after 3 days. The measure was made using the ELISA method, following the instructions of the manufacturer (dosage kits Chemicon international, INC).

Fluorine dosage

Fluorine dosages were carried out on the toothpastes A, B and E. A's potential difference (PD) was measured by a fluorine electrode, coupled with a saturated calomel electrode.

The total fluorine corresponded to the fluorine present in the toothpaste. To find out what this quantity was, an acid attack was realised in order to liberate all the fluorine from the toothpaste. 0.4 grams of toothpaste were diluted in 80g of water and were then attacked by 1.7mL of concentrated hydrochloric acid. The solution was then completed with water to have 100g of solution at the end (dilution 250 times). Before measuring the PD, the solution of toothpaste was centrifuged for 10 minutes at 5000 spins/minute, then diluted twice respecting the ratio (water/buffer) used for the preparation of standards of the calibration curve.

To estimate the quantity of fluorine fixed on the enamel after brushing, ceramic discs of analogous chemical composition and structure to the enamel were placed 7 hours in solutions containing 60% toothpaste. These solutions were manually mixed from time to time. The discs were then cleaned with distilled water, dried, weighed and dissolved by a minimum of perchloric hydrochloric acid (approximately 1.7 mL). 25g of water were then added. These solutions were diluted twice before the measure of the PD.

Analyses statistiques

Pour chaque paramètre, une moyenne est calculée. L'analyse statistique a été effectuée par le test de Student dit de l'écart réduit ou test des échantillons non appariés, avec un risque alpha de 5 %.

Résultats

Évaluation de l'efficacité anti-inflammatoire

Évaluations histologiques des modifications vasculaires

La gingivite expérimentale induite par SP et LPS s'est traduite par une dilatation des capillaires significativement supérieure à celle des gencives témoins (**tableaux III et IV**). Le dentifrice placebo n'a pas permis de réduire la surface moyenne des capillaires dilatés par rapport au groupe contrôle (215,7 μm^2 vs 263 μm^2 respectivement). Une diminution statistiquement significative de la surface occupée par les capillaires du chorion a été observée avec les dentifrices C, D et E (**tableau III**). Concernant le pourcentage de capillaires dilatés (**tableau IV**), il n'existe pas de différence entre le groupe contrôle et le dentifrice placebo. Une différence statistiquement significative avec les dentifrices D ($p=0,03$) et E ($p=0,01$) a été observée.

Statistical analyses

For each parameter, an average is worked out. The statistical analysis has been carried out using Student's test, said of decreased gap, or test of a non paired sample, with an alpha risk of 5%.

Results

Evaluation of the anti-inflammatory efficiency

Histological evaluations of vascularly modifications

The experimental gingivitis induced by SP and LPS gave rise to a dilation of the capillaries, significantly superior to that of the control gingivas (**tables III and IV**). The placebo toothpaste did not help to reduce the average size of the dilated capillaries in comparison to the control group (215,7 μm^2 vs 263 μm^2 , respectively). We observed a statistically significant reduction of the surface occupied by the chorionic capillaries with the use of the toothpastes C, D and E (**table III**). Regarding the percentage of dilated capillaries (**table IV**), there was no difference between the control group and the placebo toothpaste. However, a significant statistical difference was observed with the toothpastes D ($p=0,03$) et E ($p=0,01$).

TABLEAU III - TABLE III

Mesure de la surface moyenne de capillaires dilatés dans le chorion après stimulation par la SP et le LPS et traitement par les différents dentifrices. Les dentifrices C, D et E réduisent statistiquement la surface moyenne des capillaires par rapport au contrôle ($p<0,05$). Il existe une différence statistiquement significative entre le traitement A et le traitement E ($p<0,05$).

Measure of the average size of dilated capillaries in the chorion after stimulation by the SP and LPS and treatment of the different toothpastes. The toothpastes C, D and E reduce statistically the average size of the capillaries compared to the control ($p<0.05$). There is a statistically significant difference between treatment A and E ($p<0.05$).

TRAITEMENT TREATMENT	SURFACE MOYENNE DES CAPILLAIRES (μm^2) QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION
Contrôle - Control	263,5 $\pm$ 84
A	215,7 $\pm$ 73,36
C	162 $\pm$ 77
D	140 $\pm$ 46,7
E	153 $\pm$ 83

TABLEAU IV - TABLE IV

Mesure histologique de la proportion (%) des capillaires dilatés dans le chorion après stimulation par la SP et le LPS plus ou moins associée aux différents dentifrices. Il existe une différence statistiquement significative pour les dentifrices D et E.

Histological measure of the proportion (%) of dilated capillaries in the chorion after stimulation by SP and LPS more or less associated to the different toothpastes. There exists a statistically significant difference for the toothpastes D and E.

TRAITEMENT TREATMENT	% CAPILLAIRES DILATÉS % DILATED CAPILLARIES
Contrôle - Control	94,65 $\pm$ 10,8
A	91,37 $\pm$ 11,8
C	80,66 $\pm$ 28,3
D	83,8 $\pm$ 14,6
E	80,34 $\pm$ 16,3

Évaluations histologiques de l'œdème

Après stimulation inflammatoire l'œdème présentait un score modéré. Ce score restait inchangé avec le dentifrice placebo et était réduit en moyenne de 20 % avec les 3 dentifrices testés. Cette réduction n'était pas statistiquement significative (tableau V).

Analyse biochimique

L'effet anti-inflammatoire des différents dentifrices a également été évalué par le dosage de l'interleukine 8 dans le surnageant de culture des gencives (tableau VI). Le traitement par le dentifrice placebo n'a pas permis une réduction statistiquement significative du taux d'IL-8 par rapport au contrôle. Le traitement par les dentifrices C, D et E a montré une réduction statistiquement significative de la concentration d'IL-8 par rapport au groupe contrôle ($p < 0,05$).

TABLEAU V - TABLE V

Évaluation semi-quantitative de l'œdème au sein du chorion.
Semi-quantitative evaluation of the oedema at the heart of the chorion.

TRAITEMENT TREATMENT	SCORE D'ŒDÈME OEDEMA SCORE
Contrôle - Control	1,87 ± 1,1
A	1,9 ± 1,26
C	1,43 ± 0,9
D	1,5 ± 0,86
E	1,5 ± 0,96

Histological evaluations of the oedema

After inflammatory stimulation, the oedema presented a moderated score. This score was unchanged with the placebo toothpastes and was reduced on average of 20% with the three tested toothpastes. This reduction was not statistically significant (table V).

Biochemical Analysis

The anti-inflammatory effect of the different toothpastes were also evaluated by the dosage of interleukin-8 in the supernatant of the cultures of gingivas (table VI). The use of the placebo toothpaste did not statistically significantly reduce the level of IL-8 in comparison to the control. The treatment by the toothpastes C, D and E showed a statistically significant reduction of the concentration of IL-8 in comparison with the control group ($p < 0.05$).

TABLEAU VI - TABLE VI

Dosage de l'IL-8 dans le surnageant de culture. Le traitement placebo ne permet pas de réduction statistiquement significative par rapport au groupe contrôle. Les traitements C, D et E réduisent de façon statistiquement significative la concentration d'IL-8 par rapport au contrôle ($p < 0,05$).

Dosage of IL-8 in the supernatant of culture. The placebo treatment does not allow a significant statistical reduction in comparison to the control group. The treatments C, D and E reduce statistically significantly the concentration of IL-8 in comparison to the control ($p < 0.05$).

TRAITEMENT TREATMENT	CONCENTRATION IL-8 (pg/mL) CONCENTRATION IL-8 (pg/mL)
Contrôle - Control	722,2 ± 307,2
A	642 ± 262,3
C	470 ± 319,5
D	485,4 ± 166,9
E	505,35 ± 283,2

Évaluation de la libération de fluor

Les dentifrices B et E avaient une concentration en fluor de l'ordre de 1500 ppm. Le dentifrice A révélait 40 ppm de fluor, ce qui pourrait être dû à une pollution lors de la préparation (tableau VII).

Le fluor libre correspond au fluor libéré par le dentifrice lors du brossage des dents, c'est-à-dire à pH neutre avec dissolution du dentifrice dans de l'eau. L'étude de la concentration en fluor libre a mis en évidence que 90 % du fluor contenu dans les pâtes dentifrice était sous forme libre. La présence de l'énoxolone dans le dentifrice n'a pas modifié la libération du fluor (tableau VIII).

Evaluation of the liberation of fluorine

The toothpastes B and E had a heavy concentration of fluorine in the range of 1500 ppm. The toothpaste A, however, was very poor in fluorine, in the range of 40 ppm. This could be explained by a pollution during preparation (table VII).

The free fluorine corresponded to the fluorine liberated by the toothpaste during the brushing of the teeth. Thanks to the dissolution of the toothpaste in the water, the pH was approximately neutral. The study of the concentration of free fluorine showed that 90% of fluorine contained in the toothpastes was free. The presence of enoxolone in the toothpaste did not modify at all the liberation of

Après avoir été mis en contact pendant 7 heures avec les solutions des 3 dentifrices, les pastilles de céramique ont montré une fluoruration contrairement au dentifrice placebo (**tableau IX**).

fluorine (**table VIII**). Having been in contact with the solutions of the three toothpastes for seven hours, the ceramic discs showed a fluorination, which did not happen with the placebo toothpastes (**table IX**).

TABLEAU VII - TABLE VII

Concentration en fluor total dans les différents dentifrices. Les dentifrices B et E présentent la même concentration en fluor.
Total fluorine concentration in all the different toothpastes. The toothpastes B and E show the same concentration in fluorine.

	DENTIFRICE TESTÉ TESTED TOOTHPASTES		
	A	B	E
Ddp (mV) - Ddp (mV)	287	376	376
Concentration en fluor total dans la solution dosée (ppm). <i>Concentration of total fluorine in the dosed solution (ppm).</i>	0,06578093	2,52522453	2,52522453
Concentration en fluor total dans le dentifrice (ppm). <i>Concentration of total fluorine in the toothpaste (ppm).</i>	42,8	1516,7	1519,3

TABLEAU VIII - TABLE VIII

Concentration en fluor libre dans les différents dentifrices. Les dentifrices B et E présente les mêmes quantités de fluor libre.
Concentration in free fluorine in the different toothpastes. The toothpastes B and E present the same quantities of free fluorine.

	DENTIFRICE TESTÉ TESTED TOOTHPASTES		
	A	B	E
Ddp(mV) - Ddp(mV)	275	394	394
Concentration en fluor dans l'échantillon dosé (ppm). <i>Concentration in fluorine in the dosed sample (ppm).</i>	0,04022537	5,28080341	5,28080341
Concentration en fluor libre dans le dentifrice (ppm). <i>Concentration in free fluorine in the toothpaste (ppm).</i>	10,3	1399,5	1349,2

TABLEAU IX - TABLE IX

Teneur moyenne en fluor dans les pastilles de céramique. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les dentifrices B et E.

Average fluorine contained in ceramic discs. There is no significant statistical difference between toothpastes B and E.

	DENTIFRICE TESTÉ TESTED TOOTHPASTES		
	A	B	E
Ddp moyenne (mV) <i>Average Ddp (mV)</i>	256,6	330	331
Concentration moyenne en fluor dans la solution de pastille (ppm). <i>Average concentration in fluorine in the disc solution (ppm).</i>	0,04	0,769	0,805
Teneur moyenne en fluor dans les pastilles (%). <i>Average amount of fluorine contained in the discs (%).</i>	0,00	0,031	0,031

Discussion

Il est clairement établi que les maladies parodontales sont des pathologies inflammatoires d'origine infectieuse et que l'entretien d'une inflammation chronique induite par l'agression du biofilm bactérien conduit à la destruction progressive du tissu osseux alvéolaire (Cochran 2008 ; Kornman 2008).

Les conditions expérimentales de l'étude présentée ici permettent de reproduire fidèlement la situation pathologique d'une gingivite induite par la plaque. Le lipopolysaccharide (LPS) rajouté au milieu de culture permet de déclencher une réponse inflammatoire des cellules gingivales due à une agression bactérienne retrouvée dans cette étude par la sécrétion d'interleukine 8.

Cette cytokine induite par les toxines bactériennes, joue un rôle essentiel dans l'induction et l'entretien des gingivites (Offenbacher et coll., 2009). L'utilisation de substance P est quant à elle essentielle pour reproduire les effets vasculaires et neurogènes (vasodilatation et œdème) rencontré au cours de l'inflammation gingivale (Pradeep et coll., 2009).

Les résultats de notre étude montrent d'une part que l'enoxolone contenu dans les différentes pâtes dentifrices à des concentrations de 0,7 ou 1 % permet de réduire les signes histologiques (pourcentage de capillaire dilatés, œdème) comme la concentration en cytokine pro-inflammatoire (interleukine-8).

Par ailleurs, de façon intéressante l'ajout à la pâte dentifrice d'un sel de fluor n'apparaît pas modifier les propriétés anti-inflammatoires de l'enoxolone. Inversement, le fait d'associer l'enoxolone à une pâte dentifrice contenant un sel de fluor n'a pas diminué les quantités de fluor libéré ni incorporé aux pastilles de céramiques. Les résultats de cette étude mettent donc clairement en évidence qu'il n'existe pas d'antagonisme entre les deux principes actifs qui conservent leurs différentes propriétés au sein de la pâte dentifrice.

L'enoxolone ou acide 18 β glycyrrhétinique est un aglycone constitutif de la glycyrrhizine, triterpène glycosidé (saponoside) de la réglisse, qui est extrait d'une légumineuse « *Glycyrrhiza glabra* ». La glycyrrhizine est utilisée depuis des millénaires en médecine chinoise pour sa saveur et ses propriétés médicinales (Shibata 2000). L'enoxolone a démontré un certain nombre d'activités pharmacologiques, comme, entre autre, un effet anti-ulcéral et anti-inflammatoire (Fujisawa et coll., 2000 ; Kang et coll., 2005).

Bien que de structure chimique proche de celle des glucocorticoïdes, l'enoxolone semble posséder un mécanisme d'action original et différent à la fois de celui

Discussion

It is clearly established that the parodontal diseases are inflammatory pathologies with infectious origins, and that the maintenance of chronic inflammation induced by the aggression of the bacterial biofilm leads to the progressive destruction of the alveolar bone tissue (Cochran 2008; Kornman 2008).

The experimental conditions of the study presented here helped reproduce faithfully the pathological situation of a gingivitis induced by plaque. The lipopolysaccharid (LPS) added to the culture medium triggered an inflammatory response of the gingival cells, due to a bacterial aggression that can be found in our study by the secretion of interleukin-8.

This cytokin, induced by the bacterial toxins, played an essential role in the induction and the maintenance of the gingivitis (Offenbacher et al., 2009). The use of the substance P was essential to reproduce the vascular and neurogenic effects (vasodilatation and oedema) encountered during the gingival inflammation (Pradeen et al., 2009).

The results of our study showed that the enoxolone contained in the different toothpastes of concentrations of 0.7% or 1% allowed the reduction of the histological signs (dilated capillaries, oedema) as well as the concentration in pro-inflammatory cytokin (interleukin-8).

In addition to this, interestingly, the addition of fluorine salt to the toothpaste did not seem to modify the anti-inflammatory proprieties of enoxolone. Conversely, the association of enoxolone to a toothpaste containing a fluorine salt has not reduced the quantities of liberated or incorporated fluorine to the ceramic discs.

The results of this study clearly demonstrate that there is no antagonism between the two active principles at the heart of the toothpaste as they retain their different properties.

The enoxolone or 18 β -glycyrrhetic acid is a constitutive aglycon, triterpene glycoside (saponosid) of licorice, which is the extract of a leguminous "*Glycyrrhiza glabra*". The glycyrrhizine has been used for centuries in chinese medicine for its taste and medicinal properties (Shibata 2000). The enoxolone has demonstrated a certain number of pharmaceutical activities such as an anti-ulcerant effect and anti-inflammatory effect (Fujisawa et al., 2000 ; Kang et al., 2005).

Even though the chemical structure of enoxolone is similar to that of glucocorticoids, the enoxolone seems to possess an original action mechanism, different from

des stéroïdes mais également des anti-inflammatoires non stéroïdiens. L'intérêt de l'enoxolone dans la prise en charge des gingivites a été montré chez l'homme (Louise 1983 ; Mattout 1989) et des travaux récents chez l'animal laissent suggérer qu'il puisse diminuer la perte osseuse d'os alvéolaire induite par *P. gingivalis* (Sasaki et coll., 2010). Ainsi, en complément des traitements conventionnels recommandés (HAS 2002), l'utilisation d'un dentifrice contenant de l'enoxolone peut permettre une réduction des signes inflammatoires des maladies parodontales dont notamment la gingivite.

Le fluorhydrate de nicométhanol est lui, un sel de fluor organique connu de longue date (Mellberg 1991) breveté sous le nom de Fluorinol®. Contenu dans de nombreuses pâtes dentifrice il a démontré une activité anticariéuse par ses propriétés de reminéralisation et inhibitrice de la déminéralisation (Gelhard et Arends, 1988 ; Tadmor et coll., 1989 ; Ten Cate et coll., 2008).

Finalement au regard des résultats de cette étude, nous pouvons considérer que l'utilisation régulière d'une pâte dentifrice contenant à la fois de l'enoxolone et du Fluorinol® pourra permettre une réduction de l'inflammation gingivale tout en assurant une prophylaxie de la carie dentaire.

Conflits d'intérêt

Cette étude a été financée par le Laboratoire Pierre Fabre Médicament.

steroids and from non-steroidal anti-inflammatories. The benefits of enoxolone in treating gingivitis have been demonstrated on men (Louise 1983; Mattout 1989) and recent works on animals have suggested that it may help reduce the bone loss of alveolar bone induced by *P. gingivalis* (Sasaki et al., 2010). In addition to the conventional recommended treatments (HAS 2002), the use of a toothpaste which contains enoxolone can reduce inflammatory signs of parodontal diseases, notably gingivitis.

The nicomethanol fluorhydrate is an organic fluorine salt which has been renowned for a long time, patented as Fluorinol®. Contained in many toothpastes, this product has been shown to have an anti-cavity quality, thanks to its remineralisation properties, and demineralisation inhibition properties (Gelhard and Arends, 1998 ; Tadmor et al., 1989; Ten Cate et al., 2008).

Finally, the analysis of the results of this study shows that regular use of a toothpaste which contains both enoxolone and Fluorinol® will help a reduction of the gingival inflammation, whilst, at the same time, giving the assurance of a prophylaxy of the dental cavity.

Conflicts of interest

This study has been financed by the Laboratory Pierre Fabre Médicament.

Traduction : Oriane Cannac

Demande de tirés-à-part :

Dr. Vianney DESCROIX - 15-21, rue de l'École de Médecine - 75270 PARIS Cedex 06

- BHATAVADEKAR N.B., WILLIAMS R.C.
New directions in host modulation for the management of periodontal disease. *J Clin Periodont* 2009;**36**:124-126. Cat 1
- BOISNIC S., BEN SLAMA L., BRANCHET-GUMILA M.C., WATTS M., D'ARROS G.
[Anti-inflammatory effect of enoxolone in an ex-vivo human gingival mucosa model].
Rev Stomat Chir Maxillofac 2010;**111**:69-73. Cat 2
- COCHRAN D.L.
Inflammation and bone loss in periodontal disease.
J Periodont 2008;**79**:1569-1576. Cat 1
- DAVIES R.M.
Toothpaste in the control of plaque/gingivitis and periodontitis. *Periodont 2000* 2008;**48**:23-30. Cat 1
- FUJISAWA Y., SAKAMOTO M., MATSUSHITA M., FUJITA T., NISHIOKA K.
Glycyrrhizin inhibits the lytic pathway of complement-possible mechanism of its anti-inflammatory effect on liver cells in viral hepatitis. *Microbio Immun* 2000;**44**:799-804. Cat 2
- GELHARD T.B., ARENDS J.
The effect of fluoride containing toothpastes on sound human enamel in vivo during 3 weeks.
J Biol Buc 1988;**16**:95-99. Cat 1
- HAS
Parodontopathies : diagnostic et traitements.
Recommandation pour la pratique clinique 2002. Cat 1
- KANG O.H., KIM J.A., CHOI Y.A., PARK H.J., KIM D.K., AN Y.H., CHOI S.C., YUN K.J., NAH Y.H., CAI X.F., KIM Y.H., BAE K.H., LEE Y.M.
Inhibition of interleukin-8 production in the human colonic epithelial cell line HT-29 by 18 beta-glycyrrhetic acid.
Int J Mol Med 2005; **15**:981-985. Cat 2
- KORNMAN K.S.
Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look.
J Periodont 2008;**79**:1560-1568. Cat 1
- LOUISE F.
[Effect of glycyrrhetic acid on the status of gingival health. Clinical study]. *Inform Dent* 1983;**65**:3043-3051. Cat 1
- MATTOUT P.
[The effect of glycyrrhetic acid on gingival inflammation with an elevated bacterial plaque index].
Chir Dent Fr 1989;**59**:105-109. Cat 1
- MELLBERG JR.
Fluoride dentifrices: current status and prospects.
Int Dent J 1991;**41**:9-16. Cat 1
- NEWBRUN E.
What we know and do not know about fluoride.
J Public Health Dent 2010;**70**:227-233. Cat 1
- OFFENBACHER S., BARROS S.P., PAQUETTE D.W., WINSTON J.L., BIESBROCK AR., THOMASON R.G., GIBB R.D., FULMER A.W., TIESMAN J.P., JUHLIN K.D., WANG S.L., REICHLING T.D., HEN K.S., HO B.
Gingival transcriptome patterns during induction and resolution of experimental gingivitis in humans.
J Periodont 2009;**80**:1963-1982. Cat 1
- OHRN K, SANZ M. Prevention and therapeutic approaches to gingival inflammation.
J Clin Periodont 2009;**36** Suppl 10:20-26. Cat 1
- PRADEEP AR, RAJ S, ARUNA G, CHOWDHRY S.
Gingival crevicular fluid and plasma levels of neuropeptide Substance-P in periodontal health, disease and after nonsurgical therapy. *J Periodont Res* 2009;**44**:232-237. Cat 1
- SASAKI H., SUZUKI N., ALSHWAIMI E., XU Y., BATTAGLINO R., MORSE L., STASHENKO P.
18beta-glycyrrhetic acid inhibits periodontitis via glucocorticoid-independent nuclear factor-kappaB inactivation in interleukin-10-deficient mice.
J Periodont Res 2010;**45**:757-763. Cat 2
- SCULLY C., FIELD E.A., RANDALL C.
Over-the-counter remedies for oral soreness.
Periodont 2000 2008;**48**:76-84. Cat 1
- SHIBATA S.
A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice.
Yakugaku Zasshi 2000;**120**:849-862. Cat 1
- TADMOR E., POITOU P., GEDALIA I.
In vitro acid decalcification of human surface enamel pretreated with toothpaste slurries.
J Oral Rehabil 1989;**16**:613-616. Cat 2
- TEN CATE J.M., BUIJS M.J., MILLER C.C., EXTERKATE R.A.
Elevated fluoride products enhance remineralization of advanced enamel lesions. *J Dent Res* 2008;**87**:943-947. Cat 1
- TROMBELLI L., BOTTEGA S., ORLANDINI E., SCAPOLI C., TOSI M., TATAKIS D.
Response to a plaque control regimen on different levels of gingival inflammation. *Minerva Stomat* 2003;**52**:75-79. Cat 1
- WU C.D., SAVITT E.D.
Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodont 2000* 2002;**28**:91-105. Cat 1