Clinical Interventions in Aging

Dovepress

Article du texte entier en libre accès

Libre accès à la recherche scientifique et médicale

Recherche originale

Moduler la voie de la testostérone : une nouvelle stratégie pour lutter contre le vieillissement de la peau masculine ?

Philippe Bernard[1]
Thomas Scior[2]
Quoc Tuan Do[1]

[1]Greenpharma SAS, Orléans, France;
[2]Pharmacy Department, Benemerita Universidad Autonoma de Puebla, Puebla, Mexico

Cet article a été publié dans le journal Dove Press suivant :
Clinical Interventions in Aging
12 septembre 2012

Résumé : Chez l'homme, le niveau de testostérone diminue avec l'âge. Au niveau de la peau, il s'ensuit une diminution de la densité et une moindre élasticité. Identifier des composés capables d'augmenter le taux de testostérone semble être une stratégie intéressante pour développer de nouveaux principes bioactifs anti-âge pour les hommes. La « pharmacognosie inverse » a été appliquée avec succès pour identifier de nouveaux composés naturels capables de moduler les taux de testostérone. Parmi plusieurs résultats *in silico* prometteurs, le Phyto-androzyme a été retenu comme candidat car il possède le plus grand potentiel pour devenir un principe actif. Ce résultat a ensuite été validé *in vitro* sur l'aromatase et sur la 5-alpha-réductase de types 1 et 2, qui sont deux types d'enzymes impliquées dans la dégradation de la testostérone libre. En effet, le Phyto-androzyme a été identifié comme un inhibiteur de l'aromatase, avec une concentration inhibitrice 50 (CI_{50}) de l'ordre de 50 µM. En outre, il a été prouvé que le Phyto-androzyme est un inhibiteur de la 5-alpha-réductase de type 1, avec une CI_{50} d'environ 75 µM. Prises ensemble, ces données indiquent que le Phyto-androzyme module les taux de testostérone et que sa structure a le potentiel pour servir de guide pour les conceptions futures des inhibiteurs hautement sélectifs de la 5-alpha-réductase de type 1.

Mots clefs : pharmacognosie inverse, Phyto-androzyme, testostérone, cosmétiques pour hommes, dermopharmacie

Introduction

La testostérone joue un rôle clé dans le développement des tissus reproducteurs masculins comme les testicules et la prostate, et améliore également les caractéristiques sexuelles secondaires telles que l'augmentation de la masse musculaire et osseuse et la croissance des poils. En outre, la testostérone est essentielle pour la santé et le bien-être d'un individu, de même qu'elle prévient l'ostéoporose. Une diminution progressive de la production d'androgènes comme la testostérone est fréquente chez les hommes vieillissants et fait l'objet de nombreuses publications.[1-3] Le tableau clinique du syndrome de l'andropause se caractérise par une diminution du désir sexuel et de la capacité érectile, une fatigue accrue, une dépression, des altérations cutanées ainsi que par une diminution de l'activité intellectuelle, de la masse maigre, des poils et de la densité minérale osseuse qui entraîne l'ostéoporose. Il est également associé à une augmentation de la graisse viscérale et peut conduire à l'obésité.[4,5]

Le catabolisme de la testostérone

A l'âge de 30 ans, les testicules des hommes produisent 95% d'hormones androgènes, en particulier de la testostérone (environ 10 mg par jour). Environ 98 % de toute la testostérone en mouvement est inactivée par fixation aux protéines plasmatiques, tandis que les 2% restant (appelés testostérone libre) sont responsables de toutes les activités physiologiques de l'hormone. La moitié du taux de protéines fixées au plasma sanguin est

étroitement associée à la globuline se liant aux hormones sexuelles (SHBG), tandis que l'autre moitié n'est que faiblement liée à l'albumine. Cette testostérone liée à l'albumine devient une partie de la testostérone libre.[6]

Quand les hommes vieillissent, leurs taux d'œstrogène augmentent entraînant une élévation de la SHBG et par la suite une réduction globale de la testostérone libre. Après 40 ans, la capacité de la SHBG à se lier à la testostérone augmente d'environ 40 %, ce qui provoque une diminution de la libido associée aux symptômes du vieillissement et de l'andropause.[7] Les contrôleurs essentiels de la régulation de l'androgène reposent sur deux enzymes de conversion : (1) soit les isoenzymes de la 5α-réductase 1 et 2 convertissent la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), soit (2) la testostérone est convertie dans une moindre mesure en œstradiol 17β par l'aromatase CYP-19, une voie métabolique découverte chez les deux sexes.[8] En inhibant l'activité de la protéine mentionnée ci-dessus, on pourrait donc ajuster le taux de testostérone libre. La voie métabolique modulant le niveau de testostérone libre dans le plasma sanguin est notamment sa biotransformation par les enzymes de la 5α-réductase qui convertissent la testostérone en DHT. Selon de nombreux auteurs, la DHT est responsable de l'hypertrophie de la prostate,[9] et également de la perte de cheveux du cuir chevelu héréditaire et androgéno-dépendante (aussi connue comme l'alopécie androgénétique).[10,11]

Des problèmes de peau d'ordre cosmétique surviennent avec la sébogénèse ou l'acné, qui est causée par une combinaison d'agents endocriniens et bactériens qui conduit à une inflammation cutanée. Ses composants androgéniques sont des hormones mâles (la testostérone et la dihydrotestostérone), en plus des bactéries spécifiques de l'acné.[12,13] L'inhibition de l'activité des enzymes mentionnées ci-dessus devraient permettre non seulement l'augmentation des taux de testostérone libre, mais également la réduction des effets secondaires dus à son métabolite, la DHT. La partie de la testostérone, qui n'a pas été convertie en DHT, est à présent transformée en œstradiol, un métabolite œstrogénique actif en présence d'aromatase CYP-19 (aussi appelée œstrogène synthétase).[8] Il fait partie de la famille des cytochromes P450 qui contrôle le taux d'œstrogènes et la transformation de l'androgène, de l'androstènedione et de la testostérone en œstrogènes. Chez les hommes, un taux élevé d'œstrogènes peut entraîner des problèmes de santé graves principalement en raison de ses effets féminisant (par exemple, la gynécomastie). L'inhibition de l'aromatase CYP-19 pourrait réduire la bioconversion de la testostérone en œstradiol, et par conséquent il peut également réduire les risques associés à un taux élevé d'œstrogènes, en particulier au cours de l'andropause.[14]

La testostérone et la peau

Avec l'âge, une diminution des taux hormonaux au niveau de la peau module l'hydratation de l'épiderme, l'élasticité et l'épaisseur de la peau. Il a été démontré que l'hormonothérapie substitutive est en mesure d'améliorer ces paramètres du vieillissement de la peau chez les hommes.[15]

Dans le domaine de la technologie pharmaceutique, plusieurs modes d'administration ont été développés pour fournir la testostérone exogène. Cette stratégie est difficilement envisageable pour les applications cosmétiques et présente des effets secondaires inacceptables comme l'irritation et la dermatite de contact.[16] En outre, une augmentation des concentrations de testostérone ferait également augmenter les taux de DHT, dont la responsabilité est impliquée dans la perte de cheveux ou alopécie androgénique.[17] Pour ces raisons, l'utilisation de la testostérone pour des applications topiques, en particulier dans les cosmétiques, semble tout à fait limitée. Une alternative serait la découverte d'un produit naturel capable d'augmenter les taux de testostérone seulement chez les hommes plus âgés.

De nos jours, l'alopécie androgénétique (AGA) peut être traitée soit par l'administration orale d'un inhibiteur sélectif de la 5α-réductase, la finastéride, ou par application topique de minoxidil, autrement dit un ouvreur des canaux potassiques sensible à l'adénosine triphosphate.[18] Une étape-clé est la fixation de la DHT au récepteur d'androgène (RA). La fonction de la cellule folliculaire dépend de divers facteurs moléculaires : (1) le niveau de DHT ; (2) la présence de RA actifs ; (3) la biotransformation de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et d'autres androgènes faibles aux androgènes plus puissants comme la testostérone ou DHT par la 5α-réductase ; (4) la faible activité enzymatique des enzymes responsables de l'inactivation des androgènes.[19] D'un point de vue général, l'AGA semble être affectée par des modifications pathologiques locales du métabolisme des androgènes dans les tissus cutanés. Même dans des conditions physiologiques, on observe certaines différences dans la sensibilité aux androgènes dans les follicules pileux provenant de différents sites de la surface de la peau et

celles-ci varient en fonction de la pilosité de ces sites. Le bon déroulement des étapes métaboliques implique une augmentation de l'expression de la 5α–réductase de type 2, tandis que le RA, lié au coactivateur Hic-5/ARA55, peut réguler à la hausse la sensibilité des cellules de la papille dermique aux androgènes dans l'AGA. Des médiateurs pathogènes ont précédemment été identifiés, tels que le facteur de croissance tumorale inductible par les androgènes-β1 (TGF-β1), le TGF-β2, le DKK-1, qui sont des suppresseurs de prolifération des cellules folliculaires épithéliales induits par les androgènes.[17-20]

Phyto-androzyme

Le Phyto-androzyme (Illustration 1), ou 2-(4-hydroxy-3-prop-2-ényl-phényl)-4-prop-2-ényl-phénol, est un constituant moléculaire de *Magnolia officinalis* Rehder & Wilson ou *Magnolia grandiflora* L., une plante médicinale chinoise. Elle est connue pour ses propriétés pharmacologiques anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-arythmiques, antioxydantes, de dépresseur du système nerveux central, de relaxant musculaire et d'anxiolytique.[21-23] Au cours des dernières décennies, un grand nombre d'études ont suggéré que le Phyto-androzyme possède des propriétés anticancéreuses avec des implications potentielles dans le traitement de cancer.[24-28]

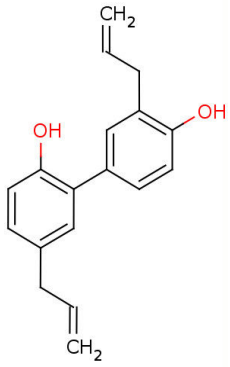


Illustration 1 Structure du Phyto-androzyme, un composé hydroxybiphényle

Pharmacognosie inverse

La pharmacognosie est l'étude de la pharmacochimie de matières premières naturelles à des fins pharmaceutiques, diététiques et cosmétiques, mais elle ne concerne pas exclusivement des matériaux naturels extraits des plantes.[29] La recherche dans ce domaine peut aboutir à la découverte de molécules bioactives après extraction, purification, caractérisation et par des tests biologiques.

Dans certaines publications antérieures, nous avons déjà présenté et exploré l'utilité d'un nouveau concept appelé "pharmacognosie inverse" (RPn).[30] Ce concept est similaire à la "pharmacologie inverse"[31], car des petites molécules sont utilisées comme marqueurs pour évaluer leurs effets sur un système biologique, mais il diffère de la pharmacologie inverse par son objectif final. La RPn vise à trouver des applications pour les substances d'origine biologique et leurs sources (essentiellement des plantes). En outre, la RPn identifie de nouvelles cibles biomoléculaires ou de nouvelles voies biologiques. Elle associe des outils chémoinformatiques et des connaissances traditionnelles à la recherche de plantes avec de nouvelles applications. La première étape est une procédure de criblage par des méthodes *in silico* ou bien *in vitr*o, ou encore une combinaison des deux, pour identifier les propriétés botaniques, pharmaceutiques ou cosmétiques des biomolécules. Pendant la seconde étape, une requête dans la base de données relationnelles plantes-molécules révèle les plantes enregistrées contenant le composé recherché. Puisque la RPn est complémentaire de la pharmacognosie classique, elle nécessite deux ou trois outils spécifiques : un module de criblage virtuel comme Selnergy™ (Greenpharma, Orléans, France),[32] et/ou une plate-forme de criblage *in vitro* ainsi qu'une base de données qui fournit des liens croisés entre les plantes et les molécules.

Dans la présente étude, la RPn est employée pour trouver un nouveau modulateur des taux de testostérone pour développer une formule contre le vieillissement pour les cosmétiques masculins.

Matériels et méthodes

La base de données de Greenpharma (GPDB)

La GPDB a été développée pour exploiter les données botaniques en constante augmentation, les structures chimiques naturelles et les connaissances acquises à partir des tests biologiques avec des extraits végétaux ou des molécules isolées ou à partir de la littérature scientifique en général. En outre, elle inclut des données phytotaxonomiques telles que la famille, le genre et les espèces des organismes, leurs noms communs et leurs synonymes, et il fournit également des informations sur leurs applications dans les médecines traditionnelles (telles que les organes utilisés de ces organismes), ainsi que les groupes ethniques à partir desquels les données ont été collectées. La GPDB a démontré son utilité en accélérant la découverte des composés anti-inflammatoires.[33] Actuellement, la GPDB contient 150.000 entrées sur les molécules et 161.000 entrées sur les organismes vivants.

Dans le présent travail, nous nous concentrons sur cet ensemble de molécules naturelles comme une entrée pour le criblage de Selnergy sur nos cibles d'intérêt.

Criblage *in silico* avec Selnergy

Les structures tridimensionnelles des protéines ont été soit récupérées directement à partir des structures cristallines publiées dans la Protein Data Bank[34] (PDB ; voir http://www.rcsb.org/pdb) ou construites grâce à la modélisation par homologie.[35] Les structures cristallines de la SHBG et de l'aromatase ont été téléchargées à partir de la PDB (PDB : 1D2S[36] et 3EQM[37]). Cependant, dans le cas de la 5α-réductase 1, aucune structure cristalline n'était disponible et son modèle tridimensionnel (3D) a été généré grâce à la modélisation par homologie.[35] L'hypothèse retenue pour cette approche est que deux protéines avec des séquences d'acides aminés presque identiques et très phylogénétiquement apparentées (homologues) partageront des structures tridimensionnelles similaires. Par conséquent, le modèle de la 5α-réductase 1 a été construit en toute confiance sur la base de la structure cristalline de la 5β-réductase 1 (PDB : 3CAS[38]) grâce à une homologie de séquence de 40%, compte tenu d'un seuil d'homologie minimum de 25% à 30% communément admis, nécessaire pour une longueur de 80 à 100 résidus (longueur de domaine classique). La modélisation par homologie a été réalisée avec les modules Biopolymer et Composer du logiciel Sybyl 8,0 (Tripos International, St Louis, MO).[39] Un criblage virtuel[40] a été mené avec Selnergy.[32] Un candidat était "accepté" par le criblage virtuel s'il satisfaisait aux conditions suivantes : à partir d'un ensemble test de molécules composées de ligands possédant des activités sur la cible et d'autres qui étaient choisies au hasard, Selnergy classe ce candidat parmi les structures obtenant les meilleurs scores.

Une procédure de post-traitement non supervisée a été réalisée pour éliminer les solutions de docking tombant à l'extérieur du site actif : un critère d'ajustement spatial est pris en compte pour déterminer si un ligand s'est convenablement amarré dans la cavité de fixation. Cet objectif a été atteint en comparant les distances entre deux centroïdes : l'une définissant le site actif de la protéine étudiée et l'autre définissant le composé amarré. Chaque distance de centroïde à centroïde : ($d_{C\text{-}C}$) a servi de critère ajustement spatial. Toute position d'amarrage avec un $d_{C\text{-}C} > 4$ Å a été considérée comme étant «hors du site actif protéique », et la paire protéine / ligand a été écartée des analyses ultérieures. Comme Selnergy peut proposer plusieurs poses pour la même molécule, le mode de liaison avec le plus court $d_{C\text{-}C}$ a été choisi. Une macro a été écrite dans le langage de programmation de Sybyl et mise en œuvre pour automatiser cette procédure. La macro du langage de programmation de Sybyl est distribuée par Tripos.[39] Enfin, les processus automatisés de criblage et de docking s'achève quand un expert a inspecté les résultats afin d'écarter les faux-positifs[40] en se fondant sur son intuition et en comparant les similitudes de leurs modes de liaison du composé criblé avec le ligand co-cristallisé.

Essais biologiques : tests de l'activité de l'aromatase et de la 5α-réductase

L'objectif du bioessai était de déterminer *in vitro* l'activité des inhibiteurs putatifs – découverts par notre outil de criblage *in silico* Selnergy[32] – sur l'aromatase en utilisant des microsomes placentaires humains comme une source de l'enzyme, et avec de l'eau titrée agissant comme traceur.[41] Le létrozole, molécule mise sur le marché comme inhibiteur de l'aromatase, a servi de composé de référence.

En outre, dans la présente étude, l'activité *in vitro* du Phyto-androzyme comme inhibiteur des isoenzymes 5α-réductase de type 1 et de type 2 a été étudiée. Des cellules rénales embryonnaires humaines transfectées (HEK293), exprimant de manière stable les isoenzymes respectifs 1 ou 2 (HEK293-5α1 = HEK 1 ; HEK293-5α2 = HEK 2), ont été utilisées comme un système de tests de cellule complète.[42] Sur la base de la conversion enzymatique du substrat androstènedione marqué en ^{14}C, en produit de la 5α-réductase, la dihydroandrostènedione, l'activité inhibitrice a été mesurée par luminescence photostimulée et a été comparée à celles de la finastéride,[43,44] un inhibiteur bien connu de la 5α-réductase.

Essai sur l'aromatase : préparation de l'aromatase microsomale

La fraction microsomale a été préparée à partir de placenta humain récemment recueilli d'un accouchement à terme. Le tissu a été lavé dans une solution glacée de 0,15 M de KCl et débarrassé des membranes et des vaisseaux sanguins. Le tissu a été placé dans une solution de 0,25 M de saccharose (1,0 mL/g de tissu) et découpé en petits morceaux avec des ciseaux chirurgicaux. Le tissu a été homogénéisé dans un T25 Ultra-Turrax ® (IKA ® Works, Inc, Wilmington, NC) en utilisant vingt pulsions de 10 secondes à 20.000 tours par minute avec 50 secondes de périodes de refroidissement. Des portions (50 mL) de l'homogénat ont été soumises à un homogénéisateur Kinematica Polytron à ultrasons (Labotal Scientific Equipment, Ltd, Abu Gosh, Israel) en utilisant cinq pulsions de 15 secondes à la vitesse 5 avec 15 secondes de périodes de refroidissement. L'homogénat a été centrifugé à 20.000 g pendant 50 minutes (centrifugeuse Hitachi, Hitachi Koki Co., Ltd, Tokyo, Japan). Le surnageant clair a été centrifugé à 148.000 g pendant 65 minutes (Ultraspin ; LKB Instruments, Bromma, Sweden). Les culots ont été lavés dans un tampon phosphate (0,05 M, pH 7,4) en utilisant un homogénéisateur téflon. Les culots lavés ont été regroupés, dissous dans environ 50 mL de tampon phosphate, et lavés deux fois par centrifugation à 100.000 g pendant 60 minutes. Le culot final a été remis en suspension dans 45 mL de tampon phosphate, et des aliquotes de 100 µL ont été réalisées à partir d'une suspension sous agitation qui a été surgelée et conservée à -70 °C. Les teneurs en protéines ont été déterminées par la méthode de Lowry *et al*,[45] en utilisant un SpectraMax Plus384 (Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA) et de l'albumine de sérum bovin comme référence.

Essai sur l'aromatase : test d'inhibition de l'aromatase *in vitro*

Des incubations contenant [1β-^{3}H]-androstènedione (250 nM), un excès de NADPH (0,24 mM), 20 µg de protéines placentaires humaines et un tampon phosphate (0,05 M, pH 7,4) ont été réalisées à 37 °C. Le volume final du mélange d'incubation était de 1,0 mL. Des incubations témoins ont été réalisées sans inhibiteur et l'échantillon de contrôle a été déterminé dans un dispositif d'incubation sans enzyme. L'inhibiteur a été dissous dans du MeOH et dilué en série pour atteindre les trois concentrations tests de 100, 10 et 1 µM. Le létrozole a été testé à 10 nM.

La réaction a été démarrée par addition de protéine et arrêtée au bout de 20 minutes par addition de dichlorométhane (10 mL). A l'issue de l'extraction, les tubes ont été centrifugés à 2.000 g pendant 5 minutes dans une centrifugeuse de paillasse. A partir de là, on a retiré 0,5 mL de la phase aqueuse et on l'a placé dans un tube dans lequel on a ajouté 1,0 mL de suspension de charbon à 5% (Norit-activated ; Pharmaceuticals Norit, CA Amersfoort, Netherlands). Après avoir agité les tubes pendant au moins 15 minutes à température ambiante, ceux-ci ont été centrifugés à 2.500 g pendant 10 minutes. Deux aliquotes de 0,5 mL ont été prélevées, ajoutées dans des flacons à scintillation contenant 10 mL de fluide de scintillation (Quickszint 212; Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Germany) et mesurées dans un compteur à scintillation de liquide (1209 Rackbeta, LKB Wallac ; LKB Instruments). Les évaluations à partir des incubations témoins ne contenant pas d'enzyme ont été soustraites de chacune des mesures d'incubation.

Essai sur l'aromatase : analyse des données

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport aux témoins non traités. Les taux d'inhibition ont été calculés d'après les taux de conversion moyen avec inhibiteur (n = 2) et sans inhibiteur (n = 4).

Essai sur la 5α–réductase : culture cellulaire

Des cellules HEK 1 et HEK 2 ont été cultivées en milieu Eagle modifié de Dulbecco (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA) (pH 7,4) avec 10% de sérum fœtal de veau, de la pénicilline/streptomycine (100 U/mL et 100 µg/mL, respectivement), et 0,5 mg/mL de Généticine-418-sulfate. Les essais d'inhibition ont été réalisés avec des cellules HEK 1 et HEK 2 ensemencées à une densité de 0,25 × 106 cellules par 1,9 cm^2 et ont été incubées pendant 20 heures pour la fixation, le doublement et la différenciation sous atmosphère humide à 5% de CO_2 à 37 °C.

Essai sur la 5α–réductase : tests d'inhibition *in vitro*

Les composés témoins ont été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et dilués en série en milieu Eagle modifié de Dulbecco pour atteindre les trois concentrations d'essai finales de 100 µM, 10 µM, et 1 µM. Les mélanges d'incubation contenant 0,24 mM de NADPH et 50 nM [4-^{14}C]-androstènedione à un volume final de 500 µL ont été préincubés à 37 °C pendant 10 minutes. Le finastéride utilisé comme contrôle interne a également été dissous dans le DMSO et dilué à des concentrations d'essai de 100 nM et 800 nM. Les contrôles contenant seulement le solvant (1 % de DMSO) ont été traités de la même manière.

La réaction a été déclenchée par l'élimination du milieu de culture et l'ajout du mélange d'incubation préchauffé aux couches de cellules. Au bout de respectivement 30 minutes (HEK 1) ou 15 minutes (HEK 2), la réaction a été stoppée par l'élimination du surnageant. Pour l'extraction du produit et du substrat non transformé, 500 µL d'acétate d'éthyle ont été ajoutés à chaque échantillon. Après 10 minutes d'agitation, les échantillons ont été centrifugés pendant 5 minutes pour la séparation de phase et le surnageant a été transféré dans de nouveaux tubes. Après évaporation du solvant, les résidus secs ont été reconstitués dans 25 µL d'acétone.

Les éléments reconstitués ont été suivis sur une plaque de chromatographie sur couche mince (HPTLC) à haute performance (20 cm x 10 cm, Silicagel 60F254 avec zone de concentration). Les plaques HPTLC ont été passées deux fois dans une solution fraîchement préparée de dichlorométhane : éther diéthylique (8:2) comme solvant. Les plaques d'imagerie ont été exposées aux plaques HPTLC pendant 48 heures. Les plaques d'imagerie ont été numérisées à l'aide d'un écran radio-luminescent à mémoire, et les taches correspondant à [4-^{14}C]-androstènedione (A) et [4-^{14}C]-dihydroandrostènedione ont été intégrées à l'aide du logiciel correspondant.

Essai sur la 5α–réductase : analyse des données

Les résultats ont été affichés sous forme d'une photo d'unités de luminescence photostimulée avec une correction du fond d'image. Les taux de conversion ont été calculés selon la formule suivante :

$$\%\ conversion = \frac{PSL \cdot DHA \cdot}{PSL \cdot DHA + A \cdot} x100$$

Les taux d'inhibition, exprimés en pourcentage des valeurs d'inhibition par rapport aux témoins non traités, ont été calculés à partir des taux de conversion moyen à la fois avec inhibiteur (n = 2) et sans inhibiteur (n = 2).

Contrôle de qualité : acceptabilité des essais

Comme des contrôles de qualité, les inhibiteurs de témoins positifs ont été inclus dans la mise en place des essais. Les tests *in vitro* sont considérés comme acceptables s'ils satisfont aux critères suivant :

- Une inhibition de 50 % de l'aromatase par le létrozole à une concentration de 10 nM (concentration testée correspondant à la CI_{50} de létrozole) ;
- Une inhibition de 50 % de la 5α-réductase de type 1 par le finastéride à une concentration de 800 nM (concentration testée correspondant à la CI_{50} de finastéride) ;
- Une inhibition de 50 % de la 5α-réductase de type 2 par le finastéride à une concentration de 100 nM (concentration testée correspondant à la CI_{50} de finastéride).

Essai clinique : étude des tests épicutanés

Avant l'étude des tests épicutanés, le Phyto-androzyme 1% et 5% a été évalué pour son potentiel irritant sur la membrane chorio-allantoïde des œufs de poule et pour son potentiel de mutagénicité sur le test d'Ames selon l'OCDE471. Ce test évalue la tolérance cutanée aiguë de la matière première et a été conçu et évalué par Dermscan (Villeurbanne Cedex, France). Une formule de crème de base a été utilisée comprenant 1 % et 5 % de Phyto-androzyme. L'étude a été réalisée durant 48 heures en utilisant une méthode occlusive sur 20 volontaires ayant une peau normale.

Essai clinique : évaluation du produit

L'étude comparative avec répartition aléatoire en double aveugle a été réalisée en deux groupes parallèles : un groupe a testé la préparation placebo (crème sans principe actif), et l'autre groupe a testé le produit *verum* à 1 % (soit un placebo + 1 % de Phyto-androzyme). Le protocole de l'étude a été réalisé par Dermscan. L'étude a été conduite d'octobre à décembre. Les objectifs étaient d'évaluer les effets anti-âge et redensifiants des produits testés.

Volontaires

L'étude a porté sur 40 hommes de race blanche en bonne santé, âgés de 55 à 63 ans (moyenne : 60 ans ± 1). Les principaux critères d'inclusion étaient les rides, les pattes-d'oie autour des yeux et la peau lâche sur le visage.

Protocole d'étude

Tous les volontaires ont été divisés en deux groupes exactement. Le groupe *verum* a reçu une préparation de crème contenant 1 % de Phyto-androzyme tandis que le groupe placebo a reçu la même formulation sans principe actif (Phyto-androzyme). Des applications sur le visage (sur les pattes-d'oie autour des yeux) ont été faites deux fois par jour pendant 2 mois. Les données cinétiques ont été évaluées à trois points de prélèvement : jours 0, jour 28 et jour 56. Nos critères d'évaluation ont été les suivants :

- Analyse des empreintes cutanées avec l'analyseur d'image de la peau ;
- Densité du derme par Dermscan ;
- Macrophotographies des pattes-d'oie (pour 10 volontaires dans chaque groupe).

Etude statistique

Pour l'analyse statistique, Microsoft Excel 2000 version 9.0 (Microsoft, Redmond, WA) a été utilisé. La méthode statistique employée était le test-*t* de Student pour séries appariées.

Résultats

Modélisation moléculaire : résultats du criblage virtuel de Selnergy

Le niveau de testostérone est contrôlé par de nombreuses enzymes, des récepteurs et des protéines de transport. Après avoir consulté les voies métaboliques sous-jacentes pour la testostérone dans la base de données des gènes et génomes de l'Encyclopédie de Kyoto (Kanehisa Laboratories, Kyoto, Japan),[46] nous avons inspecté trois enzymes pour leurs propriétés biologiques pertinentes. Le rationnel pour sélectionner les structures des cibles en termes de modélisation moléculaire est la suivante :

- La protéine doit occuper une position-clé dans le système de régulation du maintien des taux de testostérone ;

- L'inhibition de la protéine reflète les propriétés biologiques désirées, car il est généralement plus facile de trouver des inhibiteurs d'enzymes ou de récepteurs que des activateurs exogènes ;
- Il existe suffisamment de données structurelles pour réaliser des études de criblage virtuel.

Nous avons découvert que l'aromatase ou le cytochrome P450 19A1[47], la 5α-réductase de type 1[48] et la SHBG[49] méritaient un examen plus approfondi.

Des modèles tridimensionnels de protéines ont été générés pour leur utilisation ultérieure comme structures des cibles dans les calculs *in silico* avec Selnergy. Notre logiciel permet le criblage virtuel simultané sur les trois cibles afin de détecter la sélectivité présumée et/ou la synergie. Environ 150.000 composés naturels ont été filtrés dans la base de données GPDB. Chacune des 150.000 molécules a été évaluée par Selnergy en fonction de ses énergies d'interaction calculées avec chacune des trois cibles. La tranche supérieure de 1 % de toutes les poses de docking, en termes d'énergie de liaison estimée, a été post-traitée suivant la procédure mentionnée ci-dessus pour ne retenir que les molécules convenablement « dockées ». Le tableau 1 énumère les composés sélectionnés après l'inspection finale. Trois composés ont été jugés comme étant les plus prometteurs. Les problèmes de toxicité, l'approvisionnement et les questions de propriété intellectuelle ont été documentés et évalués pour les trois molécules. Deux molécules ont été d'ores et déjà écartées, ne laissant qu'une seule molécule comme le meilleur candidat : le Phyto-androzyme. C'est la seule molécule qui présente une activité putative sur toutes les cibles choisies, et donc elle s'est classée comme la meilleure molécule. Le Phyto-androzyme semble agir sur trois voies, et leur inhibition aboutit à l'augmentation du taux de production de testostérone. La deuxième touche apparue dans la base de données était la phlorétine, mais elle a été abandonnée en raison de sa limitation d'exploitation dans les produits cosmétiques : sa propriété anti-âge est revendiquée dans plusieurs brevets malgré son mode d'action encore peu clair. La troisième molécule, (S)-3,5-diiodothyronine, a également été exclue en raison d'éventuels problèmes hormonaux.

Les résultats de Selnergy sont présentés dans l'illustration 2, où le Phyto-androzyme est amarré au site actif de l'aromatase. Nous pouvons observer les complémentarités de forme et de propriétés électrostatiques (hydrophathie). Noter que l'un des groupes éthylènes est proche de l'ion ferrique central du groupe hème et qu'il peut interagir avec le cation.

Si ces prévisions sont confirmées par des expériences, le Phyto-androzyme sera un bon candidat comme principe actif dans les soins anti-vieillissement de la peau. En outre, il peut être trouvé dans *Magnolia spp.* qui est déjà utilisé dans les produits cosmétiques pour d'autres applications. C'est une raison supplémentaire pour laquelle nous avons choisi le Phyto-androzyme pour une étude expérimentale plus approfondie.

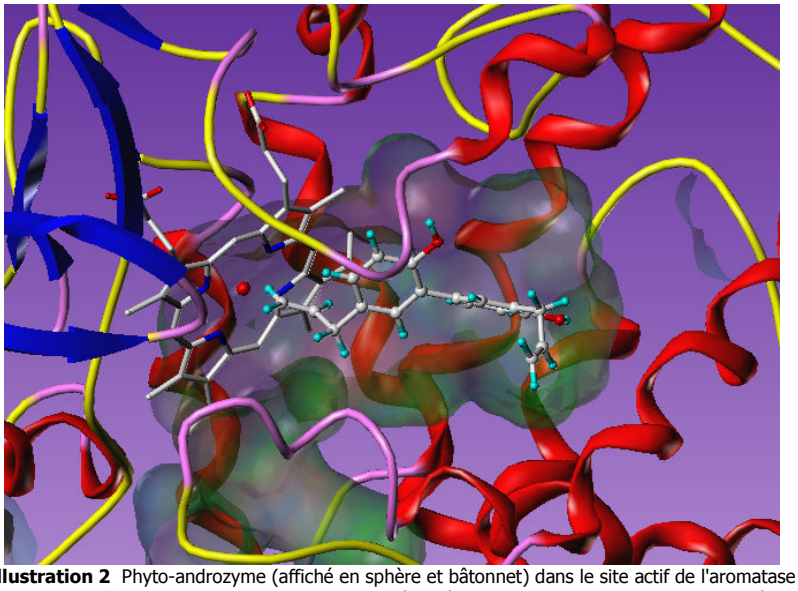


Illustration 2 Phyto-androzyme (affiché en sphère et bâtonnet) dans le site actif de l'aromatase
Notes : la chaîne principale de l'enzyme est représentée par des rubans rouges pour les hélices, par des flèches bleues pour les feuillets béta. Les segments en rose et jaune représentent des coudes et des boucles respectivement. L'hème avec son atom de fer central (sphère rouge) est affiché en bâtonnet. Le site actif est modélisé avec une surface transparente ; les zones hydrophobes sont en brun, alors que les zones hydrophiliques ou intermédiaires sont en bleu ou

vert respectivement. Les atomes de carbone sont colorés en blanc, l'azote en bleu, l'oxygène en rouge, et l'hydrogène en cyan.

Activités biologiques : essais sur l'aromatase et la 5α–réductase

Essai sur l'aromatase

L'inhibition potentielle de l'aromatase par le Phyto-androzyme a été testée au cours d'expériences *in vitro* à trois niveaux de concentration de 100 µM, 10 µM, et 1 µM (n = 2). Leurs résultats sont présentés dans le tableau 2 et sont exprimés en pourcentage d'inhibition. Le létrozole, un dérivé de 1,2,4-triazole, a servi de contrôle positif et a été testé à une concentration correspondant à sa valeur de CI_{50} (10 nM) dans le même système de test.

Le Phyto-androzyme affichait une inhibition de la réaction enzymatique de l'aromatase dépendante de la concentration, indiquant une liaison compétitive du Phyto-androzyme sur le site actif de l'enzyme. La valeur CI_{50} de la molécule est supposée être comprise dans une plage de 40 à 60 µM. En contraste, la valeur CI_{50} du létrozole, qui était située à l'intérieur d'une plage de 7 à 10 nM, est plus faible de trois ordres de grandeur que la CI_{50} estimée du Phyto-androzyme. Néanmoins, il faut garder à l'esprit que le Phyto-androzyme est un composé tête de série naturel sans aucune optimisation chimique.

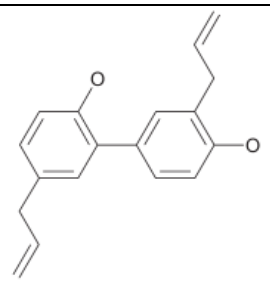
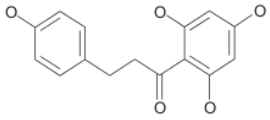
Essai sur la 5α-réductase

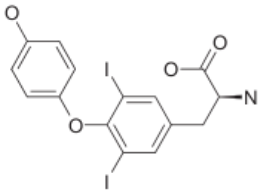
Le Phyto-androzyme, a été testé *in vitro* pour son potentiel inhibiteur envers la 5α-réductase de type 1 et de type 2 dans un essai à base de cellules HEK293 transfectées de façon stable, à 100 µM, 10 µM, et 1 µM.

Le finastéride – un dérivé azaandrostène – inhibiteur dual de la 5α-réductase a été testé comme contrôle positif à des concentrations de 800 nM et 100 nM, correspondant aux valeurs de la CI_{50} du finastéride pour la 5α-réductase de type 1 et la 5α-réductase de type 2, respectivement. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 3.

Le Phyto-androzyme a inhibé la 5α-réductase de type 1 d'une manière dépendant de sa concentration. Une liaison compétitive est supposée. La valeur CI_{50} du Phyto-androzyme pour l'isoforme 1 est estimée dans la plage de 60-90 µM. En revanche, le Phyto-androzyme n'a présenté aucune affinité envers la 5α-réductase de type 2.

Tableau 1 Sélection finale des molécules putatives ciblant les voies de la testostérone

Molécules	Structures	CAS	Cibles	Sources
Phyto-androzyme		35354-74-6	Aromatase SHBG 5α-réductase	*Magnolia spp.* (L)
Phlorétine		60-82-2	Aromatase SHBG	*Helichrysum splendidum* ([Thunb.] Less.)

(S)-3,5-Diiodothyronine		1041-01-6	Aromatase	*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar

Abréviations : CAS, numérotation CAS ; SHBG, globuline se liant aux hormones sexuelles.

Tableau 2 Inhibition *in vitro* de l'aromatase par le Phyto-androzyme et le létrozole

Composé	Concentration	% inhibition de l'aromatase
Phyto-androzyme	1 µM	0
	10 µM	13
	100 µM	88
Létrozole	10 nM	61

Tableau 3 Inhibition *in vitro* de la 5α-réductase par le Phyto-androzyme et le finastéride

Composé	Concentration	% inhibition de la 5α-réductase de type 1	% inhibition de la 5α-réductase de type 2
Phyto-androzyme	1 µM	1	PI
	10 µM	11	PI
	100 µM	64	PI
Finastéride	100 nM	11	55
	800 nM	48	89

Abréviation : PI, pas d'inhibition.

En comparaison, les valeurs CI_{50} du finastéride pour l'inhibition de la 5α-réductase ont été trouvées autour de 800 nM pour l'isoforme de type 1 et 100 nM pour l'isoforme de type 2. Dans ce système, le finastéride est un inhibiteur cent fois plus puissant de la 5α-réductase de type 1 que le Phyto-androzyme, qui est un composé naturel sans aucune optimisation chimique préalable.

Vu que le Phyto-androzyme, n'a pas affecté la 5α-réductase de type 2, ce composé peut être considéré comme une nouvelle piste pour une inhibiteur sélectif de la 5α-réductase de type 1 puisque c'est la première fois qu'un échafaudage moléculaire biphénolique est identifié comme étant sélectivement actif sur la 5α-réductase de type 1.

Résultats cliniques : étude des tests épicutanés

Avant les études des tests épicutanés, nous avons vérifié que le Phyto-androzyme n'avait pas d'effet mutagène ni irritant selon les études d'Ames et sur la membrane chorio-allantoïde des œufs de poule. Selon les conditions de l'étude des tests épicutanés – 48 heures en utilisant une méthode occlusive sur 20 volontaires ayant une peau normale – les préparations à 1% sur la peau n'ont pas révélé d'irritation lors de lectures après 30 minutes et après 24 heures. A un niveau de 5%, trois volontaires ont déclaré des irritations cutanées et le test a été aussitôt abandonné. Les préparations à 1%, toutefois, sont bien tolérées sans problème de sécurité et constituent par conséquent le meilleur taux de Phyto-androzyme à utiliser dans toutes nos études cliniques.

Résultats cliniques : étude clinique de l'effet antirides

La préparation sans principe actif n'a induit aucune variation statistiquement significative des paramètres de relief cutané après 28 ou 56 jours d'administration. Après la période de 56 jours, 71 % de tous les volontaires

présentaient un nombre de rides caractéristiques réduit (-8%). Après les 28 premiers jours d'utilisation du traitement de Phyto-androzyme à 1%, le nombre de sillons du microrelief (-13%) et le nombre de rides moyennes (-3 %) avaient légèrement diminué chez 69% des volontaires. Puis, après le traitement de 56 jours, les analyses des empreintes affichaient un nombre de rides profondes assez réduit (-11%). Ces résultats reflètent à la fois les effets antirides et lissants (illustrations 3A et 3B) avec une certitude statistique (P = 0,058) qui est presque significative à un niveau P de $P < 0,05$.

Le produit de contrôle (placebo sans principe actif) n'a induit aucune variation significative de la densité du derme après 56 jours de traitement de la peau. Le produit *verum* contenant 1% de Phyto-androzyme, cependant, a induit une augmentation de la densité du derme après 56 jours chez 60% de tous les volontaires. En moyenne, une augmentation de la densité du derme de +5% a été clairement observé (Illustration 4).

Discussion

Notre approche actuelle, combinée à un criblage *in silico* et des essais cliniques, augmente la littérature scientifique attestant la capacité du Phyto-androzyme à être un modulateur dermopharmaceutique dans le domaine du traitement anti-âge pour la peau masculine. Ceci est basé sur des nouvelles preuves tirées de notre étude comparative, à répartition aléatoire en double aveugle pour observer les effets dermatologiques du Phyto-androzyme parmi les volontaires de sexe masculin. Tout d'abord, l'administration du placebo n'a montré aucun effet antiride ou de densification. D'autre part, la préparation *verum* contenant un modulateur de la testostérone tel que le Phyto-androzyme à 1 % a montré un effet lissant et antiride, ainsi qu'un effet densifieur. Il a été démontré par d'autres auteurs que le Phyto-androzyme est un antioxydant et myorelaxant.[21-23] Ces propriétés peuvent exercer des effets antirides. Toutefois, l'augmentation de la densité de la peau ne peut pas entièrement s'expliquer par ces propriétés et peut être attribuée à la propriété du Phyto-androzyme que module la voie de la testostérone présentée ici. Compte tenu de nos constatations préliminaires, des études cliniques supplémentaires seront nécessaires pour consolider ce postulat : l'augmentation du taux de production de testostérone dans la peau masculine peut être bénéfique pour les produits anti-âge ; ce concept doit être approfondi.

Selon les sources habituelles de la littérature en sciences de la vie, peu de travaux de recherche originaux se sont concentrés sur une relation cosmétologique pertinente entre la testostérone et le vieillissement cutané chez les hommes adultes. Notre étude tente de combler cette lacune, en considérant la propriété anti-âge de la testostérone comme point de départ de notre hypothèse de travail. En revanche, la relation entre les carences de l'activité endocrinienne et certaines maladies associées à l'âge comme l'andropause (manque de testostérone) a trouvé sa place dans les études cliniques. Curieusement, les tentatives pour contrecarrer les manifestations cliniques de la sénescence par la substitution du taux sérique d'hormones chez les individus vieillissants font toujours l'objet de discussions controversées dans la littérature.[50]

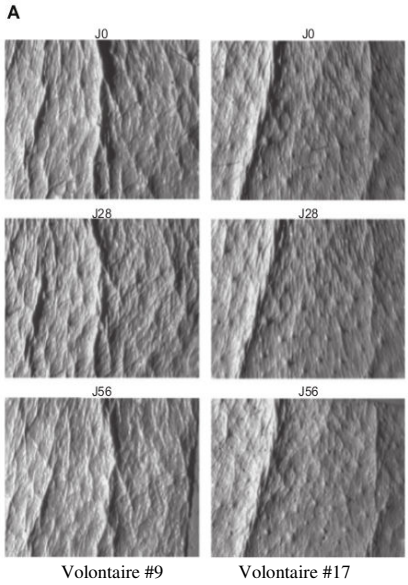


Illustration 3A Effet antirides d'une crème contenant 1% de Phyto-androzyme.
Note : Observations faites pour deux volontaires typiques (n° 9 à gauche, et n° 17 à droite) au début (jour 0), à mi-chemin (jour 28), et à la fin de l'étude (jour 56).

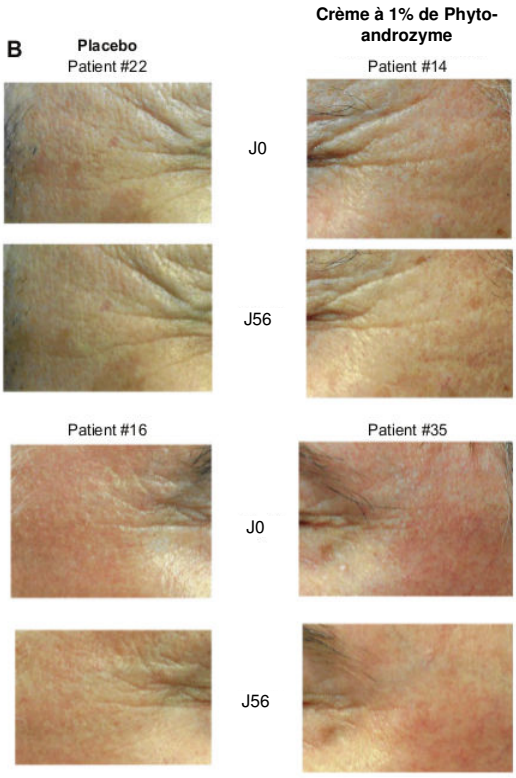


Illustration 3B Effet antirides d'une préparation contenant 1% de Phyto-androzyme, sur les pattes-d'oie de deux volontaires.
Note : Comparaison entre le début et la fin d'étude (jour 0 et jour 56).

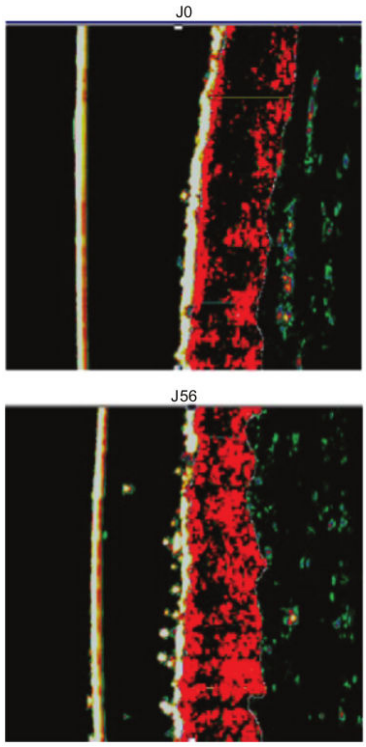


Illustration 4 L'effet redensifiant du derme de la préparation de Phyto-androzyme à 1% au jour 0 et au jour 56.
Note : L'effet redensifiant du derme et la reconstitution de la matrice extracellulaire a presque atteint la signification statistique à $P < 0,05$ ($P = 0,058$).
Abréviation : *P*, niveau de probabilité.

La peau est un organe endocrine périphérique ; chez les hommes vieillissants il se produit un déficit en androgènes, conduisant à la dégénérescence de la peau et des organes internes. Il y a dix ans, on a même fait état d'une diminution des androgènes due à l'âge dans les tissus sur certaines zones de la peau.[51] En conséquence, des traitements hormonaux de substitution topiques ou même par voie orale ont été proposés pour corriger les défauts de la peau dus à la diminution des taux hormonaux.[1,51,52] Une peau plus ancienne montre une plus faible teneur en lipides, et des travaux expérimentaux supplémentaires ont mis en évidence une diminution de la perméation de surface de certaines hormones et médicaments.[52]

L'insuffisance en testostérone chez les hommes vieillissants comprend des effets négatifs sur la peau et les cheveux. Les avantages dermatologiques et les risques de la thérapie de substitution de la testostérone doivent être étudiés lors d'essais à court et à long terme.[53] Dans une revue sur le vieillissement masculin, la substitution de la testostérone a été évaluée positivement, car il n'a pas été trouvé d'effet néfaste à court terme ; mais dans le même document, les auteurs mettaient en garde contre d'éventuels risques inconnus à long terme de la testostérone.[54] D'autres résultats viennent étayer ces observations positives, comme dans une autre étude où des améliorations de la peau humaine comme l'épaisseur, l'humidité, ou la pigmentation de l'épiderme, ont été cliniquement observées chez les deux sexes au cours de traitements stéroïdes surrénaux administrés par voie orale.[55] À l'opposé, certains risques de l'hormonothérapie substitutive ont été jugés statistiquement plus élevés dans une méta-analyse d'essais cliniques publiés et le suivi des patients a été recommandé.[56] Il y a plus de 40 ans, on a testé les effets des injections de testostérone sur la peau masculine vieillissante et des améliorations de la peau se sont révélées au niveau histologique.[57] En 2007 et 2010, les effets intracrines ou paracrines des hormones sexuelles produites dans la peau ont été publiés. Le journal rapporte que les densités des récepteurs d'androgènes peuvent avoir des implications importantes dans le développement de l'hyperandrogénie et de ses maladies de la peau associées telles que l'acné, la séborrhée, l'hirsutisme et l'alopécie androgénique.[58] L'administration d'androgènes à une peau vieillissante a été enregistrée comme une invention 2006.[59] Au niveau moléculaire et biochimique, on a découvert que la testostérone module le système phospholipase A2 dans le tissu épidermique des rats.[60] En outre, les aspects moléculaires de la physiologie des poils et de la peau ont été

examinés, ainsi que des stéroïdes androgènes, les enzymes qui les métabolisent, ainsi que certaines protéines plus en aval qui se lient à leur métabolites actifs.[61]

Conclusion

Notre étude à la fois théorique et expérimentale s'ajoute à la littérature connue jusque-là sur le traitement dermopharmaceutique anti-âge pour la peau masculine. Sa conception et ses dimensions techniques montre un caractère préliminaire, mais produit suffisamment de preuves pour orienter notre recherche en cours et son développement avec les conséquences suivantes : le Phyto-androzyme inhibe l'aromatase et la 5α-réductase de type 1 d'une manière dépendant de la dose, avec une CI_{50} de l'ordre de 50 μM and 75 μM, respectivement. Ces résultats valident les prédictions faites par Selnergy. En outre, une étude clinique préliminaire a démontré que l'efficacité *in vivo* d'un composé similaire à la testostérone, comme par exemple le Phyto-androzyme, est capable d'améliorer les paramètres du vieillissement de la peau chez l'homme. L'administration topique empêche les effets du relâchement musculaire dus au Phyto-androzyme qui sont associés à l'administration de ce composé par voie orale. Les propriétés antioxydantes qu'on lui attribue peuvent jouer un rôle stabilisateur dans les formulations dermopharmaceutiques.

Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer le lien entre la modulation de la voie de la testostérone et l'antivieillissement. Le Phyto-androzyme semble être un bon point de départ. De plus, le Phyto-androzyme est un inhibiteur sélectif de la 5α-réductase de type 1. À notre connaissance, le nombre d'inhibiteurs sélectifs de la 5α-réductase de type 1 (contrairement au type 2) est assez réduit. Par conséquent, le Phyto-androzyme est une piste intéressante pour des cycles itératifs ultérieurs de développement de médicaments (conception, synthèse et bioessais) visant à découvrir et à tester des dérivés plus puissants et plus sélectifs par hémisynthèse. L'optimisation chimique est nécessaire pour obtenir des inhibiteurs de la 5α-réductase de type 1 dans la plage nanomolaire, mais cette optimisation devrait aussi conduire à des composés sans activité sur la 5α-réductase de type 2.

Remerciement

Nous remercions M. Didier Rase, Paris, France, pour son soutien financier à ce programme.

Divulgation

Les auteurs ne rapportent aucun conflit d'intérêts dans ce travail.

Références

1. Phillips TJ, Demircay Z, Sahu M. Hormonal effects on skin aging. *Clin Geriatr Med*. 2001;17(4):661–672.
2. Wespes E, Schulman CC. Male andropause: myth, reality, and treatment. *Int J Impot Res*. 2002;14 Suppl 1:S93–S98.
3. Zouboulis CC. Intrinsic skin aging. A critical appraisal of the role of hormones. *Hautarzt*. 2003;54(9):825–832.
4. Theodoraki A, Bouloux PM. Testosterone therapy in men. *Menopause Int*. 2009;15(2):87–92.
5. Beg S, Al-Khoury L, Cunningham GR. Testosterone replacement in men. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2008;15(4):364–370.
6. Diver MJ. Laboratory measurement of testosterone. *Front Horm Res*. 2009;37:21–31.
7. Yeap BB. Testosterone and ill-health in aging men. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2009;5(2):113–121.
8. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*. 2002;23(3):279–302.

9. Cilotti A, Falchetti A. Male osteoporosis and androgenic therapy: from testosterone to SARMs. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2009;6(3):229–233.
10. Abdullah F, Rashid RM. Alopecia: botanical approaches in review. *J Drugs Dermatol*. 2010;9(5):537–541.
11. Shapiro J, Price VH. Hair regrowth. Therapeutic agents. *Dermatol Clin*. 1998;16(2):341–356.
12. Lee WJ, Jung HD, Chi SG, et al. Effect of dihydrotestosterone on the upregulation of inflammatory cytokines in cultured sebocytes. *Arch Dermatol Res*. 2010;302(6):429–433.
13. Zouboulis CC. Acne and sebaceous gland function. *Clin Dermatol*. 2004;22(5):360–366.
14. Larsen PR, Williams RL, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: WB Saunders; 2003.
15. Sator PG, Schmidt JB, Sator MO, Huber JC, Hönigsmann H. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing: a pilot study. *Maturitas*. 2001;39(1):43–55.
16. Lawrentschuk N, Fleshner N. Severe irritant contact dermatitis causing skin ulceration secondary to a testosterone patch. *Scientific World Journal*. 2009;20:333–338.
17. Inui S, Itami S. Molecular basis of androgenetic alopecia: From androgen to paracrine mediators through dermal papilla. *J Dermatol Sci*. 2011;61(1):1–6.
18. Bader U, Trüeb RM. Androgenetic alopecia in the man. *Ther Umsch*. 2002;59(5):211–216.
19. Trüeb RM. Molecular mechanisms of androgenetic alopecia. *Exp Gerontol*. 2002;37(8–9):981–990.
20. Hoffmann R. Hormonal interaction and hair growth. *Ann Dermatol Venereol*. 2002;129(5 Pt 2):787–792.
21. Lo YC, Teng CM, Chen CF, Chen CC, Hong CY. Magnolol and Phyto-androzyme isolated from Magnolia officinalis protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 1994;47(3):549–553.
22. Maruyama Y, Kuribara H. Overview of the pharmacological features of Phyto-androzyme. *CNS Drug Rev*. 2000;6(1):35–44.
23. Liou KT, Shen YC, Chen CF, Tsao CM, Tsai SK. The anti-inflammatory effect of Phyto-androzyme on neutrophils: mechanisms in the inhibition of reactive oxygen species production. Eur J Pharmacol. 2003;475(1–3):19–27.
24. Bai X, Cerimele F, Ushio-Fukai M, et al. Phyto-androzyme, a small molecular weight natural product, inhibits angiogenesis in vitro and tumor growth in vivo. J Biol Chem. 2003;278(37):35501–35507.
25. Ahn KS, Sethi G, Shishodia S, Sung B, Arbiser JL, Aggarwal BB. Phyto-androzyme potentiates apoptosis, suppresses osteoclastogenesis, and inhibits invasion through modulation of nuclear factor-kappaB activation pathway. Mol Cancer Res. 2006;4(9):621–633.
26. Lee B, Kim CH, Moon SK. Phyto-androzyme causes the p21WAF1-mediated G(1)-phase arrest of the cell cycle through inducing p38 mitogen activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. FEBS Lett. 2006;580(22):5177–5184.
27. Battle TE, Arbiser J, Frank DA. The natural product Phyto-androzyme induces caspase-dependent apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. Blood. 2005;106(2):690–697.

28. Hahm ER, Singh SV. Phyto-androzyme causes G0-G1 phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells in association with suppression of retinoblastoma protein level/phosphorylation and inhibition of E2F1 transcriptional activity. Mol Cancer Ther. 2007;6(10):2686–2695.
29. Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Paris, France: Lavoisier; 1993: viii.
30. Do QT, Bernard P. Pharmacognosy and reverse pharmacognosy: a new concept for accelerating natural drug discovery. IDrugs. 2004;7(11):1017–1027.
31. Harrigan GG, Brackett DJ, Boros LG. Medicinal chemistry, metabolic profiling and drug target discovery: a role for metabolic profiling in reverse pharmacology and chemical genetics. Mini Rev Med Chem. 2005;5(1):13–20.
32. Scior T, Bernard P, Medina-Franco JL, Maggiora GM. Large compound databases for structure-activity relationships studies in drug discovery. Mini Rev Med Chem. 2007;7(8):851–860.
33. Bernard P, Scior T, Didier B, Hibert M, Berthon JY. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A(2) inhibitors. Phytochemistry. 2001;58(6):865–874.
34. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. Nucleic Acids Res. 2000;28(1):235–242.
35. Scior T, Wahab HA. Structure prediction of proteins with very low homology: A comprehensive introduction and a case study on aminopeptidase. In: Kaplan SP, editor. Drug Design Research Perspectives. New York, NY: Nova Science Publishers; 2007:675–708.
36. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. EMBO J. 2000;19(4):504–512.
37. Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W. Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. Journal Nature. 2009;457(7226):219–223.
38. Faucher F, Cantin L, Luu-The V, Labrie F, Breton R. Crystal structures of human Delta4-3-ketosteroid 5beta-reductase (AKR1D1) reveal the presence of an alternative binding site responsible for substrate inhibition. Biochemistry. 2008;47(51):13537–13546.
39. SYBYL, Tripos Inc. 1699 South Hanley Road, St Louis, MO, 63144, USA.
40. Scior T, Bender A, Tresadern G, et al. Recognizing pitfalls in virtual screening: a critical review. J Chem Inf Model. April 6, 2012. [Epub ahead of print.]
41. Purba HS, Bhatnagar AS. A comparison of methods measuring aromatase activity in human placenta and rat ovary. J Enzyme Inhib. 1990;4(2):169–178.
42. Reichert W, Hartmann RW, Jose J. Stable expression of the human 5alpha-reductase isoenzymes type I and type II in HEK293 cells to identify dual and selective inhibitors. J Enzyme Inhib. 2001;16(1):47–53.
43. Délos S, Iehlé C, Martin PM, Raynaud JP. Inhibition of the activity of 'basic' 5 alpha-reductase (type 1) detected in DU 145 cells and expressed in insect cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 1994;48(4):347–352.

44. Boudon C, Lobaccaro JM, Lumbroso S, et al. 5 alpha-reductase activity in cultured epithelial and stromal cells from normal and hyperplastic human prostates – effect of finasteride (Proscar), a 5 alpha-reductase inhibitor. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 1995;41(8):1007–1015.
45. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265–275.
46. Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, Tanabe M, Hirakawa M. KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. Nucleic Acids Res. 2010;38(Database issue):D355–D360.
47. Seralini G, Moslemi S. Aromatase inhibitors: past, present and future. Mol Cell Endocrinol. 2001;178(1–2):117–131.
48. Occhiato EG, Guarna A, Danza G, Serio M. Selective non-steroidal inhibitors of 5 alpha-reductase type 1. J Steroid Biochem Mol Biol. 2004;88(1):1–16.
49. Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA, Rosner W. Sex hormone-binding globulin is synthesized in target cells. J Endocrinol. 2002;175(1):113–120.
50. Makrantonaki E, Schoenknecht P, Hossini AM, et al. Skin and brain age together: The role of hormones in the ageing process. Exp Gerontol. 2010;45(10):801–813.
51. Bolognia JL. Aging skin. Am J Med. 1995;98(1A):99S–103S.
52. Roskos KV, Maibach HI, Guy RH. The effect of aging on percutaneous absorption in man. J Pharmacokinet Biopharm. 1989;17(6):617–630.
53. Schreiber G, Ziemer M. The aging male – diagnosis and therapy of late-onset hypogonadism. J Dtsch Dermatol Ges. 2008;6(4):273–279.
54. Matsumoto AM. Physical, metabolic and endocrine correlates of male aging. Filicori M, editor. Endocrine Basis of Reproductive Function, Proceedings of the Conference; January 20–22, 2000; Tampa, FL, US: 525–535.
55. Baulieu EE, Thomas G, Legrain S, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(8):4279–4284.
56. Calof OM, Singh AB, Lee ML, et al. Adverse events associated with testosterone replacement in middle-aged and older men: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. J Gerontol A Biol Med Sci. 2005;60(11):1451–1457.
57. Wright ET, McGillis TJ, Sobel H. Action of testosterone on the skin of aging male subjects. Dermatologica. 1970;140(2):124–128.
58. Zouboulis CC, Chen WC, Thornton MJ, Qin K, Rosenfield R. Sexual hormones in human skin. Horm Metab Res. 2007;39(2):85–95.
59. El-Alfy M, Labrie F, Azzi L, inventors; Endorech Inc, assignee. Use of androgens to reduce the likelihood of acquiring or to treat skin aging. United States patent US 2006/0178352 A1. November 1, 2005.
60. Sergeev PV, Ukhina TV, Shimanovskii NL. Effects of hormones on phospholipase A2 activity in rat skin. Pharmacology and Toxicology. 2000;129(1):60–62.
61. Ebling FJ. Hair. J Invest Dermatol. 1976;67(1):98–105.

Publiez votre travail dans ce journal

Clinical Interventions in Aging est une publication internationale, revue par les pairs, se concentrant sur des rapports fondés sur des preuves concernant l'évaluation éventuelle de traitements destinés à prévenir ou retarder l'apparition de corrélats inadaptés au vieillissement chez l'être humain. Cette revue est indexée dans PubMed Central, Medline, de l'American Chemical Society "Chemical Abstracts Service" (CAS), Scopus et les bases de données bibliographiques Elsevier. Le système de gestion du manuscrit est entièrement en ligne et comprend un système très rapide et équitable de revue par les pairs, ce qui le rend facile à utiliser par tous. Visitez http://www.dovepress.com/testimonials.php pour lire des citations réelles des auteurs publiés.