

La modélisation moléculaire

pour développer des principes actifs cosmétiques innovants

Boris Vogelgesang, Isabelle Bonnet et Valérie André-Frei

Résumé Le marché de la cosmétique demande en permanence des principes actifs à la fois efficaces et innovants, plus encore lorsqu'il s'agit d'ingrédients amincissants. Il a été montré il y a quelques années que spermine et spermidine, deux polyamines naturelles, stimulent le stockage des graisses et inhibent leur élimination. Elles apparaissent donc comme des cibles de choix pour développer de nouveaux actifs amincissants. Mais comment les inactiver ? Grâce à la modélisation moléculaire, nous avons pu identifier un disaccharide, le sulfo-carrabiose, qui piège littéralement spermine et spermidine et les inactiver. En effet, cette étude de modélisation moléculaire a montré que le sulfo-carrabiose possède une structure spatiale complémentaire de celles de la spermine et de la spermidine et forme avec elles de nombreuses liaisons électrostatiques. Il a été confirmé *In tubo* que le sulfo-carrabiose bloquait réellement spermine et spermidine. De plus, ce piégeage amenait à une diminution significative de la lipogenèse et une augmentation significative de la lipolyse dans des adipocytes en culture. Par cet exemple, cet article montre comment la recherche scientifique est appliquée avec succès à la cosmétique.

Mots-clés Principes actifs cosmétiques, modélisation moléculaire, spermine, spermidine, sulfo-carrabiose, lipolyse, lipogenèse.

Abstract **Using molecular modeling to develop innovative cosmetic active ingredients**

The cosmetic market always asks for efficient and attractive active ingredients, and this is particularly true for slimming. A few years ago, it has been shown that spermine and spermidine, two naturally occurring polyamines, stimulate fat storage and inhibit fat breakdown. It thus appeared as a target of choice for developing new slimming ingredients. But how to inactivate them? Thanks to molecular modeling, we were able to identify a disaccharide, the sulfo-carrabiose, which can literally trap spermine and spermidine and inactivate them. Indeed, this molecular modeling study allowed to show that sulfo-carrabiose was highly complementary to spermidine and spermine regarding their spatial structure and could also create numerous electrostatic bonds. This result was confirmed *in tubo* showing that sulfo-carrabiose actually blocks spermine and spermidine. Moreover, this trapping leads to a significant reduction in lipogenesis and to a significant increase in lipolysis in cultured adipocytes. With this example, this article shows how scientific research is successfully applied to cosmetics.

Keywords Cosmetic active ingredients, molecular modeling, spermine, spermidine, sulfo-carrabiose, lipolysis, lipogenesis.

Créée à Lyon il y a une vingtaine d'années, BASF Beauty Care Solutions est une entreprise spécialisée dans le développement de principes actifs cosmétiques. La structure s'est fait connaître dans les années 80 grâce à une méthode unique d'extraction du collagène alors employée pour élaborer des produits cosmétiques et des pansements homéostatiques. Aujourd'hui, l'entreprise a abandonné son activité paramédicale pour se consacrer entièrement au soin de la peau. Elle compte désormais plus de 250 employés répartis sur deux sites, l'un à Lyon, l'autre à Long Island (États-Unis). Son expertise en ingénierie tissulaire, encapsulation et couplage moléculaire lui permet de proposer plus de 45 produits standards sans compter ceux qu'elle développe à l'occasion de demandes spécifiques de la part de clients tels que Dior, Estée Lauder, Chanel ou L'Oréal. Pour assurer un haut niveau d'innovation technique et scientifique, l'entreprise emploie 38 des 130 personnes du site de Lyon en recherche et développement. Elle collabore aussi régulièrement avec des équipes de recherche fondamentale comme ce fut le cas pour l'actif présenté ici ; l'équipe du professeur Haser de l'Institut de biologie et de chimie des protéines (IBCP) est venue apporter ses compétences pour

mettre en œuvre la méthode de screening et de développement telle qu'elle avait été imaginée. Car loin des idées reçues, l'industrie cosmétique se soucie bien plus qu'on ne pourrait le croire de la véracité scientifique du propos qu'elle diffuse...

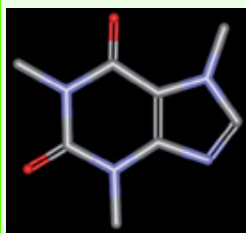
Et parmi les thématiques récurrentes de l'industrie cosmétique, il en est une qui revient invariablement avec les beaux jours : l'amincissement. Si par son efficacité inégalée, la caféine est incontestablement la molécule la plus répandue dans les gammes amincissantes (*encadré 1*), les acteurs du marché sont toujours à la recherche d'actifs innovants. Mais pas question de sacrifier l'efficacité au seul concept marketing.

Les voies principales du métabolisme lipidique n'ont plus de secret pour les biologistes. En revanche, les voies de régulation sont plus délicates à aborder. Dans l'exemple que nous allons détailler, le système de régulation avait été parfaitement identifié. Mais comment agir sur cette cible ? En allant chercher la réponse du côté des disciplines connexes, en l'occurrence la modélisation moléculaire.

Voici donc l'exemple du développement d'un produit où la rigueur scientifique s'est mise au service d'un secteur animé par le rêve.

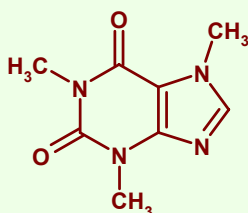
Encadré 1

La caféine au service de l'amincissement



La caféine, $C_8H_{10}N_4O_2$ (IUPAC : 1,3,7-triméthyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione), est un alcaloïde de la famille des méthylxanthines que l'on retrouve évidemment dans le café mais également dans le thé, le maté, le guarana ou le cacao. Connue pour son action stimulante du système nerveux central, elle est aussi très employée en cosmétique pour

l'action amincissante qu'elle exerce selon le mode suivant : l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est un messager intracellulaire qui stimule la voie de la lipolyse (enchaînement de réactions aboutissant à l'hydrolyse des triglycérides de stockage). L'action de l'AMPc est régulée par la phosphodiesterase (PDE), une enzyme qui l'inactive en hydrolysant la liaison phosphodiester existant entre le groupement phosphate et l'adénosine. Inhibiteur compétitif de la PDE, la caféine permet de maintenir un taux intracellulaire d'AMPc suffisant pour stimuler la voie de la lipolyse et permettre aux adipocytes d'éliminer plus de graisses.



Matière première (nom INCI)	%
Aqua (water)	68,12
Alcohol denat	25,00
Caffeine	3,00
Sulfo-carrabiose solution	3,00
Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,60
Tromethamine	0,28

Exemple de formulation cosmétique contenant de la caféine.

Contexte physiologique

La cible des produits cosmétiques amincissants est le tissu adipeux blanc sous-cutané. Également appelé hypoderme, ce tissu représente 15 à 20 % de la masse corporelle et constitue la plus grande réserve énergétique de notre corps. Les cellules qui le composent sont appelées adipocytes. Hautement spécialisées dans le stockage des graisses sous forme de triglycérides (figure 1), elles se caractérisent par la présence de vacuoles lipidiques qui occupent 95 % de leur volume. Le métabolisme des adipocytes marche à double sens : d'une part ils peuvent synthétiser des triglycérides (phénomène appelé lipogenèse), et d'autre part ils peuvent les hydrolyser pour libérer l'énergie (c'est la lipolyse).



Figure 1 - Formule générale des triglycérides.

Plus justement appelés triacylglycérols, les triglycérides sont des lipides composés d'un glycérol sur lequel sont estérifiés trois acides gras de nature variable.

Mais rentrons un peu plus dans le détail du métabolisme lipidique. Les adipocytes absorbent le sucre et les graisses sous forme de glucose et d'acide gras à partir desquels ils synthétisent les triglycérides. Le glucose est acheminé vers l'intérieur de la cellule à travers des protéines de transport spécialisées (appelées GLUT 1 à 4 pour « *GLU*ucose *T*ransporter ») puis converti en glycérol-3-phosphate. Les lipides contenus dans le plasma circulent également sous forme de triglycérides trop gros pour passer directement de la circulation sanguine à l'intérieur des adipocytes. Leur passage est rendu possible grâce à la lipoprotéine lipase (LPL), une enzyme qui hydrolyse les triglycérides en monoglycéride et acides gras, molécules plus petites facilement transportées vers le cytoplasme des adipocytes. Une fois ces éléments de base (glycérol-3-phosphate et acides gras) disponibles à l'intérieur de la cellule, les adipocytes reforment les triglycérides qu'ils mettent en réserve dans leur vacuole.

La synthèse de triglycéride, ou triacylglycérol, se déroule en quatre étapes (figure 2) : un premier acide est estérifié sur le glycérol-3-phosphate grâce à la GPAT (sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase) pour former un lysophosphatidate (LPA) (figure 2a). Un second acide gras est ensuite estérifié sur le LPA par la LPAAT (lysophosphatidate acyltransférase) formant ainsi un phosphatidate (PA) (figure 2b). Le phosphatidate est déphosphorylé par la MGPPH (phosphatidate phosphohydrolase Mg^{2+} dépendante) pour former un diglycéride (DG) et permettre l'estérification d'un troisième acide gras (Figure 2c). Un troisième acide gras est enfin greffé sur le DG par la DGAT (1,2-diglycéride acyltransférase) aboutissant ainsi à la formation d'un triglycéride (TG) (figure 2d).

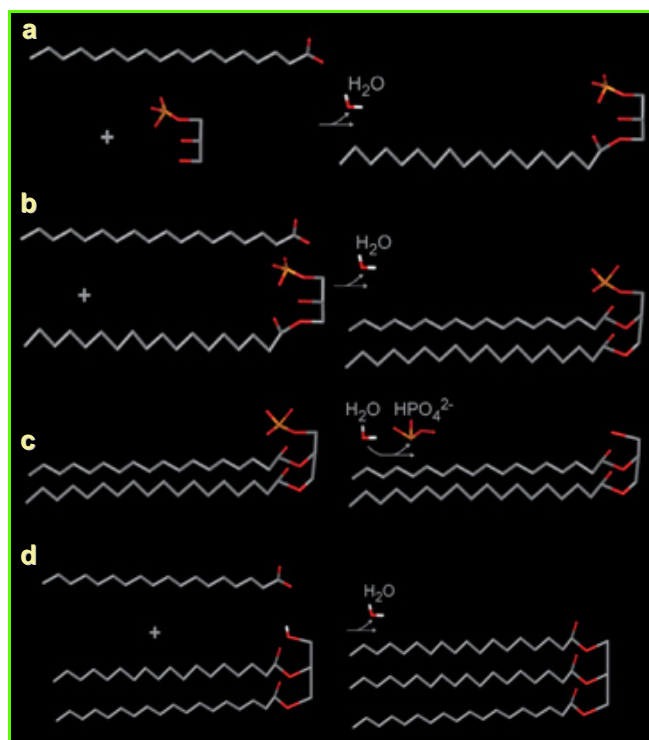


Figure 2 - Synthèse de triacylglycérol :

(a) Estérification d'un acide gras sur le glycérol-3-phosphate par la sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT).
 (b) Estérification d'un acide gras sur le lysophosphatidate par la lysophosphatidate acyltransférase (LPAAT).
 (c) Déphosphorylation du phosphatidate par la phosphatidate phosphohydrolase Mg^{2+} dépendante (MGPPH).
 (d) Estérification d'un acide gras sur un diglycéride par la 1,2-diglycéride acyltransférase (DGAT).

Une nouvelle cible

En 1996, l'équipe de Subhash Jamdar à l'Université de Columbia (New York) découvre que les adipocytes de rats obèses contiennent une concentration intracellulaire en spermine et spermidine beaucoup plus élevée que dans les cellules d'animaux minces [1]. Auparavant, cette même équipe était parvenue à démontrer que ces deux molécules augmentaient considérablement l'activité de trois des quatre enzymes de synthèse des triglycérides [2-4]. D'autres auteurs avaient montré dans le même temps que spermine et spermidine stimulaient l'activité de la LPL et activaient la PDE, une enzyme qui permet de réduire la lipolyse [5-6] (figure 3).

Spermine et spermidine apparaissent donc comme des régulateurs importants du métabolisme lipidique. En les inactivant, on peut légitimement espérer limiter la lipogénèse et augmenter la lipolyse.

Mais comment s'y prendre pour inactiver cette nouvelle cible ? La synthèse physiologique de spermine et spermidine se fait à partir d'un acide aminé, l'arginine, et nécessite plusieurs étapes intermédiaires (figure 4). La spermidine est en plus le précurseur immédiat de la spermine. Difficile dans ces conditions d'aller ralentir la synthèse de ces polyamines.

Spermine et spermidine augmentent l'activité d'enzymes clés du métabolisme lipidique mais ne sont pas pour autant indispensables et ne possèdent pas non plus d'activité enzymatique propre. L'idée est donc venue de s'orienter vers une stratégie de développement innovante consistant à identifier par modélisation moléculaire un composé capable de piéger et d'inactiver spermine et spermidine.

La spermine se lie *in vivo* avec une forte affinité à l'héparane sulfate et à ses dérivés glycoprotéiques. L'héparane sulfate fait partie de ce que les biologistes appellent les glycosaminoglycanes (GAG), c'est-à-dire des polysaccharides de structure composés de la répétition d'unité disaccharidiques. Ils sont des composants essentiels de la matrice extracellulaire et y jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre dermique (voir encadré 2). Les recherches se sont dès lors focalisées sur des molécules de structure similaire à celle des GAG. Plusieurs disaccharides potentiellement capables de se lier à la spermine et à la spermidine ont donc été criblés virtuellement à l'aide du logiciel de modélisation moléculaire Turbo-FRODO. Et la méthode s'est avérée être particulièrement efficace...

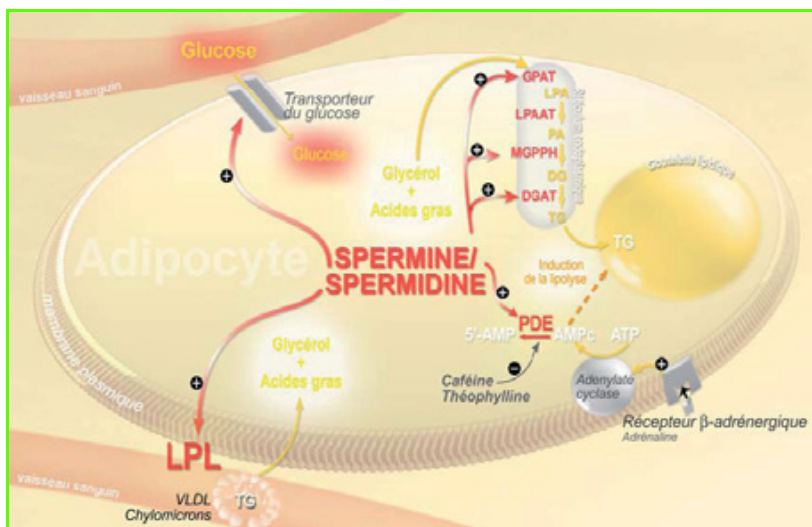


Figure 3 - Schéma des différentes cibles de spermine et spermidine. Le schéma fait apparaître les voies que modulent spermine et spermidine.

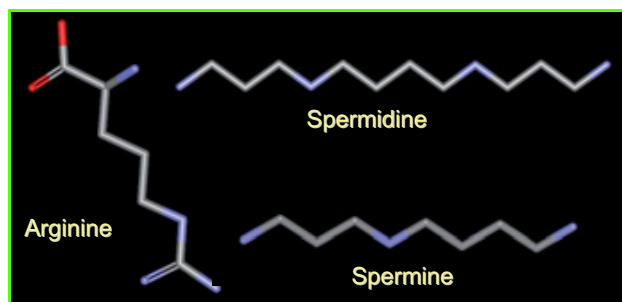
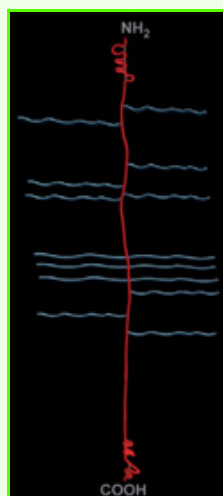


Figure 4 - Spermine et spermidine sont deux polyamines dérivées de l'arginine (acide aminé), c'est-à-dire deux molécules aliphatiques qui comportent plusieurs groupements amines le long de leur chaîne.

Encadré 2



Structure de base d'une glycoprotéine.

La **matrice extracellulaire** est l'environnement dans lequel baignent en quelque sorte des cellules des tissus conjonctifs (fibroblastes du cartilage, des tendons, du derme notamment). On y trouve principalement des protéines fibreuses responsables de la résistance et de l'élasticité (collagène, élastine) au milieu d'une substance dite fondamentale composée d'eau, de sels, de glycoprotéines et de glycosaminoglycanes. Les **glycosaminoglycanes (GAG)**, au nombre de 6 (héparane sulfate, héparine, dermatane sulfate, kératane sulfate, chondroïtine sulfate, acide hyaluronique), sont des polysaccharides de la matrice extracellulaire formés par la répétition de *n* unités disaccharidiques. Chaque disaccharide de base résulte de l'assemblage hétérodimérique d'unités galactose, galactosamine, glucosamine, acide glucuronique ou acide iduronique. La nature de l'association donne son nom au GAG (l'héparane sulfate est par exemple constitué de dimères d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine alternativement reliés en α -1,4 et β -1,4).

Les **glycoprotéines** sont elles formées d'une protéine dite « core » ou « cœur » sur laquelle s'assemblent différents glycosaminoglycanes.

Modélisation moléculaire

FRODO (« Flow and Respiratory artifact Obliteration with Directed Orthogonal pulses ») est un logiciel qui a été développé à l'origine pour éliminer les artefacts des images obtenues par résonance magnétique nucléaire (« ghost artifacts »). La version avancée utilisée aujourd'hui dans de nombreux laboratoires de biologie structurale se nomme Turbo-Frodo. Ce programme permet de modéliser aussi bien les petites que les grosses molécules en intégrant les structures secondaires, la densité des nuages électroniques ou l'encombrement stérique des molécules. Il permet également de modifier artificiellement leur structure (en ajoutant ou en retirant un atome par exemple) et d'anticiper les changements conformationnels qui en découlent. Turbo-FRODO est ainsi souvent cité dans les études portant sur les relations structure/activité des systèmes enzyme/substrat ou ligand/récepteur.

Plusieurs disaccharides ont donc été modélisés dans un environnement se rapprochant le plus

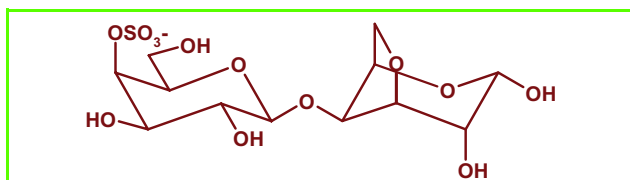


Figure 5 - Les sulfo-carrabioses sont des disaccharides de formule galactopyranose-4-sulfate $\beta(1 \rightarrow 4)$ 3,6-anhydrogalactopyranose. Ils sont obtenus par hydrolyse acide de δ -carraghénanes, des polysaccharides extraits d'algues rouges.

possible des conditions physiologiques (milieu aqueux ; pH 7,4 ; 37 °C) et leur capacité d'interaction avec la spermidine a été évaluée. À l'issue du criblage virtuel, le sulfo-carrabiose est ressorti comme la molécule ayant le plus haut potentiel à se complexer avec la spermidine (figure 5).

En effet, par leurs complémentarités de structure et de charges, les molécules de sulfo-carrabiose et de spermidine s'imbriquent idéalement l'une dans l'autre (figure 6). Comme on peut le voir sur la figure 7, quatre liaisons hydrogène peuvent se former entre les groupements aminés de la spermidine et les groupements oxygénés du sulfo-carrabiose. Dans ces proportions, les molécules sont certes bien agrégées mais les groupements protonés de la spermidine sont encore largement disponibles pour d'autres interactions.

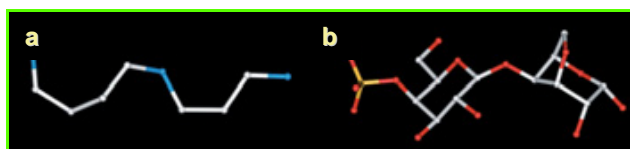


Figure 6 - Modélisation d'une molécule de spermidine (a) et d'une molécule de sulfo-carrabiose (b). Bleu : azote ; rouge : oxygène ; jaune : soufre ; blanc : carbone.

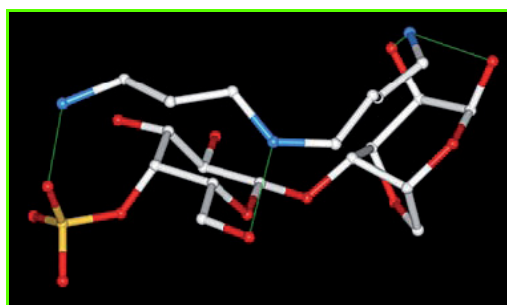


Figure 7 - Modélisation de l'interaction entre une molécule de spermidine et une molécule de sulfo-carrabiose. Les liaisons hydrogène, au nombre de 4, sont représentées par les lignes vertes.

En revanche, lorsque trois molécules de sulfo-carrabiose sont mises en présence d'une molécule de spermidine, neuf liaisons hydrogène se forment (figure 8a). La spermidine est alors littéralement piégée au cœur des trois sulfo-carrabioses et en tenant compte de l'encombrement stérique des molécules, elle n'est plus disponible pour d'autres interactions électrostatiques (figure 8b).

Dans les conditions de cette modélisation, l'environnement physiologique exact n'a pas pu être recréé à l'identique. Et même si les résultats de la modélisation moléculaire sont fiables et très encourageants, il est tout de même nécessaire de démontrer l'efficacité de ce piège sur le métabolisme lipidique.

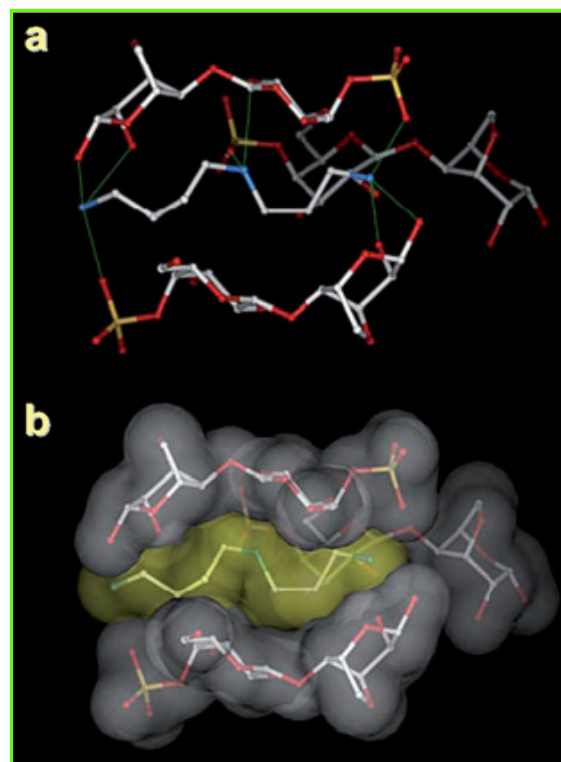


Figure 8 - Modélisation de l'interaction entre une molécule de spermidine et trois molécules de sulfo-carrabiose.

(a) Neuf liaisons hydrogène s'établissent au sein du complexe (en vert) ; (b) En tenant compte de l'encombrement stérique des molécules, la spermidine est alors logée au cœur du complexe et rendue inaccessible.

Une efficacité démontrée

L'équipe de Tabor a décrit une méthode *in tubo* permettant de visualiser l'interaction entre spermine et ADN. En effet, l'ADN, chargé très négativement, et la spermine, chargée très positivement, interagissent fortement. La complexation ADN/spermine entraîne la précipitation de l'ADN en solution et par conséquent une augmentation de la densité optique (DO). Si les sulfo-carrabioses piègent effectivement la spermine et la spermidine, leur présence doit empêcher l'interaction ADN/spermine ou ADN/spermidine, et donc empêcher la précipitation de l'ADN et l'augmentation de DO. Une solution d'ADN a donc été mise en présence à la fois d'une solution de sulfo-carrabiose et alternativement de spermine ou de spermidine.

Les résultats montrent que pour des concentrations croissantes de sulfo-carrabioses, la densité optique diminue, ce qui se traduit sur le graphique par une augmentation du pourcentage de complexation spermine/sulfo-carrabioses ou spermidine/sulfo-carrabioses (figure 9). Cette expérience a donc permis de confirmer les résultats obtenus précédemment en modélisation moléculaire et de mettre en évidence la réalité des interactions entre spermine/spermidine et sulfo-carrabiose.

Il ne reste plus alors qu'à montrer que, comme attendu, en piégeant spermine et spermidine, le stockage des lipides est atténué et le métabolisme adipocytaire se tourne plutôt vers une élimination des triglycérides que vers une accumulation.

Le test classiquement réalisé pour mesurer un effet sur le métabolisme adipocytaire consiste à évaluer le niveau de lipogenèse et de lipolyse sur des adipocytes en culture en

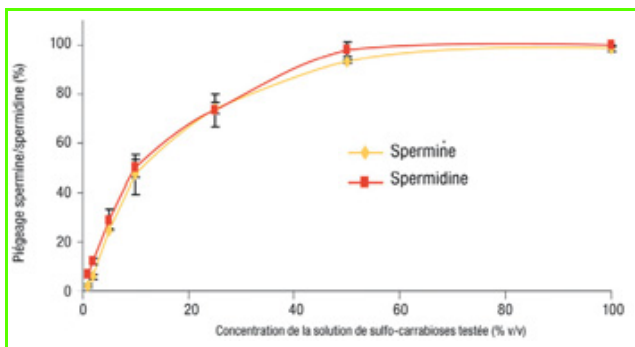


Figure 9 - Courbe du piégeage de la spermine ou de la spermidine par les sulfo-carrabioses.

mesurant respectivement l'incorporation d'acétate radioactif (figure 10) et la quantité d'acides gras libres relargués par la cellule dans le milieu de culture.

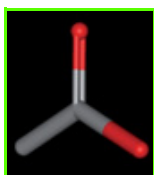


Figure 10 - L'acétate est métabolisé dans la cellule en acide gras puis utilisé pour la formation de triglycérides. L'incorporation d'acétate est donc directement reliée au niveau de lipogénèse.

Les résultats obtenus (figure 11) montrent qu'incubés en présence de la solution de sulfo-carrabiose, les adipocytes en culture voient leur lipolyse augmentée de + 87 % et leur lipogénèse diminuée de - 79 %. La boucle est bouclée : cette expérience montre qu'en allant piéger spermine et spermidine dans les adipocytes, il est possible de réguler le métabolisme lipidique et de l'orienter vers une diminution globale du stockage plutôt qu'une accumulation.

Conclusion

Nouveauté et efficacité sont les maîtres mots en cosmétique et plus particulièrement en matière d'amincissants. Côté efficacité, la caféine est reine mais le discours qui l'accompagne commence à s'essouffler. Pour ce qui est de la nouveauté, les actifs ne manquent pas mais rares sont ceux qui sont parvenus à s'imposer, souvent par manque d'efficacité. C'est pourquoi il est parfois utile de prendre du recul et d'aller chercher dans une approche pluridisciplinaire les compétences complémentaires qui seront peut-être la clef de la réussite.

Ici, la modélisation moléculaire a permis de faire l'articulation entre une cible originale parfaitement identifiée, un mode d'action précisément défini et l'identification du composé potentiellement le plus efficace. La démarche aurait pu paraître trop ambitieuse ou le résultat incertain mais l'efficacité est bien au rendez-vous. En effet, les résultats obtenus au cours d'une étude clinique réalisée en double aveugle ont montré *in vivo* que l'effet amincissant des sulfo-carrabioses était bien supérieur à celui de la caféine. Le succès de ce genre d'étude ouvre ainsi la voie à de nouvelles pistes de développement et atteste de l'utilité d'aller chercher les solutions dans les disciplines parallèles.

Références

[1] Jamdar S.C., Cao F.W., Samaniego E., Relationship between adipose polyamine concentrations and triacylglycerol synthetic enzymes in lean and obese Zucker rats, *Enzyme and Protein*, **1996**, 49, p. 222.

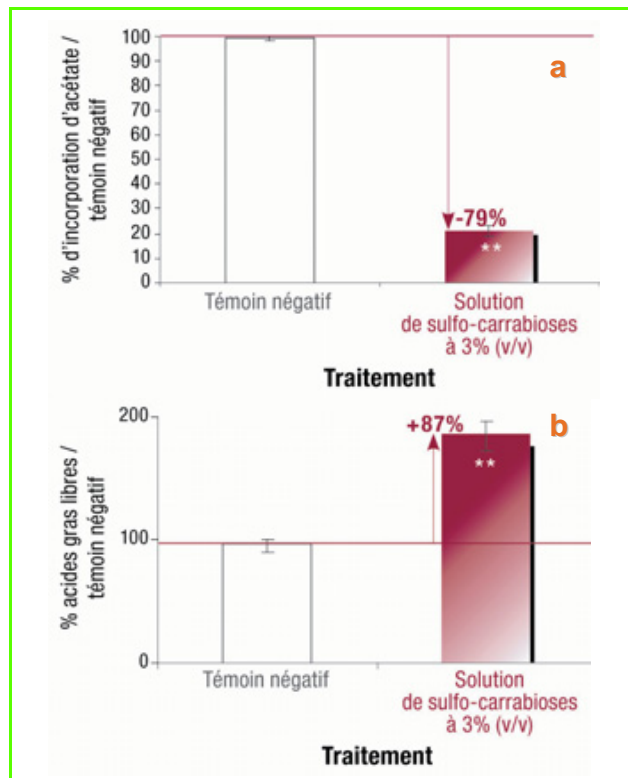


Figure 11 - Effet des sulfo-carrabioses sur le métabolisme lipidique d'adipocytes en culture.

(a) Mesure de la lipogénèse par dosage de l'incorporation d'acétate radioactif ; (b) Mesure de la lipolyse par dosage des acides gras libres relargués dans le milieu de culture (** : statistiquement différent du témoin non traité, p < 0,01).

[2] Jamdar S.C., Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue: effects of polyamines on triglyceride synthesis, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1977**, 182, p. 723.
 [3] Jamdar S.C., Osborne L., Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue: effects of polyamines on Mg²⁺ dependent phosphatidate phosphohydrolase, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1983**, 752, p. 79.
 [4] Jamdar S.C., Osborne L., Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue: activation of diglyceride acyltransferase by spermine, *Enzyme*, **1982**, 28, p. 387.
 [5] Giudicelli Y., Rebourcet M.C., Nordmann R., Nordmann J., Insulin-like effect of some polyamines on lipoprotein lipase from rat adipose tissue, *Febs Letters*, **1976**, 62(1), p. 74-76.
 [6] Richelsen B., Pedersen S.B., Hougaard D.M., Characterization of antilipolytic action of polyamines in isolated rat adipocytes, *Biochemical Journal*, **1989**, 261, p. 661.



B. Vogelgesang



I. Bonnet



V. A.-Frei

Boris Vogelgesang est rédacteur scientifique, **Isabelle Bonnet** est R&D Manager et **Valérie André-Frei** est R&D Site Group Manager chez BASF Beauty Care Solutions France*.

* BASF Beauty Care Solutions France SAS, 32 rue Saint-Jean de Dieu, 69007 Lyon.
 Courriel : boris.vogelgesang@basf.com