



Un peptide biomimétique pour protéger l'ADN de la peau

La protection de la peau est assurée par le facteur de transcription Nrf2 qui active l'expression des enzymes antioxydantes et de détoxification. Mibelle Biochemistry a développé un peptide qui stimule l'activité de Nrf2, pour protéger la peau contre les dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées par les UVA.

Le vieillissement de la peau est causé par un excès d'espèces chimiques réactives (ECR) qui se forment suite à l'exposition aux UV, aux polluants ainsi que naturellement, lors du métabolisme cellulaire normal. La protection de la peau est assurée par

le facteur de transcription Nrf2 qui active l'expression des enzymes antioxydantes et de détoxification. Nrf2 est normalement réprimé par sa liaison à Keap1 dans le cytoplasme. En réponse à un stress chimique, Nrf2 est libéré par Keap1 afin de migrer vers le noyau pour activer l'expression de gènes. Mibelle Biochemistry

a développé un peptide qui comprend la séquence de liaison de Nrf2 à Keap1 afin d'empêcher la formation de ce complexe et de cette façon stimuler l'activité Nrf2. Des essais réalisés sur des explants de la peau et des études cliniques ont permis de montrer la capacité de ce peptide à stimuler les

A biomimetic peptide to protect skin DNA

Protection of the skin is mediated by the transcription factor Nrf2 which activates the expression of antioxidant and detoxification enzymes. Mibelle Biochemistry developed a peptide which stimulates Nrf2 activity and protects the skin against damages induced by reactive oxygen species (ROS) which are generated by UVA.

Skin aging is induced by an excess of reactive chemical species (RCS) caused by UV exposure, by pollutants or as adverse effects of normal cellular metabolism. Protection of the skin is mediated by the transcription factor Nrf2 which activates the expression of antioxidant and detoxification enzymes. Nrf2 is normally repressed by binding to Keap1 in the cytoplasm. In response to chemical

stress, Nrf2 is released from Keap1 to migrate into the nucleus for activation of gene expression. Mibelle Biochemistry developed a peptide which comprises the binding sequence of Nrf2 to Keap1 in order to disrupt the complex and in this way to stimulate Nrf2 activity. In assays with skin explants and in clinical studies, this peptide was found to stimulate Nrf2-regulated enzymes and to protect the skin against damages induced by reactive

oxygen species (ROS) which are generated by UVA.

► **DNA damages are induced by environmental factors but also chronological aging**

It is well known that lifestyle factors such as sun bathing or smoking and environmental factors such as pollution accelerate

enzymes dépendantes de Nrf2 et à protéger la peau contre les dommages induits par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées par les UVA.

► L'ADN altéré par les facteurs environnementaux mais aussi par le vieillissement chronologique

Le style de vie notamment l'exposition au soleil et la consommation de tabac ainsi que les facteurs environnementaux tels que la pollution contribuent à la formation d'ERO et accélèrent ainsi le vieillissement de la peau. Cependant, il y a également libération d'ERO au cours du vieillissement chronologique normal puisque le métabolisme de l'énergie dans les mitochondries génère en permanence des sous-produits chimiques réactifs. Les ECR comprennent les

radicaux libres contenant des électrons libres tels que les radicaux superoxyde, hydroxyle ou de l'oxyde nitrique, mais également les composés toxiques électrophiles tels que le peroxyde d'hydrogène. Ces ECR finissent par provoquer des lésions au niveau de l'ADN et l'oxydation des lipides et protéines.

► Les cellules de la peau possèdent leur propre système de protection

Les cellules de nos tissus réagissent à un stress oxydant grâce à des molécules antioxydantes et une expression à la hausse des enzymes antioxydantes et de détoxification. Ces dernières neutralisent les électrophiles et reconstituent les antioxydants cellulaires consommés. Ce système de protection cellulaire ne peut toutefois faire face à un excès

d'ERO. De plus, il décline avec le temps. L'induction d'enzymes de protection en réponse à un stress oxydant est régulée au niveau transcriptionnel (Figure 1). Ces enzymes se caractérisent par une séquence de gènes spécifique, appelée élément de la réponse antioxydante (ARE). L'expression des gènes codant pour ces enzymes est régulée par le facteur de transcription Nrf2 qui se lie au site ARE au niveau de la séquence régulatrice promotrice^{1,2}. Ainsi, Nrf2 induit l'expression d'un certain nombre de gènes jouant un rôle dans la protection des cellules contre les radicaux libres et le stress oxydatif comprenant des gènes impliqués dans la synthèse du glutathion, l'homéostasie des groupements thiol des protéines et des enzymes antioxydantes de phase II telles que l'hème oxygénase 1 (HO-1) et la NAD(P)H quinone-déshydrogénase 1 (NQO1)³.

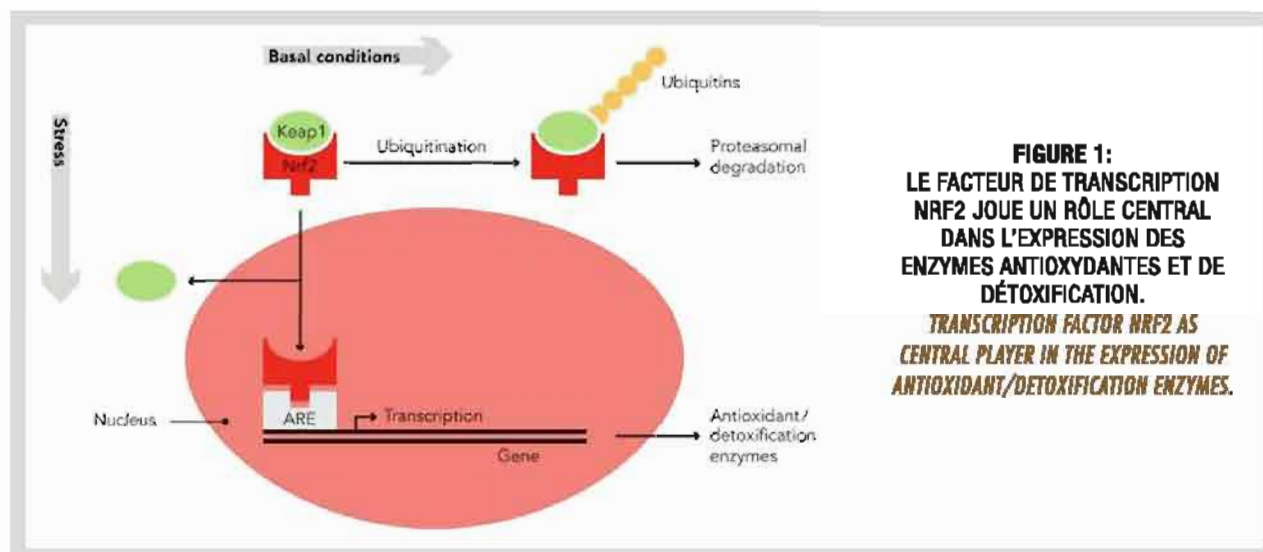


FIGURE 1:
LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NRF2 JOUE UN RÔLE CENTRAL DANS L'EXPRESSION DES ENZYMES ANTIOXYDANTES ET DE DÉTOXIFICATION.

TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 AS CENTRAL PLAYER IN THE EXPRESSION OF ANTIOXIDANT/DETOXIFICATION ENZYMES.

skin aging. The common mechanism involved is based on the formation of RCS. But this is also the principal mechanism in normal, chronological skin aging because the energy metabolism in mitochondria continuously produces reactive chemical byproducts. RCS are free radicals containing unpaired electrons such as superoxide, hydroxyl or nitric oxide but also electrophilic toxic compounds such as hydrogen peroxide. These RCS finally lead to DNA damage and the formation of oxidized lipids and proteins.

► Skin cells have their own protection system

The cells in our tissues normally react to oxidant stress with antioxidant molecules

and an up-regulated expression of antioxidant and detoxification enzymes. These latest neutralize electrophiles and also replenish used cellular antioxidants. This cellular protection system can however not cope with an excess of RCS. In addition, it declines with age. The induction of protective enzymes in response to an oxidative stress is regulated at the transcriptional level (Figure 1). These enzymes are characterized by a specific gene sequence, called antioxidant response element (ARE). The expression of the genes coding for these enzymes is regulated by the transcription factor Nrf2 that binds to the ARE site in the promoter regulatory sequence^{1,2}. Like so, Nrf2 induces the expression of a number of genes playing a role in protecting cells against free radicals

and oxidative stress comprising genes involved in glutathione synthesis, protein thiol homeostasis and phase II antioxidant enzymes such as heme oxygenase 1 (HO-1) and NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1)³.

► Activation of the cellular self-protection system

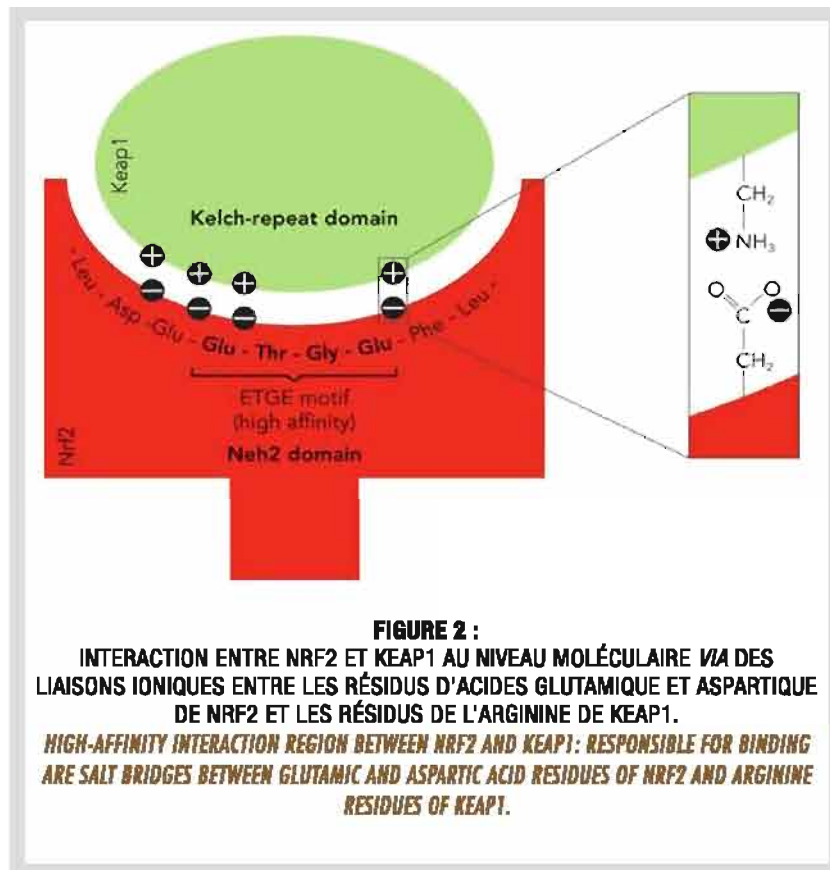
Under basal conditions, Nrf2 is repressed in the cytoplasm by binding to Keap1 (Figure 1). In response to toxic chemicals and oxidative stress, the Nrf2-Keap1 complex is disrupted and Nrf2 translocates into the cellular nucleus to activate gene expression. When bound to Keap1, Nrf2 is constantly degraded because Keap1 targets Nrf2 for ubiquitination and degradation by the proteasome⁴.

► Activation du système d'autoprotection cellulaire

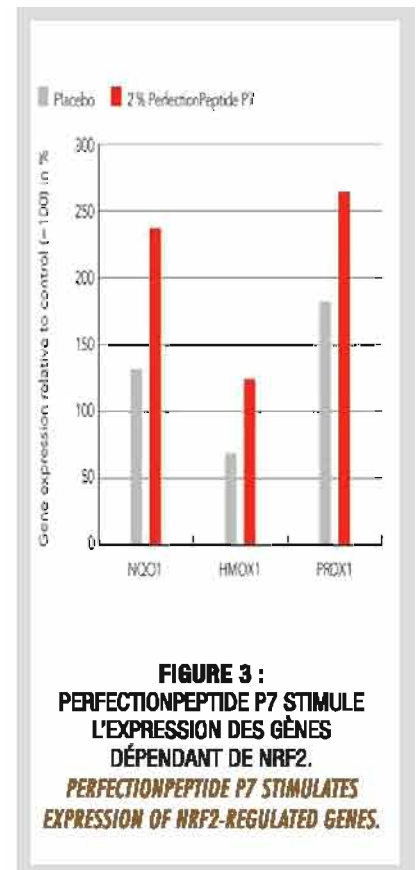
Dans des conditions basales, Nrf2 est réprimé dans le cytoplasme par sa liaison à Keap1 (Figure 1). En réponse à des substances chimiques toxiques et au stress oxydatif, le complexe Nrf2-Keap1 se dissocie et Nrf2 migre vers le noyau cellulaire pour activer l'expression génique. Lorsqu'il est lié à Keap1, Nrf2 est constamment dégradé parce Keap1 cible Nrf2 pour son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome⁶.

► Développement d'un peptide biomimétique pour activer le système d'autoprotection cellulaire

La Figure 2 montre l'interaction entre Nrf2 et Keap1 au niveau moléculaire. Le motif 'ETGE' de l'acide aminé du domaine Neh2 de Nrf2 interagit avec le domaine Kelch de la protéine Keap1[®] via des liaisons ioniques entre les résidus d'acides glutamique et aspartique du domaine Neh2 et les résidus de l'arginine du domaine Kelch.



Le peptide acétyl-DEETGEF qui contient le motif 'ETGE' a été développé pour entrer en compétition avec Nrf2 en ce qui concerne sa liaison à Keap1. Cet heptapeptide a été incorporé dans un système de vectorisation pour le stabiliser et pour améliorer sa pénétration dans la peau et son absorption par les cellules. La capacité de PerfectionPeptide P7, l'ingrédient actif contenant le peptide acétyl-DEETGEF à stimuler les enzymes antioxydantes dépendantes de Nrf2 a été confirmée par PCR quantitative.



► Development of a biomimetic peptide to activate the cellular self-protection system

Figure 2 shows the interaction between Nrf2 and Keap1 at the molecular level. The 'ETGE' amino acid motif in the Neh2 domain of Nrf2 interacts with the Kelch domain of the Keap1 protein¹⁵ via salt bridges between glutamic and aspartic acid residues in the Neh2 domain and arginine residues in the Kelch domain. The peptide acetyl-DEETGEF containing the 'ETGE' motif was developed to compete with Nrf2 for binding to Keap1. This heptapeptide was incorporated into

a carrier system for stabilization and for better penetration into the skin and increased cellular uptake.

The capacity of PerfectionPeptide P7, the resulting active ingredient, to stimulate Nrf2-dependent antioxidant enzymes was confirmed by quantitative PCR. A 2% PerfectionPeptide P7 emulsion or its corresponding placebo were topically applied for 6h to human skin explants from an abdominal biopsy. The expression of the Nrf2-regulated genes was analyzed by using quantitative PCR on mRNA extracted from the skin samples. Compared to the placebo, PerfectionPeptide P7 was shown to up-regulate the typical Nrf2-dependant genes:

NAD(P)H dehydrogenase quinone 1 (NQO1) up to 105%, heme oxygenase 1 (HO-1), peroxiredoxin 1 (PRDX1) (Figure 3). These results demonstrate an efficient competition of the heptapeptide with Nrf2 for binding to Keap1 and the resulting activation of Nrf2.

► Protective effect against UV-induced formation of sunburn cells and depletion of Langerhans cells

PerfectionPeptide P7 was applied at 0.037 and 0.11% to human skin explants received from an abdominal

Une émulsion à 2% de PerfectionPeptide P7 ou le placebo correspondant ont été appliqués par voie topique pendant 6h sur des explants de peau humaine provenant d'une biopsie abdominale. L'expression des gènes régulés par Nrf2 a été analysée par PCR quantitative sur l'ARNm extrait des échantillons de peau. Les résultats ont montré que, par rapport au placebo, PerfectionPeptide P7 régulait à la hausse les gènes dépendant de Nrf2: la NAD(P)H quinone-déshydrogénase 1 (NQO1) jusqu'à 105%, l'hème oxygénase 1 (HO-1) et la peroxyrédoxine 1 (Prdx1) (Figure 3). Ces résultats

démontrent bien une compétition efficace de l'heptapeptide avec Nrf2 pour sa liaison à Keap1 conduisant à l'activation de Nrf2.

► Effet protecteur contre la formation de cellules « coup de soleil » et la perte de cellules de Langerhans, induites par les UV

PerfectionPeptide P7 a été appliqué à 0,037 et 0,11% sur des explants de peau humaine provenant d'une biopsie abdominale. Les explants

ont été pré-traités ou non (contrôle) pendant 24h avec les produits du test (en systémique et appliqués de façon topique) ou le produit référence, la crème solaire SPF 30 (application topique à 5 mg/cm²). L'irradiation UV a été effectuée avec 1,25 J/cm² d'UVB et 18,7 J/cm² d'UVA. Après irradiation, le traitement a été renouvelé et les explants ont été à nouveau incubés pendant 24h. La formation des cellules « coup de soleil » a été analysée par marquage Hematoxyline - Eosine - Safran et les cellules de Langerhans par marquage immunohisto-chimique. Comparativement aux explants de peau irradiés non traités, le traitement avec 0,11% de PerfectionPeptide P7 a exercé un effet protecteur contre la formation de cellules « coup de soleil » et la perte de cellules de Langerhans presque aussi efficacement que la crème solaire (Figure 4 et Figure 5).

► Protection de l'ADN contre le stress oxydant

Dans une étude clinique avec 10 sujets âgés de 42 à 64 ans, une émulsion à 2% de PerfectionPeptide P7 a été appliquée deux fois par jour pendant deux semaines sur l'intérieur de l'avant-bras. La formulation placebo

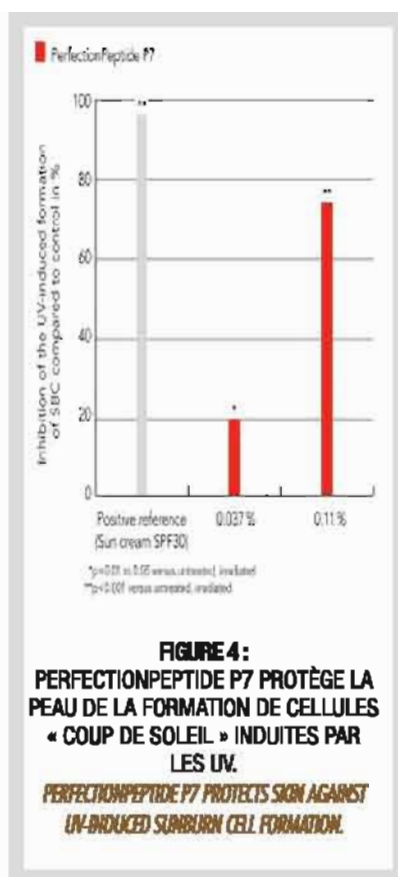


FIGURE 4 :
PERFECTIONPEPTIDE P7 PROTÈGE LA PEAU DE LA FORMATION DE CELLULES « COUP DE SOLEIL » INDUITES PAR LES UV.
PERFECTIONPEPTIDE P7 PROTECTS SKIN AGAINST UV-INDUCED SUNBURN CELL FORMATION.

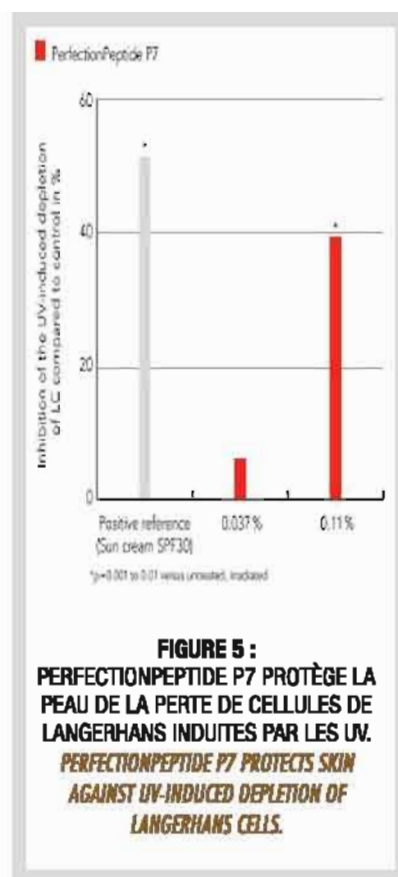


FIGURE 5 :
PERFECTIONPEPTIDE P7 PROTÈGE LA PEAU DE LA PERTE DE CELLULES DE LANGERHANS INDUITES PAR LES UV.
PERFECTIONPEPTIDE P7 PROTECTS SKIN AGAINST UV-INDUCED DEPLETION OF LANGERHANS CELLS.

biopsy. The explants were pre-treated or not (control) for 24h with the test compounds (systemically and topically applied) or the reference compound, sun cream SPF 30 (topically applied at 5mg/cm²). UV-irradiation was done with 1.25J/cm² UVB and 18.7J/cm² UVA. After irradiation, the treatments with the test and reference compounds were renewed and the explants were incubated again for 24h. Formation of sunburn cells was analyzed by Hematoxylin-Eosin-Saffron staining and Langerhans cells were detected by immunohistolabeling. Compared to irradiated but untreated skin explants, treatment with 0.11%

PerfectionPeptide P7 protected skin explants against sunburn cell formation and depletion of Langerhans cells almost as efficiently as the sun cream (Figures 4 & 5).

► Protection of DNA against oxidative stress

In a clinical study with 10 subjects aged between 42 and 64, an emulsion with 2% PerfectionPeptide P7 was applied twice daily for two weeks on the inner side of the forearm. The placebo formulation was applied to the other forearm. Two hours after the last product application, the test sites were

irradiated with 20J/cm² UVA. Immediately after irradiation, suction blister biopsies were generated for immunohistochemical analysis of the DNA damage marker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the epidermis. In contrast to UVB that is damaging also by direct interaction with cellular components, UVA-induced stress is mainly a consequence of formation of ROS. These can cause oxidation of DNA bases. Compared to the placebo, treatment with PerfectionPeptide P7 significantly reduced UVA-induced formation of 8-OHdG (Figure 6). This result clearly demonstrates the in vivo efficacy of the heptapeptide to protect against ROS. The effect is based on stimulation of the Nrf2-regulated cellular defense system.

► Conclusion

Formation of RCS that are damaging our skin is induced by UV, pollutants or as adverse effects of normal cellular metabolism. In order to stimulate the cellular self-protection system which is

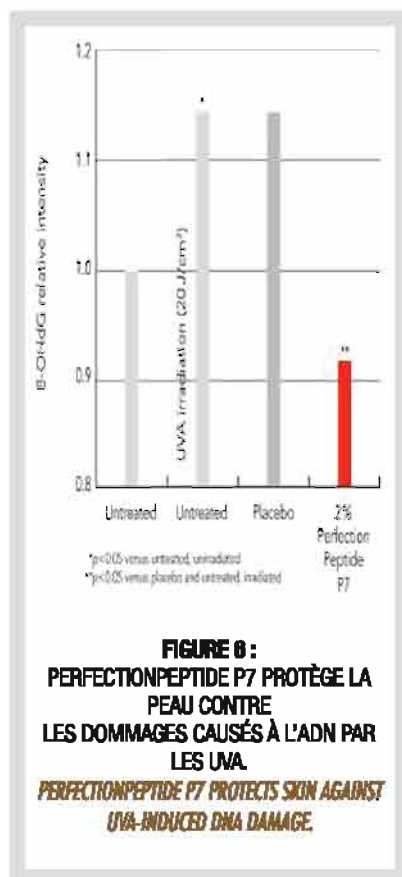
a été appliquée sur l'autre avant-bras. Deux heures après la dernière application du produit, les sites d'essai ont été irradiés avec 20 J/cm² d'UVA. Immédiatement après l'irradiation, des biopsies issues de bulle de succion ont été générées afin de procéder à une analyse immunohistochimique, dans l'épiderme, de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), un marqueur des dommages causés à l'ADN. Contrairement aux UVB qui endommagent les composants cellulaires par interaction directe, le stress induit par les UVA est principalement une conséquence de la formation d'ERO. Ces derniers peuvent provoquer l'oxydation des bases de l'ADN. Par rapport au

placebo, le traitement avec PerfectionPeptide P7 a significativement réduit la formation de 8-OHdG induite par les UVA (Figure 6). Ce résultat montre clairement l'efficacité *in vivo* de l'heptapeptide à protéger la peau contre les ROS, cet effet reposant sur une stimulation du système de défense cellulaire régulé par Nrf2.

Conclusion

La formation d'ERO qui endommagent notre peau est induite par les UV, les polluants ou naturellement, lors du métabolisme cellulaire normal. Afin de stimuler le système d'autoprotection cellulaire qui est régulé par le facteur de transcription Nrf2, un peptide biomimétique a été développé. Des essais réalisés sur explants de peau et des études cliniques ont montré que ce peptide stimulait les enzymes régulées par Nrf2 et protégeait la peau contre les dommages induits par les ERO générées par les UVA. Ainsi, PerfectionPeptide P7 peut être utilisé au quotidien, notamment dans les crèmes DD (Daily Defense), pour protéger la peau contre l'apparition prématurée des signes de vieillissement. ■

D. Schmid, E. Balar, F. Zilli et E. Mauger
MIBELLE GROUP BIOCHEMISTRY, SUISSE



regulated by the transcription factor Nrf2, a biomimetic peptide was developed.

In assays with skin explants and clinical studies, this peptide was found to stimulate Nrf2-regulated enzymes and to protect the skin against damages induced by ROS generated by UVA. Thus, PerfectionPeptide P7 can be applied daily to protect the skin against premature appearance of aging signs. PerfectionPeptide P7 fits perfectly with the emerging new trend of DD creams which stands for daily defense. ■

References

1. Nguyen T, Yang GS, Pickett CB The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress, *Free Radic Biol Med* 2004, 37, 433-41.
2. Schäfer M, Dütsch S, auf dem Keller U, Navid F, Schwarz A, Johnson DA, Johnson JA, Werner S Nrf2 establishes a glutathione-mediated gradient of UVB cytoprotection in the epidermis, *Genes & Development* 2010, 24, 1045-1058.
3. Chorley BN, Campbell MR, Wang X, Karaca M, Sambandan D, Bangura F, Xue P, Pi J, Kleeberger SR, Bell DA Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: Influence on retinoid X receptor alpha, *Nucleic Acids Research* 2012, 1-14.
4. Gludica A, Arra C, Turco MC Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents, *Methods Mol Biol* 2010, 647, 37-74.
5. Tong KI, Padmanabhan B, Kobayashi A, Shang C, Hirotsu Y, Yokoyama S, Yamamoto M. Different electrostatic potentials define ETGE and DLG motifs as hinge and latch in oxidative stress response, *Mol. Cell. Biol.* 2007, 27, 7511-21.

Notes :