

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie



Année 2002

THESE N° 308/1

**EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-AROMATASIQUE
DE FLAVONOIDES SYNTHETIQUES**

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 19 avril 2002

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 091010 1

par

Anne-Elise BESSON

née le 9 mai 1977 à Limoges

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur HABRIOUX G.- Président
Mme FAGNERE C. *Maître de Conférences*.....- Juge
Mme LAGARDE A. *Pharmacien des Hôpitaux*.....- Juge
Mlle POUGET C. *Docteur en Pharmacie*.....- Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS Madame le Professeur **CHULIA** Dominique
Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE- PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACIE GALENIQUE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACIE GALENIQUE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DREYFUSS Gilles	PARASITOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE** Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	PHYSIQUE-INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE PHARMACEUTIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique

PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel

ANGLAIS

ATER

CALLISTE Claude

BIOPHYSIQUE

MARFAK Abdelghafour

BIOPHYSIQUE

POUGET Christelle

CHIMIE THERAPEUTIQUE

RIAHI DEHKORDI Homayoun

PHYSIOLOGIE-PARASITOLOGIE

TALLET Dominique

PHARMACOLOGIE

A Monsieur le professeur HABRIOUX Gérard

Président du jury

Directeur de thèse

Vous nous avez confié le sujet de ce travail et fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Pour votre bienveillance à notre égard, pour la grande richesse de votre enseignement, pour l'aide précieuse que vous nous avez apporté, veuillez trouver ici le témoignage de toute notre gratitude et de notre très profond respect.

A Madame FAGNERE Catherine

Juge

Maître de Conférence

Vous avez montré un intérêt pour cette thèse et vous avez fait l'honneur de bien vouloir la juger.

Nous avons pu bénéficier de votre expérience et de votre enseignement.

Soyez assurée de notre respectueuse gratitude.

A Madame LAGARDE Aline

Juge

Pharmacien des Hôpitaux

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites de juger notre thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A Mlle Christelle POUGET

Juge

Docteur en Pharmacie

Tu as fait preuve de beaucoup de patience et tu m'as apporté ton aide avec une grande disponibilité.

Tous tes conseils, et l'étendue de tes connaissances, ont été déterminants dans la réalisation de ce travail.

Sans ton soutien ce travail n'aurait pu voir le jour.

Trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié respectueuse et sincère.

A Lionel

Je te dédie cette thèse.

Que ce travail soit le gage de l'immense amour que je te porte.

A mes parents

Pour les sacrifices qu'ils se sont imposés, pour leur soutien, pour tous les conseils qu'ils m'ont inculqué et pour le mode de vie qu'ils m'ont enseigné.

Trouvez ici le témoignage de mon immense affection et de ma profonde reconnaissance.

A tous mes amis

A tous ceux qui ont su m'aider et me soutenir pendant ces années.

A tous nos moments de complicité inoubliables.

PLAN

PLAN	1
INTRODUCTION	3
CANCER DU SEIN ET FLAVONOÏDES	6
1. LE CANCER DU SEIN	7
1.1. Epidémiologie	7
1.2. Etiologie.....	8
1.3. Les différentes formes de cancer du sein	10
1.4. Le dépistage	12
1.5. Le traitement.....	12
1.6. Les inhibiteurs de l'aromatase	23
2. LES FLAVONOÏDES	37
2.1. Généralités	37
2.2. L'activité anti-aromatase des flavonoïdes.....	46
TRAVAUX PERSONNELS	51
1. MATERIELS ET METHODES	52
1.1. Rappels bibliographiques : systèmes et méthodes utilisés.....	52
1.2. Principe d'étude de l'activité inhibitrice des flavonoïdes sur l'aromatase	53
1.3. Le protocole aromatase	57
1.4. Méthode de synthèse des flavonoïdes	60
2. RESULTATS ET DISCUSSION	62
2.1. Modulation du noyau B à partir de la 7-méthoxyflavanone.....	62
2.2. Modulation du noyau B à partir de la 7-hydroxyflavanone.....	68
2.3. Discussion.....	71
CONCLUSION	72
BIBLIOGRAPHIE	75
ABREVIATIONS	80
INDEX DES SCHEMAS ET TABLEAUX	82
TABLE DES MATIERES	84

INTRODUCTION

Le cancer du sein est une pathologie qui représente aujourd'hui une préoccupation importante pour le monde médical. En effet, il est actuellement le type de cancer le plus fréquent chez les femmes ménopausées vivant dans les pays développés.

Chaque jour, de nouveaux cas sont dépistés et le nombre de femmes atteintes progresse chaque année de un pour cent.

Trois principaux facteurs concourent à accroître la fréquence de ces cancers : le vieillissement de la population, l'âge plus tardif de la première grossesse et certains facteurs nutritionnels et hormonaux.

Outre les traitements par chirurgie, par radiothérapie et par chimiothérapie, qui sont des traitements difficiles à supporter pour les patientes, une nouvelle ligne thérapeutique est apparue : Il s'agit de l'hormonothérapie. En effet, le rôle des estrogènes dans la cancérogenèse mammaire est confirmé par de nombreuses études épidémiologiques (Touraine, 1995). L'hormonothérapie vise donc à modérer la quantité d'estrogènes présents dans les tumeurs mammaires.

L'aromatase est un complexe enzymatique responsable de la synthèse des estrogènes, mais elle est également impliquée dans les pathologies cancéreuses estrogéno-dépendantes. Elle est présente à l'intérieur ou en périphérie des tumeurs, notamment dans 60 à 70 % des cancers du sein, et peut donc jouer un rôle direct important dans leur croissance chez la femme ménopausée. Son inhibition est donc une stratégie thérapeutique intéressante dans ce type de cancer (Auvray, 2000).

Les flavonoïdes sont des molécules présentes dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par des propriétés d'inhibition enzymatique importantes. Des études antérieures ont montré que certains de ces flavonoïdes avaient une action inhibitrice sur l'aromatase.

Les travaux de recherches effectués dans le cadre de ce travail ont pour but d'évaluer certains flavonoïdes dont le squelette a été modulé pour obtenir une activité anti-aromatase optimale.

La présentation de ces travaux se déroule en deux parties :

- La première partie expose dans un premier temps la pathologie du cancer du sein, son aspect épidémiologique, étiologique ainsi que les différentes formes de traitement. L'accent est porté sur les inhibiteurs de l'aromatase, synthétiques ou naturels.

Puis dans un deuxième temps, nous présentons les flavonoïdes, leur origine et leurs propriétés. Parmi ces propriétés, nous insistons volontairement sur leur activité anti-aromatase.

- La seconde partie expose les travaux de recherche effectués au sein du laboratoire de Biochimie, dirigé par Monsieur le Professeur Habrioux. Après une brève présentation des méthodes utilisées, les résultats obtenus sont détaillés et une relation structure/activité est établie.

CANCER DU SEIN ET FLAVONOIDES

1. LE CANCER DU SEIN

1.1. Epidémiologie

Le cancer du sein représente aujourd'hui un important problème de santé publique. En effet, c'est la forme de cancer la plus fréquente chez les femmes d'Amérique du Nord et de presque tous les pays d'Europe, d'Amérique latine, d'Australie et d'Asie. Il faut noter que l'incidence est maximale dans les pays occidentaux (Gourinel, 1996 ; Astra Zeneca, 2000).

Quelques chiffres se révèlent alarmants :

- Un cancer sur trois survenant entre 50 et 65 ans est un cancer du sein (Tixier, 1994).
- En France, par an, 28000 nouveaux cas de cancer sont répertoriés, dont 20000 chez la femme ménopausée.
- Dans le monde, on estime à 5 millions le nombre de femmes qui seront touchées au cours de la prochaine décennie.

Actuellement, le risque pour une femme d'être atteinte par la maladie, atteint le rapport inquiétant de 1 pour 14 (Gourinel, 1996 ; Astra Zeneca, 2000). De plus, l'incidence du cancer augmente inexorablement dans la quasi totalité des pays, qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement ; cette augmentation est en moyenne d'environ 1% par an.

L'incidence croît rapidement entre 40 et 50 ans, puis continue à augmenter avec l'âge après la ménopause (la moyenne d'âge au moment du diagnostic est de 60 ans).

Il est difficile d'expliquer cette constante augmentation de l'incidence ; cependant, il serait impossible de ne pas mettre en cause le vieillissement de la population, particulièrement élevé dans les pays occidentaux. L'alimentation et le mode de vie peuvent influencer le risque de cancer puisque les populations asiatiques ont une incidence du cancer du sein plus faible que les populations occidentales. Ainsi, les Asiatiques qui émigrent dans nos contrées, mais qui conservent leur mode alimentaire, n'augmentent pas leur risque spontané en ce qui concerne ces cancers. Par contre, le risque carcinologique augmente dès que leur régime s'occidentalise (Elia, 1999).

1.2. Etiologie.

L'étiologie de la majorité des cancers du sein demeure encore inconnue mais elle est en général multifactorielle. On suppose que de nombreux facteurs non encore identifiés peuvent être responsables de l'apparition d'un cancer du sein. Cependant, certaines causes ont clairement été mises en évidence.

1.2.1. Hérité et facteurs génétiques

Les antécédents familiaux de cancer du sein constituent un facteur de risque important. Une corrélation est possible entre l'existence de cancer du sein dans la famille maternelle proche (mère, fille ou sœur) et le risque de survenue d'un tel cancer chez une patiente (le risque est multiplié par 2 ou 3). Une composante héréditaire est retrouvée pour au moins 10% des cas (Gourinel, 1996). De plus, certains gènes de prédisposition ont été identifiés récemment : BRCA₁ a été localisé sur le chromosome 17, BRCA₂ sur le chromosome 21 (Astra Zeneca, 2000).

Les importantes variations de l'incidence de ce cancer selon les pays et selon les époques dans un même pays indiquent aussi la présence de facteurs étiologiques non génétiques (Astra Zeneca, 2000).

1.2.2. Antécédents personnels

Dans le cas d'une maladie fibrokystique ou d'antécédent de tumeur bénigne du sein, la patiente présente un risque élevé de voir apparaître une néoplasie (ce risque relatif est égal à 2). Il faut noter que ce risque est majoré s'il existe au départ une hyperplasie atypique.

Certaines mastopathies bénignes peuvent aussi être le point de départ d'une tumeur. Mais pour ces lésions bénignes, il n'y a pas de réelle certitude quant à leur évolution en cancer (Gourinel, 1996).

1.2.3. Facteurs hormonaux

Un grand nombre d'éléments sont en faveur d'une place prépondérante des facteurs hormonaux dans l'étiologie du cancer du sein. Ces facteurs, endogènes ou exogènes, modifient en particulier le climat hormonal du tissu mammaire. Les principaux facteurs de risque sont :

- une puberté précoce (avant 12 ans),
- la ménopause tardive (après 55 ans),
- la nulliparité ou une première grossesse tardive (après 30 ans),
- des taux élevés de prolactine et d'estrogènes,
- un traitement substitutif par estrogènes, au long cours et à fortes posologies.

On peut noter que les estroprogestatifs utilisés en contraception orale n'augmenteraient pas le risque si la concentration en estrogène est faible. Toutefois, chez les patientes dites à risque, le choix devra plutôt se porter sur un contraceptif à dominante progestative.

En revanche, d'autres facteurs auraient un rôle protecteur :

- des taux élevés de progestérone,
- une première grossesse précoce ainsi que de nombreuses grossesses (en effet, la grossesse permet la maturation complète de la glande mammaire qui peut ainsi bénéficier de l'effet protecteur de la progestérone),
- l'allaitement pourrait jouer un rôle protecteur d'autant plus qu'il est prolongé.

1.2.4. Facteurs nutritionnels et environnementaux

Le surplus de graisse chez la femme obèse favoriserait le développement d'une flore bactérienne colique, capable de synthétiser des agents cancérigènes potentiels. Donc, après la ménopause, le risque pour une femme obèse d'être atteinte d'un cancer du sein est multiplié par 2.

On peut ajouter que l'alcool et un déficit en vitamines A et E pourraient jouer un rôle dans la survenue de ce cancer (Gourinel, 1996).

Les rayonnements ionisants, particulièrement s'ils ont été reçus pendant l'enfance et à doses importantes, seraient également responsables de la survenue d'un cancer du sein (Gourinel, 1996).

Malheureusement, il est à ce jour impossible d'exploiter de façon précise et efficace ces différents facteurs. Toutes les tentatives de modifications de ces facteurs chez les femmes à risque n'ont apporté que des résultats décevants.

La prévention est aujourd'hui rendue difficile par la multiplicité étiopathogénétique. L'accent peut être mis sur l'amélioration de l'hygiène de vie, en diminuant la consommation de graisses et d'alcool, et surtout sur le suivi médical régulier à partir de 45 ans (visites régulières chez le gynécologue, mammographie...).

1.3. Les différentes formes de cancer du sein

Les principales formes de cancer du sein peuvent être regroupées en trois catégories selon leurs caractères anatomo-cliniques :

- les carcinomes : ils naissent du revêtement épithélial des canaux (carcinomes canaux) et des lobules (carcinomes lobulaires) et sont définis en fonction de leur caractère infiltrant (l'atteinte tumorale devient invasive dans le tissu conjonctif environnant) ou non.

Les carcinomes du sein représentent 98 % des tumeurs malignes du sein chez la femme.

- les tumeurs malignes non carcinomateuses : ce sont les sarcomes mésoenchymateux, mélanomes, lymphomes malins primitifs du sein.
- les métastases mammaires : elles sont exceptionnelles et proviennent de cancers situés ailleurs.

Il faut cependant noter d'autres formes de cancer, cliniquement différentes et beaucoup plus rares : la maladie de Paget, les tumeurs phyllodes, les sarcomes mammaires (Tixier, 1994).

Outre cette première classification, les cancers du sein peuvent également être classés en fonction de leur hormonosensibilité.

Le sein est un tissu sensible à des principes hormonaux, stéroïdiens ou peptidiques, qui modulent sa croissance et son état fonctionnel.

C'est en 1966 que deux chercheurs, Toft et Gorsky, mettent en évidence la présence de récepteurs hormonaux dans des tumeurs mammaires (Tixier, 1994). Un récepteur hormonal est une structure destinée à agir avec l'hormone, ce qui permettra, par la suite, une réponse cellulaire. Ceci signifie que la présence de récepteurs sur un tissu constitue le témoin de son hormonodépendance.

Les cellules cibles de certaines tumeurs mammaires conservent leurs récepteurs estrogéniques lors de leur transformation en cellules malignes. Les estrogènes peuvent donc entretenir la croissance de ces tumeurs qui ont conservé une partie de leurs propriétés d'organe cible vis à vis de ces hormones. Il s'agit, dans ce cas, de cancers hormonodépendants.

Dans le cas de tumeurs non hormonodépendantes, le système hormonal a été modifié ou détruit par la transformation néoplasique alors que ce système est resté intact dans les tumeurs hormonodépendantes qui ont un meilleur pronostic.

Pour évaluer la sensibilité hormonale d'un cancer, on a donc recours essentiellement au dosage des récepteurs des hormones stéroïdiennes, et plus particulièrement des récepteurs d'estradiol et de progestérone. Ces dosages sont effectués dans le but d'orienter une attitude thérapeutique (Namer, 2000).

1.4. Le dépistage

Comme tous les cancers, le pronostic du cancer du sein dépend du stade auquel il est diagnostiqué. Sachant que le cancer du sein présente un bon pronostic vital quand il est traité à un stade précoce, le dépistage prend alors une importance considérable.

Le dépistage consiste à diagnostiquer le cancer tôt, quand la lésion est petite et localisée, afin d'augmenter les chances de survie. Il existe de nombreuses techniques de dépistage comme :

- l'auto-palpation,
- l'examen clinique annuel,
- la mammographie (qui fait l'objet d'une prise en charge systématique pour les femmes de plus de 50 ans),
- l'échographie,
- l'IRM.

1.5. Le traitement

Les différentes méthodes de traitement utilisées doivent faire appel à diverses modalités adaptées à chaque type de cancer et à chaque patiente.

La stratégie thérapeutique d'un cancer du sein tient compte des différents examens réalisés (cliniques, histologiques, biologiques et radiologiques), du pronostic et du terrain de la patiente. Plusieurs groupes thérapeutiques peuvent être individualisés selon l'évolution de la tumeur (Gourinel, 1996).

1.5.1. Les traitements non médicamenteux

1.5.1.1. La chirurgie

Jusqu'au début des années 70, la chirurgie a été le traitement essentiel du cancer du sein. Ce traitement a une visée locale, mammaire et ganglionnaire (Astra Zeneca, 2000).

- La chirurgie radicale

La chirurgie radicale, proposée par Halsted, consistait en une ablation en bloc de la totalité du sein et des muscles pectoraux avec également résection des ganglions axillaires et sous-claviculaires. Il a été démontré, au fur et à mesure de l'évolution des connaissances médicales, que la chirurgie radicale de Halsted était trop mutilante par rapport aux bénéfices apportés.

Actuellement, la mastectomie radicale modifiée de Patey reste l'intervention de référence :

- dans le cas d'une tumeur de diamètre supérieur à 3 centimètres, multifocale, centrale, et rétromamelonnaire,
- dans le cas d'une réponse insuffisante à un traitement néo-adjuvant (radiothérapie ou chimiothérapie) ou de récurrence locale,
- dans le cas de poussée évolutive, d'extension cutanée ou de métastase à distance,
- lorsque la patiente présente un âge avancé.

- La chirurgie conservatrice

La chirurgie s'efforce actuellement d'être conservatrice. Il s'agit alors de l'exérèse tumorale qui s'effectue par segmentectomie ou le plus souvent par quadrantectomie (ce qui correspond à une résection d'un quadrant mammaire, soit un quart du sein). La chirurgie conservatrice se limite cependant aux tumeurs de taille inférieure à trois centimètres. En pratique, il faut évaluer et adapter l'indication de la chirurgie conservatrice à chaque patiente.

En général, l'acte chirurgical s'accompagne d'un curage axillaire qui a plus une valeur pronostique que thérapeutique car il permet de vérifier s'il y a eu un envahissement ganglionnaire ou non.

Les principales complications de l'acte chirurgical sont :

- * une hypoesthésie de la peau de l'aisselle et de la face interne du bras qui apparaît précocement, ainsi qu'une difficulté pour élever le bras,
- * un lymphocèle traité efficacement par ponction réalisée à l'aiguille (cette complication est fréquente),
- * des infections postopératoires,
- * un lymphoedème du membre supérieur, secondaire à la destruction du réseau lymphatique (Gourinel, 1996).

1.5.1.2. La radiothérapie

La radiothérapie tient une place importante dans le traitement du cancer du sein. Elle représente le traitement quasi systématique de cette pathologie. Elle est le complément de l'acte chirurgical dans la mesure où elle détruit les cellules malignes qui n'auraient pas été enlevées lors de l'exérèse de la tumeur. Il est maintenant prouvé que la radiothérapie réduit de façon significative le taux de récurrences locales.

Il faut noter le rôle important joué par la radiothérapie dans le cas de métastases localisées, particulièrement dans le cas de métastases osseuses ou cérébrales. Elle est indiquée pratiquement à tous les stades de la maladie.

La radiothérapie utilise aujourd'hui des faisceaux d'électrons et des faisceaux de rayons X. L'irradiation englobe la totalité de la glande mammaire et la chaîne mammaire interne (les aires ganglionnaires sus-claviculaire et interne). Les médecins utilisent des faisceaux de photons X ou gamma pour la glande mammaire et des faisceaux mixtes (électrons et photons) pour les aires ganglionnaires.

Notons que chaque protocole de traitement est rigoureusement établi et suivi pour chaque patiente (Gourinel, 1996). La radiothérapie présente une importance capitale dans le traitement de cette pathologie ; elle permet d'améliorer le taux de survie ainsi que la qualité de vie des patientes traitées.

1.5.2. Les traitements médicamenteux

Les traitements par voie générale (c'est à dire chimiothérapie et hormonothérapie) étaient initialement réservés au traitement du cancer du sein de stade avancé mais leur indication est maintenant étendue au traitement adjuvant.

Si la chirurgie et la radiothérapie permettent d'assurer un contrôle loco-régional de la maladie, le traitement systématique secondaire ou adjuvant par chimiothérapie et/ou hormonothérapie a pour but d'éviter l'apparition de métastases à distance (Gourinel, 1996).

1.5.2.1. La chimiothérapie

- Introduction

La chimiothérapie cytotoxique, souvent en association médicamenteuse, est utilisée depuis environ 25 ans.

Les principales indications de la chimiothérapie adjuvante sont l'existence d'un envahissement des ganglions axillaires, le statut préménopausique des patientes et l'absence de récepteurs hormonaux. Elle est également préconisée quand l'hormonothérapie est contre-indiquée ou a peu de chances d'agir.

Dans ce type de cancer, la plupart des rechutes et des décès sont liés à l'existence, au moment du diagnostic, de micrométastases ou de métastases non détectées.

La chimiothérapie vise à détruire les cellules malignes mais aussi à éviter les rechutes et l'apparition de métastases. Elle est donc primordiale à prendre en compte dans le cas de cancer du sein puisque cette pathologie n'est pas loco-régionale mais se généralise secondairement, dans la grande majorité des cas, sous la forme de métastases.

Toutefois, les médecins ont remarqué qu'il était très rare d'obtenir la guérison ou même la rémission d'une tumeur sensible lors de traitement par monochimiothérapie. Ce phénomène s'explique par l'apparition de résistance cellulaire au médicament utilisé. Les cellules tumorales chimiorésistantes sont des cellules qui poursuivent leur prolifération malgré l'administration d'une thérapeutique cytotoxique. Des traitements par polychimiothérapie ont donc été instaurés.

Le but de ce genre de traitement est d'obtenir une réponse synergique d'au moins deux médicaments et d'accroître l'index thérapeutique, sans aggraver les effets secondaires. Elle donne ainsi de meilleurs résultats que la monochimiothérapie en termes de qualité et durée de maintien de la réponse, augmentation du taux de curabilité ou de survie globale (Gourinel, 1996).

- Les agents cytotoxiques (Doros, 2000)

Il existe plusieurs grandes catégories de médicaments cytotoxiques. On adoptera ici un classement par famille thérapeutique.

* Les antimétabolites (tableau I)

Ils sont parmi les plus actifs et les plus employés en association dans le traitement des cancers du sein.

Tableau I : Les antimétabolites

<u>Classe</u>	<u>D.C.I.</u>	<u>Spécialité</u>
Antifoliques	Méthotrexate	METHOTREXATE® LEDERTREXATE® NOVATREX®
Antiprimidiques	5-Fluorouracile	FLUORO-URACILE®

D.C.I : Dénomination commune internationale

Les Antifoliques sont des analogues de l'acide folique agissant comme faux substrat et inhibant compétitivement la dihydrofolate-réductase (enzyme qui permet la transformation d'acide folique en folates). Ils bloquent la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

Les antipyrimidiques sont des analogues des bases pyrimidiques, inhibant la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidilate-synthétase (son association à l'acide folinique augmente son activité en stabilisant sa liaison à cette enzyme).

* Les agents alkylants (tableau II)

Ce type de molécule est capable de remplacer un proton H⁺ d'une autre molécule par un radical alkyl ou R-CH₂- selon :



Tableau II : les agents alkylants

<u>Classe</u>	<u>D.C.I.</u>	<u>Spécialité</u>
Moutardes à l'azote	Chlorambucil Melphalan Ifosfamide Cyclofosfamide	CHLORAMINOPHENE® ALKERAN® HOLOXAN® ENDOXAN®
Antibiotiques	Mitomycine C	AMETYCINE®
Organoplatines	Cisplatine	CISPLATYL® CISPLATINE®
Ethylène-imines	Thiotépa	THIOTEPA®

* Les agents intercalants (tableau III)

Ces molécules sont capables de s'immiscer entre deux paires de bases contiguës de l'ADN provoquant ainsi une inhibition des synthèses de l'ADN, de l'ARN et des protéines tumorales.

Tableau III : les agents intercalants

<u>Classe</u>	<u>D.C.I.</u>	<u>Spécialité</u>
Anthracyclines	Epirubicine	FARMORUBICINE®
	Doxorubicine	ADRIBLASTINE®
	Pirarubicine	DOXORUBICINE® THEPRUBICINE®
Anthracènediones	Mitoxantrone	NOVANTRONE®
Ellipticines	Elliptinium Acétate	CELIPTIUM®

* Les agents agissant sur le fuseau (Tableau IV)

Deux familles thérapeutiques sont concernées par ce mode d'action : les alcaloïdes de la pervenche (ou vinca-alcaloïdes) et les taxoïdes. En se fixant à la tubuline et en bloquant les cellules en métaphase, ils vont soit favoriser la dépolymérisation du fuseau (alcaloïdes) soit l'inhiber (taxoïdes).

Tableau IV : les agents agissant sur le fuseau

<u>Classe</u>	<u>D.C.I.</u>	<u>Spécialité</u>
Alcaloïdes de la pervenche (poisons du fuseau)	Vinorelbine	NAVELBINE®
	Vindésine	ELDISINE®
	Vincristine	ONCOVIN® VINCRISTINE®
	Vinblastine	VELBE®
		VINBLASTINE®
Taxoïdes (Stabilisants du fuseau)	Docétaxel	TAXOTERE®
	Paclitaxel	TAXOL®

Ces produits sont très réactifs et sont utilisés en général en dernier ressort chez la patiente résistant à la chimiothérapie traditionnelle.

- Les effets indésirables de la chimiothérapie

Les effets indésirables de la chimiothérapie anticancéreuse sont aujourd'hui bien connus. Ils sont graves et nombreux.

Nous ne ferons ici que les citer :

- * nausées, vomissements (ce problème est désormais contrôlé par l'administration d'antiémétiques puissants et efficaces),
- * diarrhées,
- * hépatotoxicité,
- * mucite,
- * alopecie,
- * myélotoxicité,
- * aménorrhée,
- * agranulocytose,
- * prise de poids,
- * asthénie,
- * cardiotoxicité.....

1.5.2.2. L'hormonothérapie

La première forme d'hormonothérapie est apparue il y a un siècle lorsque l'ovariectomie a été pratiquée pour traiter un cancer du sein métastatique. Face à des résultats encourageants, d'autres manipulations hormonales ont été pratiquées. Ainsi, la surrénalectomie et l'hypophysectomie sont apparues au début des années 50.

De nos jours, grâce à une meilleure connaissance des mécanismes tumoraux et hormonaux, l'hormonothérapie est le traitement de référence pour les cancers du sein dits hormonosensibles.

Chez la femme postménopausée, environ deux tiers des cancers sont sensibles aux hormones car les cellules cancéreuses possèdent des récepteurs aux estrogènes (RE+) et à la progestérone (RP+). Chez les patientes présentant ces deux types de récepteurs, le taux de réponse initiale à l'hormonothérapie de première intention peut atteindre 78%.

Contrairement à la chimiothérapie anticancéreuse, l'hormonothérapie n'est pas cytotoxique, elle est donc mieux tolérée (Gourinel, 1996). Actuellement, quatre classes thérapeutiques différentes sont utilisées :

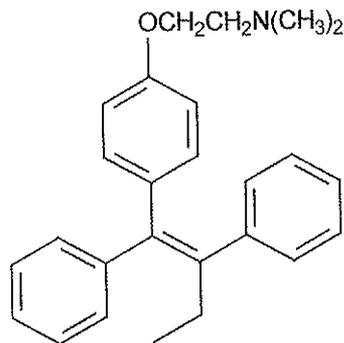
- Les anti-estrogènes

Dans les cancers du sein hormonodépendants, la prolifération des cellules tumorales est influencée par les estrogènes. Environ 72% des femmes atteintes par un cancer du sein hormonodépendant ont des tumeurs contenant des récepteurs aux estrogènes.

Les estrogènes pénètrent par diffusion passive à l'intérieur des cellules cancéreuses et se lient aux récepteurs nucléaires spécifiques. La liaison estrogène-récepteur provoque une réaction en chaîne qui aboutira à une activation de la croissance des cellules cancéreuses (Gourinel, 1996).

Les anti-estrogènes sont représentés par le *torémifène* (FARESTON®) mais, principalement par le *tamoxifène* commercialisé sous le nom de TAMOXIFENE BAYER®, TAMOFENE®, NOLVADEX®, KESSAR®, ONCOTAM®. Il fut pendant longtemps la référence incontestée en hormonothérapie, mais il tend aujourd'hui à être supplanté par de nouvelles molécules. Il constitue tout de même le traitement de première ligne du cancer mammaire au stade précoce ou avancé chez la femme ménopausée et il est utilisé de plus en plus comme traitement adjuvant dans la mesure où il prolonge la survie sans rechute.

C'est un dérivé synthétique non stéroïdien, de nature triphényléthylénique dont la structure est présentée ci-dessous.



Il agit par inhibition sélective de la liaison entre les estrogènes endogènes et les récepteurs estrogéniques par un phénomène de compétition. Cependant, il ne modifie pas le taux d'estrogènes circulants. Il en résulte un blocage de la prolifération des cellules malignes et une régression du volume tumoral.

Le tamoxifène, dont la posologie est de 20 mg par jour, est généralement bien toléré et très efficace. Mais, comme avec les autres anti-estrogènes, de nombreux cancers peuvent secondairement progresser ou récidiver. Des résistances peuvent se développer mais le tamoxifène n'induit pas de résistances croisées aux différentes classes de traitements hormonaux.

Le tamoxifène est donc une molécule complexe à double facette :

- une facette antagoniste c'est à dire antiestrogénique, qui est le support de l'action oncostatique,
- une facette agoniste provoquant des actions de type estrogénique, responsable d'effets bénéfiques, comme l'amélioration de la densité osseuse mais aussi d'effets néfastes (Namer, 2000). En effet, il faut savoir que le tamoxifène possède un effet estrogénique sur plusieurs tissus, ce qui explique un risque élevé d'apparition de cancer de l'endomètre. Les femmes sous traitement devront donc subir une surveillance gynécologique attentive.

Il faut ajouter que des effets indésirables variés et nombreux peuvent survenir chez toutes les femmes. Nous ne citerons ici que les principaux : augmentation des anomalies endométriales, augmentation du nombre des accidents thromboemboliques, survenue de troubles visuels, de saignements utérins, bouffées de chaleur, éruptions cutanées, alopecie, aménorrhée, thrombocytopenie, altération de la fonction hépatique.

- Les progestatifs

L'acétate de mégestrol, commercialisé sous le nom de MEGACE® et l'acétate de médroxyprogestérone, commercialisé sous le nom de FARLUTAL® et de DEPOPRODASONE® sont les deux progestatifs les plus prescrits. Mais ils ne sont que rarement utilisés dans le traitement du cancer du sein.

Ils ont une action antiestrogène et antiandrogène qui est exploitée dans le traitement du cancer du sein. Ils agissent essentiellement par blocage hypophysaire en exerçant un rétrocontrôle négatif sur la libération des gonadotrophines (FSH, LH).

Si les progestatifs, à faible posologie, n'ont aucune toxicité, ils ont l'inconvénient d'entraîner à fortes doses des effets très indésirables comme la prise de poids, des sueurs, une hypertension artérielle, des thrombophlébites, des crampes musculaires, une hyperglycémie, un prurit, une aménorrhée.

- Les agonistes de la LH-RH

Ils entraînent une castration chimique. En effet, le maintien d'un taux élevé de LH-RH provoque la suppression de la synthèse d'estradiol. On s'est aperçu que leur association avec le tamoxifène ou l'aminoglutéthimide (inhibiteur de l'aromatase) renforçait leur action aussi bien en situation métastatique qu'en situation adjuvante. Ils sont utilisés dans le traitement des formes métastatiques évolutives du cancer du sein.

Ils sont sur le marché sous le nom de ENANTONE® (D.C.I. : leuproréline) et ZOLADEX® (D.C.I. : goséréline).

- Les inhibiteurs de l'aromatase

Les inhibiteurs de l'aromatase ont fait l'objet de nombreuses recherches au cours de ces dernières années. Ils ont montré un réel intérêt thérapeutique dans le traitement du cancer du sein hormonodépendant de la femme postménopausée. Certaines molécules, comme l'anastrozole ont même tendance à supplanter le tamoxifène au rang de traitement de première ligne du cancer. Il nous paraît donc nécessaire de développer cette classe thérapeutique dans le chapitre suivant.

1.6. Les inhibiteurs de l'aromatase

1.6.1. L'aromatase

L'aromatase est une protéine héminique correspondant à un complexe enzymatique faisant partie du groupe des enzymes du cytochrome P-450. Elle est composée de la cytochrome P-450 aromatisation (responsable du mécanisme de l'aromatation) et de la cytochrome P-450 NADPH réductase (donneur d'électrons). Ces deux protéines sont localisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Auvray, 2000).

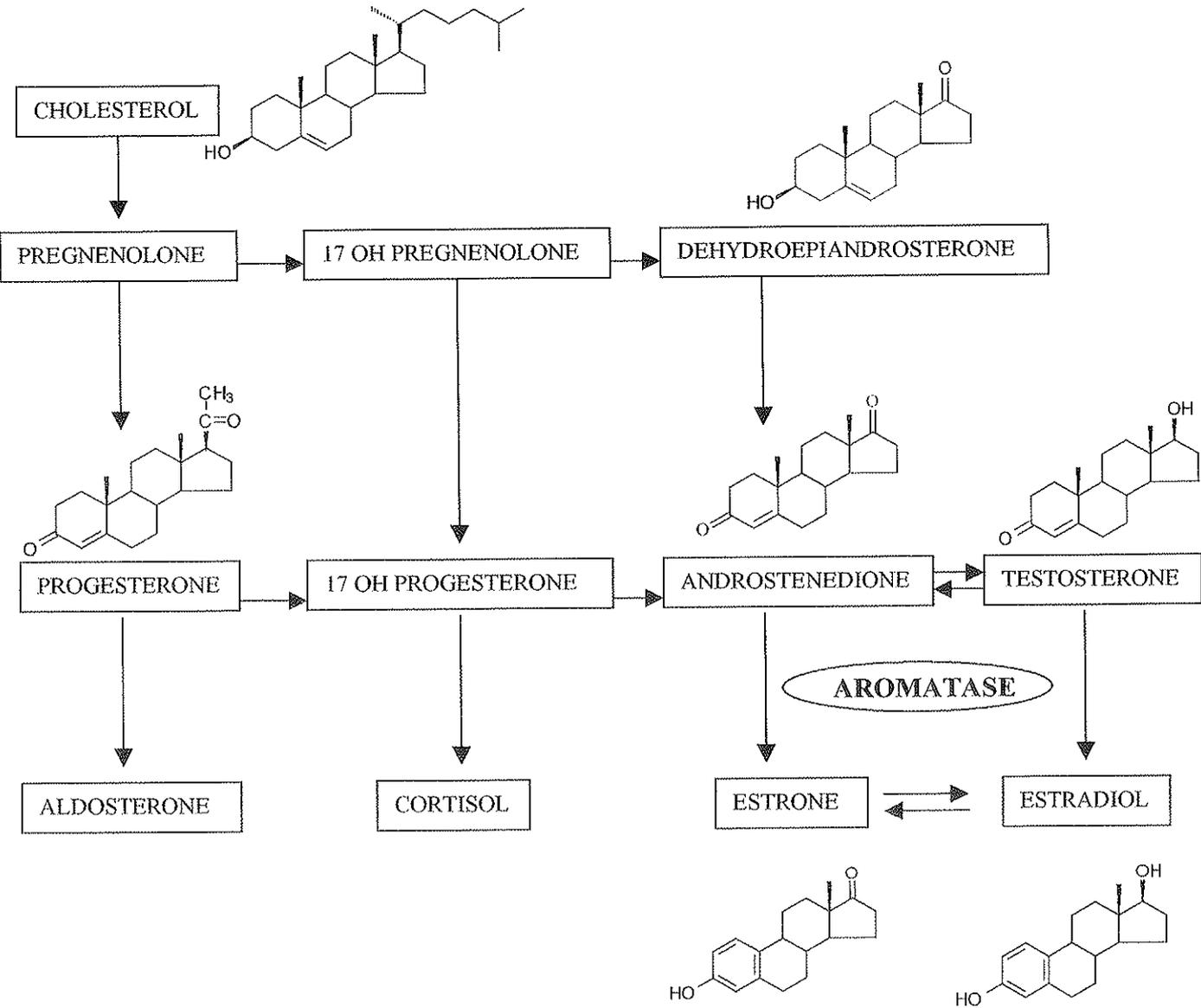
L'aromatase se trouve dans le placenta et les ovaires, dans certains tissus périphériques comme le muscle, la graisse et le foie, mais aussi dans la tumeur mammaire elle-même.

1.6.2. La biosynthèse des estrogènes

La biosynthèse des estrogènes a une importance physiopathologique considérable du fait de son implication dans le cancer du sein. Chez la femme ménopausée, les estrogènes (estrone et estradiol), habituellement synthétisés par les ovaires ne sont plus sécrétés. Or, il est clairement établi que des taux élevés

d'estrone et d'estradiol sont retrouvés dans les tumeurs du sein de patientes ménopausées alors que l'activité ovarienne a totalement cessé (De Crémoux, 2000). En effet, les surrénales produisent de la déhydroépiandrostérone (et son sulfate) et de l'androstènedione, qui seront converties en estrogènes par aromatisation, dans les tissus de soutien (tissu adipeux périphérique, muscles, foie et cerveau). L'aromatisation qui est donc la transformation des androgènes surrénaliens en estrogènes, constitue la source principale des estrogènes de la femme ménopausée.

Schéma 1 : biosynthèse des estrogènes par aromatisation (Astra Zeneca, 2000)



Lors de la transformation des androgènes (androst-4-ène-3,17-dione et testostérone) en estrogènes (estrone et estradiol) par l'aromatase placentaire humaine, il a été démontré que trois molécules d'oxygène et six équivalents de NADPH sont consommés (Debaert, 1995). Nous ne développerons pas ici les étapes de cette transformation qui est très complexe.

Les inhibiteurs de l'aromatase, en inhibant cette enzyme, limitent donc la production de ces estrogènes. Ceci aboutit à une diminution du taux d'estrogènes circulants. Les anti-aromatases sont donc des drogues qui neutralisent la fonction du complexe enzymatique soit au niveau de l'enzyme, soit au niveau du cytochrome P-450.

1.6.3. Classification

Les médicaments anti-aromatasiques ont été développés principalement pour supprimer l'activité enzymatique de l'aromatase chez la femme ménopausée atteinte d'un cancer du sein hormonodépendant.

Le premier inhibiteur de l'aromatase utilisé en thérapeutique est l'aminoglutéthimide. L'inconvénient majeur de ce produit est son manque de sélectivité. Nous le détaillerons ultérieurement.

Depuis une dizaine d'années, la classe des inhibiteurs s'est considérablement enrichie. De nouvelles molécules plus sélectives et présentant moins d'effets secondaires ont été mises au point. Ce sont les inhibiteurs de nouvelle génération.

Un assez grand nombre de produits a été sélectionné à partir de leur activité sur l'aromatase placentaire, conforté par des études de relation structure-activité. Ils peuvent être classés d'après leurs modalités d'interaction avec l'enzyme, en fonction de leur structure chimique et de leur mécanisme d'action (Feutrie, 1999) :

- Les inhibiteurs de type I : ce sont des inhibiteurs stéroïdiens. Ce sont des inhibiteurs agissant de façon compétitive sur le site de fixation de l'enzyme. Il ont une analogie de structure avec l'androstènedione. Ils se fixent spécifiquement sur le site catalytique de l'enzyme à la place de l'androstènedione et forment directement ou indirectement une liaison covalente avec différents sites de l'enzyme. Ils bloquent ainsi l'activité de l'aromatase de manière irréversible. L'enzyme est alors définitivement inactivée. On les appelle de ce fait « inhibiteurs suicides » ou « inactivateurs de l'aromatase ». Deux principales molécules font partie de cette classe : le formestane et l'exémestane, que nous développerons par la suite.

- Les inhibiteurs de type II : ce sont des inhibiteurs non stéroïdiens. Ils ont comme caractéristique d'interférer avec l'hydroxylation des hormones stéroïdiennes par liaison avec le fer du radical hème de l'aromatase. Ils inhibent de façon réversible l'enzyme (De Crémoux, 2000).

Deux produits sont disponibles sur le marché : l'anastrozole et le létrozole. Ce sont des dérivés azolés, ils sont très spécifiques de l'aromatase.

Il a tout de suite été évident que ces nouveaux inhibiteurs de l'aromatase allaient être plus efficaces que l'aminoglutéthimide. Leur action antiaromatase est plus importante et ils sont mieux tolérés.

Tableau V : récapitulatif des inhibiteurs de l'aromatase (De Crémoux, 2000)

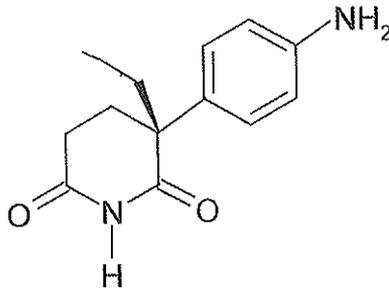
Inhibiteurs de type I, structure stéroïdienne	Inhibiteurs de type II, structure non stéroïdienne
Formestane (LENTARON®) Exémestane (AROMASINE®)	Aminoglutéthimide (ORIMETENE®) Anastrozole (ARIMIDEX®) Létrozole (FEMARA®) Fadrozole Vorozole

Nous allons à présent développer les propriétés de ces molécules afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action.

1.6.4. Propriétés des différentes molécules. (Debaert, 1995)

1.6.4.1. L'aminoglutéthimide

Il s'agit de la (RS)-3-(4-aminophényl)-3-éthylpipéridine-2,6-dione.



L'aminoglutéthimide fut le premier inhibiteur de l'aromatase non stéroïdien proposé dans le traitement du cancer du sein métastasé hormono-dépendant (possédant de préférence des RE+), chez la femme ménopausée.

C'est en premier lieu un anticonvulsivant. Il est commercialisé sous le nom de ORIMETENE[®], il est administré par voie orale.

L'aminoglutéthimide est un inhibiteur réversible non spécifique de l'aromatase. Il faut noter que l'énantiomère R(+) serait trois fois plus actif que le racémique et dix fois plus actif que l'isomère S. Il semblerait que seul le groupement aminé aromatique puisse établir une liaison avec le groupement héminique de l'aromatase.

L'aminoglutéthimide inhibe l'aromatase de façon efficace, les taux d'estrogènes plasmatiques chez les femmes ménopausées chutent à un niveau indétectable alors que le niveau d'androstènedione ne diminue pas (De Crémoux, 2000). La posologie usuelle varie de 500 à 1000 mg par jour, répartis en 3 ou 4 prises.

L'inconvénient majeur de cette molécule est son manque de spécificité. En effet, en plus d'inhiber l'aromatase, elle inhibe aussi plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse dépendantes du cytochrome P450 telles que la 20,22-desmolase et la 17,20-lyase, empêchant ainsi la transformation du cholestérol en pregnénolone.

L'aminoglutéthimide inhibe également la 11 β -hydroxylase et la 18-hydroxylase, bloquant ainsi les synthèses du cortisol et de l'aldostérone. Cette action est responsable de la baisse de sécrétion du cortisol. Elle entraîne donc une insuffisance surrénalienne qui oblige la patiente à prendre, en parallèle, une corticothérapie.

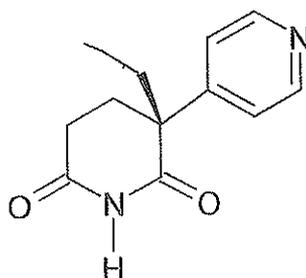
On peut ajouter qu'elle inhibe la synthèse d'hormones thyroïdiennes, mais la plupart des patientes compensent de façon adaptée par l'élévation de la TSH.

Enfin, l'aminoglutéthimide est un inducteur enzymatique. Cette propriété affecte son propre métabolisme et entraîne une diminution de sa demi-vie ainsi que la diminution de la demi-vie des différents médicaments associés dont la posologie devra être adaptée.

Outre ces effets indésirables majeurs, l'aminoglutéthimide provoque d'autres effets de moindre importance comme : la somnolence et l'ataxie, l'hypotension orthostatique, des vertiges, des troubles digestifs, des troubles hématologiques, une augmentation des gamma-GT et parfois du cholestérol plasmatique, des éruptions cutanées. Une surveillance médicale rapprochée devra être effectuée.

1.6.4.2. Le roglétimide

C'est la 3-éthyl-3-(4-pyridyl)pipéridine-2,6-dione. Il est plus couramment appelé pyridoglutéthimide. Il possède un groupement 4-pyridinyle dont l'azote constitue le site de fixation sur le groupement hémique de l'enzyme.

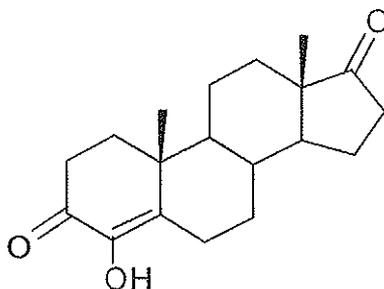


Il faut noter que son activité inhibitrice est inférieure à celle de l'aminoglutéthimide. Cependant, il n'inhiberait les 11 β - et 18-hydroxylases qu'à des concentrations élevées, et ne modifierait pas les concentrations de cortisol, d'aldostérone, de LH, de FSH, de prolactine, de SHBG et de TSH.

Les effets secondaires sont essentiellement des nausées et des léthargies. Il faut également noter que le roglétimide est un inducteur enzymatique. Mais son manque de spécificité réduit considérablement son intérêt thérapeutique, il n'est actuellement plus développé.

1.6.4.3. Le formestane (ou CGP 32349)

Il s'agit de la 4-hydroxyandrost-4-ène-3,17-dione, inhibiteur compétitif de l'aromatase qui agit comme un substrat suicide irréversible.



Le formestane se lie à l'aromatase, mais il n'est pas transformé par celle-ci. Il empêche la conversion ultérieure des androgènes en estrogènes. Il est actuellement commercialisé sous le nom de LENTARON[®], administrable par voie intramusculaire profonde. La posologie usuelle est de 250 mg tous les 15 jours.

Il provoque une diminution du taux d'estradiol circulant de l'ordre de 80%, 24 heures après l'injection et une diminution importante d'estrone, en particulier au niveau des cellules tumorales estrogéno-dépendantes. Il est, *in vitro*, 60 fois plus inhibiteur que l'aminoglutéthimide (cf tableau VI).

Le formestane provoque une bonne réponse des métastases des tissus mous, tandis que les métastases viscérales, en particulier du foie, répondent mal.

Bien que le formestane soit en général bien toléré, une administration prolongée provoquerait l'apparition d'abcès stériles, de douleur, d'inflammation et d'induration, notamment au point d'injection.

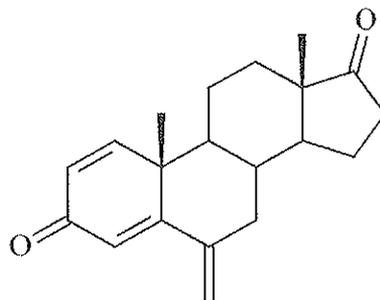
Le formestane est une molécule spécifique. En effet, il n'a été constaté aucun effet sur les taux plasmatiques de stéroïdes, de LH, de FSH, de SHBG et de TSH.

Les effets indésirables sont relativement peu fréquents et peu importants : léthargie, rashes cutanés, bouffées vasomotrices, saignements vaginaux, nausées, vertiges, arthralgies.

Sa voie d'administration constitue certainement une limite à son utilisation d'autant plus que les nouveaux anti-aromatases présentent la même sélectivité mais sont administrés par voie orale (Kerbrat, 2000).

1.6.4.4. L'exémestane (ou FCE 24304)

C'est la 6-méthylène-androsta-1,4-diène-3,17-dione. L'exémestane, commercialisé sous le nom d'AROMASINE[®], est le seul inhibiteur stéroïdien actuellement sur le marché pouvant être administré par voie orale. Il entraîne une inactivation de l'aromatase par liaison irréversible sur le site de fixation du substrat : c'est un inhibiteur suicide.



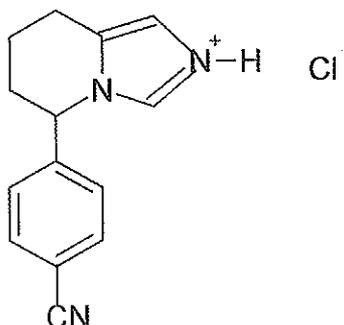
A la posologie quotidienne de 25 mg, il provoque une diminution des taux plasmatiques d'estrone et d'estradiol de l'ordre de 85 à 95% sans qu'aucun effet endocrinien ne soit observé. A doses répétées, l'exémestane entraîne une

inactivation de 98% de l'aromatase périphérique (De Crémoux, 2000).

L'exémestane a un faible effet androgénique essentiellement lié à sa faible affinité pour le récepteur aux androgènes. Les effets secondaires sont ceux habituellement rencontrés (nausées, bouffées de chaleur, insomnies, dépression, oedèmes périphériques, sueurs, céphalées).

1.6.4.5. Le fadrozole (ou CGS 16949)

C'est le chlorhydrate de 4-(5,6,7,8-tétrahydroimidazo-(1,5a)-pyridin-5-yl)-benzonitrile. C'est un anti-aromatase non stéroïdien entraînant une diminution significative de l'estrone et de l'estradiol : 2 à 4 mg de fadrozole abaissent les taux d'estrogènes plasmatiques à des niveaux indétectables (De Crémoux, 2000). Notons que le racémique est deux cent fois plus puissant que l'aminoglutéthimide (cf tableau VI).

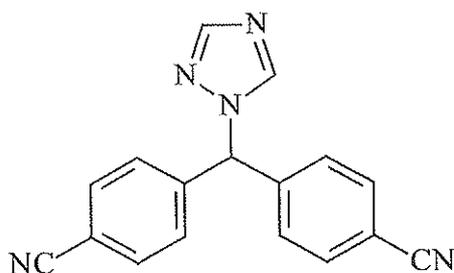


Mais bien qu'il soit très actif, le fadrozole manque de spécificité. Il diminue le taux d'aldostérone avec modification de la balance électrolytique. Il diminue également la synthèse du cortisol et inhibe la corticostérone-méthylxylase de type II qui intervient dans la synthèse de l'aldostérone. Les effets secondaires sont : nausées, flush, asthénie, anorexie.

En raison de son manque de spécificité, le fadrozole n'est aujourd'hui plus développé.

1.6.4.6. Le létrozole (ou CGS 20267)

C'est le 4,4'-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylméthylène)-bisbenzonnitrile. Le létrozole est un puissant inhibiteur de l'aromatase à structure non stéroïdienne, commercialisé sous le nom de FEMARA® et administré par voie orale. La posologie usuelle est de 2,5 mg par jour. Il inhibe l'aromatase périphérique à 98%. Il est 200 fois plus actif que l'aminoglutéthimide (cf tableau VI).



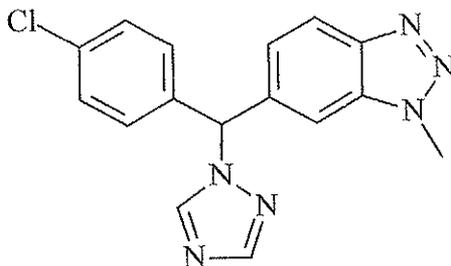
En moins de 24 heures après la prise, les concentrations plasmatiques d'estrone et d'estradiol sont à la limite de la détection (la diminution des taux est d'environ 95%). L'activité du létrozole est dose-dépendante (Kerbrat, 2000).

C'est une molécule très spécifique car aucun effet n'est observé sur les concentrations plasmatiques de LH, de FSH, de SHBG, de TSH, de cortisol et d'aldostérone. De plus, on constate une durée de survie significativement plus longue et une tolérance améliorée lors d'un traitement par létrozole. La plupart des effets indésirables sont des céphalées, des nausées, des douleurs ostéo-musculaires, des bouffées de chaleur, des oedèmes périphériques, de la fatigue, une prise de poids, des éruptions cutanées. Leur incidence est faible.

Le létrozole a obtenu son A.M.M. pour le traitement en première intention car une étude clinique montre qu'il prolonge le délai de progression du cancer du sein par rapport au tamoxifène.

1.6.4.7. Le vorozole (ou R 76713)

C'est le 6-[(4-chlorophényl)(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl)méthyl]-1*H*-benzotriazole. C'est un puissant inhibiteur de l'aromatase, il est mille fois plus inhibiteur que l'aminoglutéthimide et trente fois plus actif que le formestane (cf tableau VI).

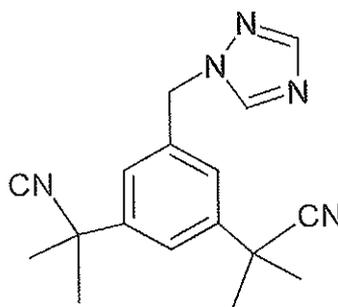


En moins d'un mois de traitement, les taux d'estrone et d'estradiol sont à la limite du détectable. Aux posologies thérapeutiques, il n'a été constaté aucun changement des taux de cortisol, d'aldostérone, de testostérone, d'androstènedione, de FSH et de LH. Le traitement est en général bien toléré, malgré des bouffées vasomotrices et des arthralgies essentiellement (Kerbrat, 2000).

Le vorozole montre un bénéfice clinique et une qualité de vie bien améliorée. Il n'est cependant pas commercialisé en France et son développement n'est plus envisagé.

1.6.4.8.L'anastrozole (ou ICI D 1033)

C'est le 2,2'-[5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ylméthyl)-1,3-phénylène]bis-(2-méthyl) propionitrile. L'anastrozole est commercialisé sous le nom d'ARIMIDEX[®], administré par voie orale. C'est un anti-aromatase non stéroïdien.



Il est plus actif que l'aminoglutéthimide, le formestane et le fadrozole. Il inhibe l'activité de l'aromatase périphérique à plus de 96%. Une posologie faible (1 mg) entraîne une activité anti-aromatase maximale et une diminution importante des estrogènes circulants (supérieure à 90%).

L'anastrozole est une molécule très spécifique : aucun effet n'est observé sur les autres enzymes de la stéroïdogénèse, ni sur la sécrétion des gluco- et minéralocorticoïdes. Aucun effet secondaire sévère n'est rapporté jusqu'à présent ; les plus fréquents sont des troubles digestifs et des bouffées de chaleur.

Récemment, l'anastrozole vient de recevoir son A.M.M. pour le traitement en première intention du cancer du sein hormonodépendant métastasé de la femme ménopausée.

Tableau VI : puissance relative des inhibiteurs d'aromatase déterminée *in vitro* sur les microsomes placentaires (De Crémoux, 2000)

Aminoglutéthimide	1
Formestane	60
Exémestane	60
Létrozole	200
Anastrozole	200
Fadrozole	380
Vorozole	1000

Les inhibiteurs de l'aromatase de nouvelle génération sont manifestement un progrès dans l'hormonothérapie des cancers du sein hormonodépendants. Ils ont démontré leur supériorité thérapeutique surtout par rapport à l'aminoglutéthimide, pour les patientes résistantes au tamoxifène, avec une remarquable tolérance. Ils sont en train de bousculer la prééminence du tamoxifène en situation préadjuvante et dans le cadre de la première ligne thérapeutique des patientes métastatiques (Namer, 2000).

Notons également que l'absence de résistances croisées entre les inhibiteurs de l'aromatase stéroïdiens et non stéroïdiens permet d'envisager une nouvelle ligne thérapeutique très utile et d'espérer une survie des patientes supérieure à celle d'aujourd'hui.

1.6.5. Les inhibiteurs naturels

Outre ces molécules synthétiques, il existe des molécules naturelles qui présentent également des propriétés inhibitrices de l'aromatase. Parmi ces molécules, on trouve les flavonoïdes et les lignanes qui sont des composés très répandus dans le règne végétal et qui sont présents en quantités non négligeables dans l'alimentation.

L'inhibition de l'activité aromatasique par les flavonoïdes suggère que la consommation de ces composés contribue à la réduction de pathologies estrogéno-dépendantes comme le cancer du sein (Wang, 1994). C'est pourquoi notre étude s'intéresse à cette classe de molécules.

2. LES FLAVONOÏDES

2.1. Généralités

Les flavonoïdes sont des molécules qui existent de façon naturelle chez pratiquement tous les végétaux. Ils sont directement responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, mais aussi indirectement par leur rôle de co-pigments. Ils ont également un rôle de protection des tissus (cuticule foliaire et cellules épidermiques des feuilles) contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets (Bruneton, 1999).

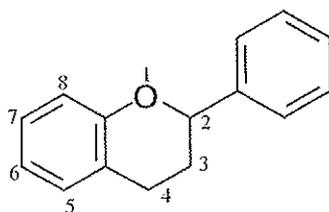
2.1.1. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont présents, à plus ou moins grandes concentrations, dans la quasi-totalité du règne végétal. La distribution et la nature chimique des flavonoïdes varient nettement en fonction de la famille botanique et en fonction de l'organe qui les contient (bois, feuilles, fleurs).

Les formes hétérosidiques et hydrosolubles des flavonoïdes s'accumulent dans les vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques. Quant aux flavonoïdes présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres.

2.1.2. Structure chimique et classification

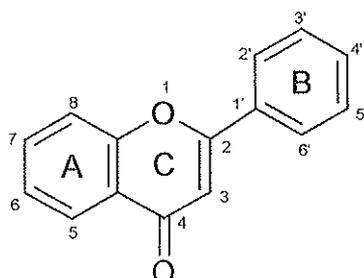
Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et donc possèdent le même élément structural de base : l'enchaînement 2-phénylchromane.



Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux flavones et flavanones. Il nous paraît cependant indispensable de parler également des chalcones qui sont des composés intermédiaires intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes. Nous ne développerons donc que ces trois classes de flavonoïdes. Les flavones et les flavanones possèdent un enchaînement de 2-phénylchromane, les chalcones ont leur cycle pyranique ouvert.

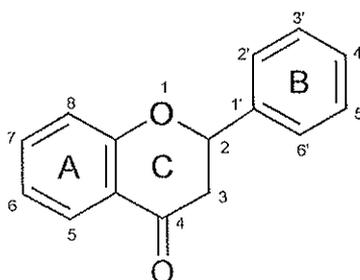
2.1.2.1. Les flavones



A l'état naturel, le cycle A est, dans 90% des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C-5 et en C-7 et le cycle B est substitué dans 80% des cas par un hydroxyle en C-4'. Il peut être 3',4'-disubstitué ou moins fréquemment, 3', 4', 5' -trisubstitué. Les substituants sont majoritairement des groupements hydroxyle (-OH) ou méthoxy (-OCH₃). Les autres positions du cycle B ne sont que rarement substituées.

La distribution de ces flavones et de leurs hétérosides est universelle, mais quelques substitutions sont restreintes à certaines familles.

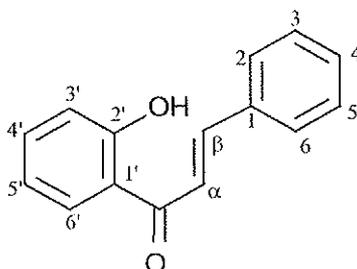
2.1.2.2. Les flavanones



Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3. Elles présentent un centre d'asymétrie en C-2. Elles peuvent alors avoir une configuration 2*S* (le plus souvent) mais aussi une configuration 2*R*.

Elles possèdent les mêmes variations de substitution que leurs homologues insaturés. Elles semblent toutefois moins fréquentes dans le règne végétal que les flavones.

2.1.2.3. Les chalcones

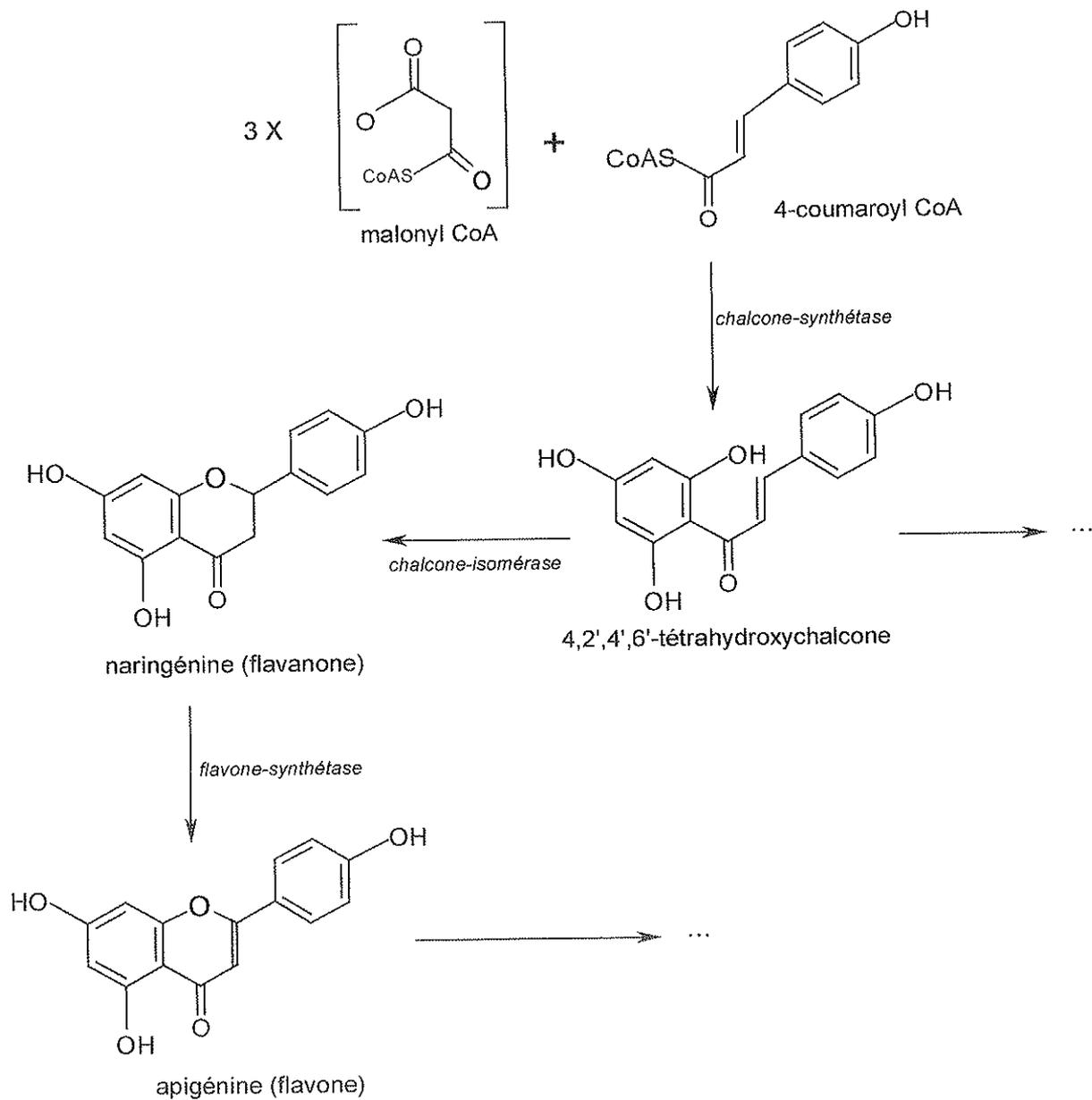


Les chalcones, comme nous l'avons dit précédemment, ont le cycle pyranique ouvert. Ce cycle ouvert devient donc un chaînon tricarboné, cétonique, α,β -insaturé. Les substitutions du noyau A sont identiques à celles des flavones et des flavanones. En revanche, le noyau B est moins fréquemment substitué.

2.1.3. Origine biosynthétique des flavonoïdes

Le mécanisme de la biogénèse est ici très simplifié.

Schéma 2 : biosynthèse des flavonoïdes (Bruneton, 1999)



La biosynthèse des flavonoïdes débute par la condensation de trois molécules de malonyl-CoA et d'un acide hydroxycinnamique, catalysée par une enzyme : la chalcone-synthétase. Le produit de la réaction est une chalcone. Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser spontanément en flavanone racémique. Mais, en présence d'une enzyme : la chalcone isomérase, la fermeture sera stéréospécifique et aboutira à une flavanone 2S. La flavone synthétase introduira une double liaison entre les carbones C-2 et C-3, on obtiendra ainsi une flavone (Bruneton, 1999).

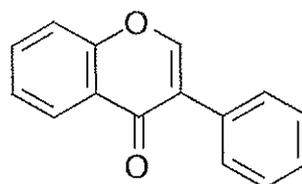
2.1.4. Les flavonoïdes dans l'alimentation

Les flavonoïdes sont présents dans de nombreux végétaux destinés à la consommation humaine, mais ils sont absents des produits d'origine animale (Peterson, 1998).

Les flavanones sont en grandes quantités dans les pois-chiche, le cumin, l'aubépine, la réglisse, la menthe, le sorbier. Mais ce sont les agrumes qui représentent la source majeure de flavanones.

Les flavones ne sont pas très fréquentes dans les fruits et les légumes, on les trouve surtout dans les graines de céréales et les herbes aromatiques. Le persil, le thym et le romarin sont particulièrement riches en flavones. Ces flavones sont responsables de la couleur et du goût de ces plantes. Elles en réduisent l'amertume.

Les isoflavonoïdes sont une classe particulière de flavonoïdes puisqu'ils possèdent un enchaînement 3-phénylchromane.



Ils sont connus pour leur activité estrogénique. Le soja est la principale source d'isoflavonoïdes mais ils sont également présents dans les haricots verts, les pois-cassés et les clous de girofle.

Bien que les flavonoïdes soient des composés relativement stables (résistance à la chaleur et à l'oxydation), la préparation et la cuisson des légumes peuvent entraîner une diminution de la concentration en flavonoïdes (jusqu'à 50% de perte).

L'évaluation de la quantité de flavonoïdes contenue dans un régime alimentaire humain a fait l'objet de plusieurs travaux. Une étude hollandaise, effectuée en 1993, estimait qu'un régime normal et équilibré contenait 23 milligrammes de flavonoïdes par jour, mais seuls les flavones et les flavonols (3-hydroxyflavones) ont été considérés (Hertog, 1993). Une étude plus ancienne, effectuée en 1976 sur cinq classes de flavonoïdes, estimait la quantité de flavonoïdes à 1 gramme par jour. Mais les méthodes d'analyse étaient beaucoup moins précises (Peterson, 1998). Les dernières études ont montré que la quantité de flavonoïdes présents dans un régime alimentaire humain normal et équilibré était comprise entre 7,1 et 40 milligrammes par jour (Rimm, 1996).

2.1.5. Propriétés biologiques

2.1.5.1. Rôle dans la perméabilité capillaire

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être « vasculoprotecteurs et veinotoniques ». Ils sont effectivement capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Cependant, cette propriété, pourtant très utilisée, n'est pas toujours reconnue par le monde médical. En effet, la FDA (Food and Drug Administration) ne leur reconnaît, à ce jour, aucune activité.

Il faut admettre que les différents traités de pharmacologie ne laissent pas de doute quant à la faible importance de leur valeur thérapeutique. Toutefois, les

flavonoïdes font l'objet, particulièrement en France, d'une large prescription, d'un fréquent conseil pharmaceutique et d'une importante automédication dans les pathologies circulatoires mineures. Il faut noter, en outre, que certaines de ces molécules, à posologies élevées, ont fait preuve d'efficacité clinique.

2.1.5.2. Action préventive sur le cancer

De nombreux travaux ont montré que les flavonoïdes pouvaient jouer un rôle bénéfique dans la prévention de certains cancers (Birt, 2001 ; Kuo, 1997). Cet effet protecteur est lié à différentes activités biologiques telles que :

- L'activité anti-radicalaire et anti-oxydante

Les radicaux libres sont des éléments déficitaires d'un électron sur leur orbitale externe. Ce sont donc des éléments très réactifs et très instables qui, en se liant à d'autres molécules, seraient responsables d'altérations et de mutations sur les acides nucléiques, d'initiation et de promotion de processus de cancérisation, ainsi que de dégradations cellulaires importantes (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes auraient une action sur les radicaux libres : ils agiraient sur la réduction de l'acide déhydroascorbique, à l'encontre duquel ils se comporteraient comme des donneurs d'hydrogène, stabilisant ainsi les radicaux libres.

On considère maintenant que les flavonoïdes piègent les radicaux libres, particulièrement s'ils sont formés lors d'une anoxie, lors d'une inflammation ou lors d'autoxydation lipidique. Il semble que l'activité antiradicalaire des flavonoïdes dépend de leur structure.

De très nombreux travaux sont actuellement en cours sur le rôle que peut jouer l'effet anti-radicalaire et antioxydant des flavonoïdes régulièrement apportés par la ration alimentaire. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que cette activité n'est pour l'instant démontrée qu'*in vitro*, ce qui ne laisse en aucun cas préjuger de son activité préventive et thérapeutique *in vivo*.

- L'activité estrogénique et/ou anti estrogénique

Les études ont d'abord concerné les isoflavones telles que la génistéine ou la daidzéine. Ces composés possèdent *in vitro* et *in vivo* des activités estrogéniques mais aussi anti-estrogéniques (Rosenberg Zand, 2000). Ils ont alors été qualifiés de phytoestrogènes et certains auteurs ont suggéré que ces molécules pouvaient être considérées comme des SERM. Toutefois, le rôle joué par ces isoflavonoïdes, vis à vis de cancers hormonodépendants tels que le cancer du sein, n'est pas encore clairement établi. D'autres travaux ont concerné l'évaluation de flavones, de flavanones et de chalcones. Ils montrent que les hydroxyle en position 4' et 7 des flavonoïdes sont équivalents aux hydroxyle en position 3 et 17 de l'estradiol et sont donc responsables de l'activité estrogénique des flavonoïdes. Par contre, lorsque ces groupements hydroxyle sont méthylés, on constate une abolition de l'activité estrogénique (Rosenberg Zand, 2000) voire une activité anti-estrogénique (Le Bail, 1998_a).

- L'activité antiproliférative

Les flavonoïdes possèdent diverses activités biologiques qui peuvent entraîner une inhibition de la croissance des cellules cancéreuses. Ainsi, certaines molécules présentent des propriétés inhibitrices des topoisomérases I et II ou de la protéine kinase C. D'autres entrent en interaction avec la tubuline. Enfin, certains flavonoïdes possèdent une activité cytotoxique.

2.1.5.3. Flavonoïdes et inhibition enzymatique

Comme pour l'activité anti-radicalaire, ces propriétés ne sont démontrées que *in vitro*. Des recherches approfondies sur les flavonoïdes ont montré qu'ils inhibaient certaines enzymes en fonction de leur structure. Ici encore, nous ne nous intéresserons qu'aux flavones, aux flavanones et aux chalcones.

Ces molécules inhibent :

- l'élastase
- la hyaluronidase
- la catéchol-O-méthyltransférase (ce qui provoque une augmentation de la résistance vasculaire)
- la phosphodiesterase de l'AMPc
- l'aldose réductase
- l'aromatase (que nous détaillerons ultérieurement).

2.1.5.4. Autres propriétés

Les flavonoïdes sont reconnus comme ayant une activité anti-inflammatoire. Ils peuvent aussi être anti-allergiques, hépatoprotecteurs, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux, antimutagènes.

L'extrapolation de toutes ces données nécessite tout de même une grande prudence : la biodisponibilité chez l'homme de ces molécules est en général faible. Les activités décrites *in vitro* ne sont que rarement corrélées à des effets *in vivo*. Et, en dehors des cas particuliers, on ne dispose, pour l'instant, d'aucune étude pertinente démontrant un intérêt quelconque en clinique humaine.

Ils sont malgré tout très utilisés dans le domaine capillaro-veineux, résistant aux nombreuses controverses des autorités médicales et au déremboursement par la sécurité sociale. Ils sont essentiellement proposés pour l'insuffisance veinolympatique et dans le traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire (Bruneton, 1999).

2.2. L'activité anti-aromatase des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires et ubiquitaires du règne végétal. Ils sont présents en fortes concentrations dans les fruits et les légumes. Ces flavonoïdes ne sont pas toxiques, et possèdent de nombreuses propriétés biologiques que nous avons énumérées précédemment.

La recherche contre le cancer a établi, depuis de nombreuses années, que l'incidence du cancer du sein est significativement plus basse en Asie qu'en Occident. C'est dans l'analyse de l'alimentation de la population asiatique que les chercheurs ont tenté de trouver une explication à ce phénomène. La différence de régime alimentaire peut changer l'incidence du cancer du sein chez la femme postménopausée (Elia, 1999).

Cette analyse approfondie a montré que certains flavonoïdes, les isoflavonoïdes, sont en quantité importante dans l'alimentation asiatique. Ce sont des phytoestrogènes. Ils sont le plus souvent apportés par les légumes et essentiellement par les éléments dérivés du soja (1 gramme de soja contient 2 milligrammes d'isoflavones).

Les phytoestrogènes ont une analogie de structure et de fonction avec le 17β -estradiol. Ils ont une activité estrogénique sur certains récepteurs et une activité anti-estrogénique sur d'autres récepteurs. Ils auraient également une faible activité anti-aromatase et une activité antiproliférative (Ingram, 1997). Ce sont ces propriétés qui ont fait que certains auteurs incluent les phytoestrogènes dans la famille des SERM (*Selective Estrogen Receptors Modulators*), comme le tamoxifène (Elia, 1999).

Bien que ces phytoestrogènes soient de faibles inhibiteurs de l'aromatase, il a été démontré qu'un régime riche en légumes dans lesquels les phytoestrogènes sont en quantité importante, réduit la conversion de l'androstènedione en estrone ; d'où leur action protectrice et préventive contre le cancer du sein (Adlercreutz, 1995).

Ces informations sont très importantes pour tenter de développer une stratégie de prévention et de traitement du cancer du sein à base de molécules végétales. Ces résultats ont amené les chercheurs à étendre leurs investigations à l'ensemble des flavonoïdes (chalcones, flavones, flavanones).

2.2.1. Relations structure/activité

Certains flavonoïdes semblent jouer un rôle important dans la protection contre le cancer du sein. En plus de leur interaction avec les récepteurs aux estrogènes, ils entreraient en compétition avec les stéroïdes endogènes sur le site actif de l'aromatase (Jeong, 1999 ; Lee, 2001 ; Kellis, 1984). En bloquant ce site actif, ils inhibent ainsi l'activité de l'aromatase et donc inhibent l'aromatase de l'androstènedione en estrone. Cette action aurait pour conséquence de diminuer le taux d'estrogènes chez la femme ménopausée.

La structure biphenolique des flavones et des flavanones les rend particulièrement intéressantes car elle leur permet de passer à travers les membranes cellulaires, d'interagir avec les récepteurs aux estrogènes et avec certaines enzymes comme l'aromatase. Ces molécules possèdent une fonction cétone sur le carbone 4, fonction importante car elle leur confère un effet inhibiteur sur l'aromatase. En effet, c'est elle qui semble interagir avec le fer de l'hème du cytochrome P450 de l'enzyme (Kao, 1998).

Les chalcones, qui sont à l'origine de la biosynthèse de tous les flavonoïdes, n'avaient jamais fait l'objet d'une étude concernant leur effet sur l'aromatase. Aussi, le laboratoire de Biochimie a entrepris une telle étude. Il s'avère qu'elles ont également une action anti-aromatase. Cependant, leur effet inhibiteur a été comparé à celui des flavanones correspondantes et s'est révélé plus faible (Le Bail, 2001).

Les flavones et les flavanones étudiées présentaient majoritairement des hydroxyle et des méthoxy sur les positions 5 et 7 du noyau A et 4' du noyau B. Ce sont en effet des molécules usuellement rencontrées dans la nature.

Ainsi, la chrysin (5,7-dihydroxyflavone) a été largement étudiée ; cette molécule a montré un pouvoir inhibiteur intéressant sur l'aromatase.

Il a été montré que la 5-hydroxyflavone avait une activité inférieure à la flavone, alors que la 7-hydroxyflavone est quatre fois plus active que la chrysin. On peut donc conclure que la substitution par un hydroxyle en position 5 diminue l'activité. En effet, ce groupement formerait une liaison intramoléculaire avec la fonction carbonyle, ce qui diminuerait l'interaction de celle-ci avec le fer de l'hème de l'aromatase (Kao, 1998). En revanche, l'hydroxyle en position 7 semble, lui, essentiel à l'activité anti-aromatase (Le Bail, 1998_b). Il provoque une activité maximale : la 7-hydroxyflavone est par exemple 20 fois plus active que la flavone (Ibrahim, 1990).

La substitution en position 7 par un groupement méthoxy est également responsable d'une activité anti-aromatase. Cependant, l'activité de la 7-méthoxyflavone demeure inférieure à celle de la 7-hydroxyflavone (Le Bail, 1998_b).

Kao *et al.* (1998) ont également mené à bien des études concernant la substitution sur le carbone 6. Les résultats ont montré que la 6-hydroxyflavone était un faible inhibiteur de l'aromatase, ce qui a amené à conclure que la substitution du carbone 6 est défavorable à une liaison avec le site actif de l'aromatase.

L'influence de la substitution du carbone 8 a également été étudiée ; ainsi, la 7,8-dihydroxyflavone s'est révélée moins active que la 7-hydroxyflavone. La présence d'un hydroxyle sur le carbone 8 diminue donc l'activité (Kao, 1998).

Les résultats concernant la galangine (3,5,7-trihydroxyflavone) indiquent que la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 sur la flavone réduit considérablement son affinité pour l'aromatase. En fait, il semblerait que des substitutions en position 3 influencent l'interaction entre la fonction carbonyle et l'hème de l'aromatase (Kao, 1998).

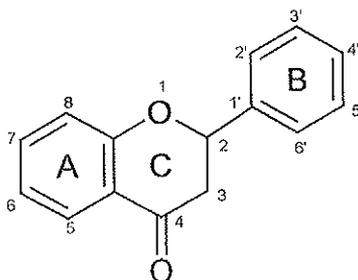
D'un autre côté, la présence d'un hydroxyle en 4' (sur le noyau B) a une faible influence sur l'activité inhibitrice de l'aromatase.

Ainsi l'apigénine (4',5,7-trihydroxyflavone) possède une inhibition similaire voire plus faible que la chrysin (Le Bail, 1998_b).

Des études menées parallèlement sur quelques flavanones ont démontré que celles-ci avaient une activité inférieure aux flavones. En effet, l'apigénine présente une affinité pour l'aromatase supérieure à celle de la naringénine (4',5,7-trihydroxyflavanone) (Le Bail, 1998_b). Cette constatation peut s'expliquer par la conformation spatiale de ces composés.

Ces recherches ont mis en évidence le probable intérêt de ces flavonoïdes dans le traitement du cancer du sein. Elles ont montré l'influence de différents substituants sur le noyau A. Il nous paraît intéressant de rechercher l'influence de tels substituants sur le noyau B.

2.2.2. Stratégie d'étude de l'influence des substituants sur le noyau B des flavanones



Les flavones, qui sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, ont été plus étudiées que les flavanones. Aussi, nous avons entrepris l'étude des propriétés anti-aromatiques de flavanones. Celle-ci s'inscrit dans le cadre des travaux de l'équipe de recherche "Biomolécules et cibles cellulaires tumorales" dirigée par Monsieur le Professeur Chulia.

Les travaux antérieurs ont montré que la substitution de la position 7 du noyau A de ces flavanones influence l'action anti-aromatique. En effet, la présence d'un groupement méthoxy (-OMe) ou d'un groupement hydroxyle (-OH) sur cette position améliore considérablement l'activité. Ainsi, la flavanone possède une

CI₅₀ de 28,5 µM, alors que la 7-méthoxyflavanone a une CI₅₀ égale à 8,0 µM et la 7-hydroxyflavanone, une CI₅₀ de 3,8 µM.

La 7-méthoxyflavanone est considérée comme un chef de file dans notre recherche de composés actifs sur le cancer du sein car elle présente une activité anti-aromatase ainsi qu'un effet antiprolifératif vis-à-vis des cellules cancéreuses mammaires hormono-dépendantes MCF-7 (Pouget, 2001_a) et se trouve dépourvue d'activité estrogénique (Le Bail, 1998_a).

Le deuxième chef de file de notre étude s'avère être la 7-hydroxyflavanone qui présente un effet anti-aromatase supérieur à celle de la 7-méthoxyflavanone mais qui possède en revanche une activité estrogénique (Rosenberg Zand, 2000).

Aussi, notre stratégie d'étude de relation structure-activité consistera :

- d'une part à évaluer l'influence de divers substituants sur le noyau B de la 7-méthoxyflavanone et à sélectionner les substituants les plus actifs,
- d'autre part à évaluer des analogues de la 7-hydroxyflavanone portant sur le noyau B les substituants précédemment sélectionnés.

TRAVAUX PERSONNELS

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Rappels bibliographiques : systèmes et méthodes utilisés

1.1.1. Systèmes biologiques

Dans un premier temps, l'évaluation des inhibiteurs de l'aromatase se fait *in vitro* sur différents systèmes biologiques. Ces études *in vitro* permettent de déterminer les caractéristiques biochimiques de ces inhibiteurs telles que la CI_{50} , le type d'inhibition ou le type de fixation sur le site actif.

Les études sont plus communément effectuées sur des systèmes de microsomes placentaires ou ovariens humains, ces organes étant les plus riches en activité aromatasique (Auvray, 2000). Les microsomes placentaires humains proviennent d'un placenta obtenu après un accouchement à terme. Ils sont isolés, purifiés et conservés à $-80^{\circ}C$ jusqu'à leur utilisation (Ibrahim, 1990 ; Le Bail, 1998_c). Les microsomes ovariens proviennent des ovaires de femmes préménopausées après exérèse chirurgicale (Kellis, 1984).

Le tissu adipeux représente également une source importante d'estrogènes chez la femme post-ménopausée. Cette synthèse d'estrogènes provient de l'aromatase présente dans ces tissus. Les cultures de cellules préadipocytaires représentent donc un autre système biologique utilisé pour tester l'activité anti-aromatasique des flavonoïdes (Campbell, 1993).

L'inhibition de l'aromatase par les flavonoïdes a également été recherchée sur des systèmes ovariens de truite (Pelissero, 1996).

Enfin, il existe un autre modèle *in vitro* : les lignées cellulaires mammaires telles que les cellules MCF-7 transfectées avec le gène de l'aromatase. Cette méthode permet à ces cellules d'exprimer fortement l'aromatase et de diminuer le temps de la réaction (Zhou, 1990).

1.1.2. Les méthodes de mesure

Dans la plupart des travaux, l'activité de l'aromatase est évaluée selon le protocole de Thompson et Siiteri, basé sur la technique de l'eau tritiée relarguée lors de l'aromatation du substrat (Thompson, 1974).

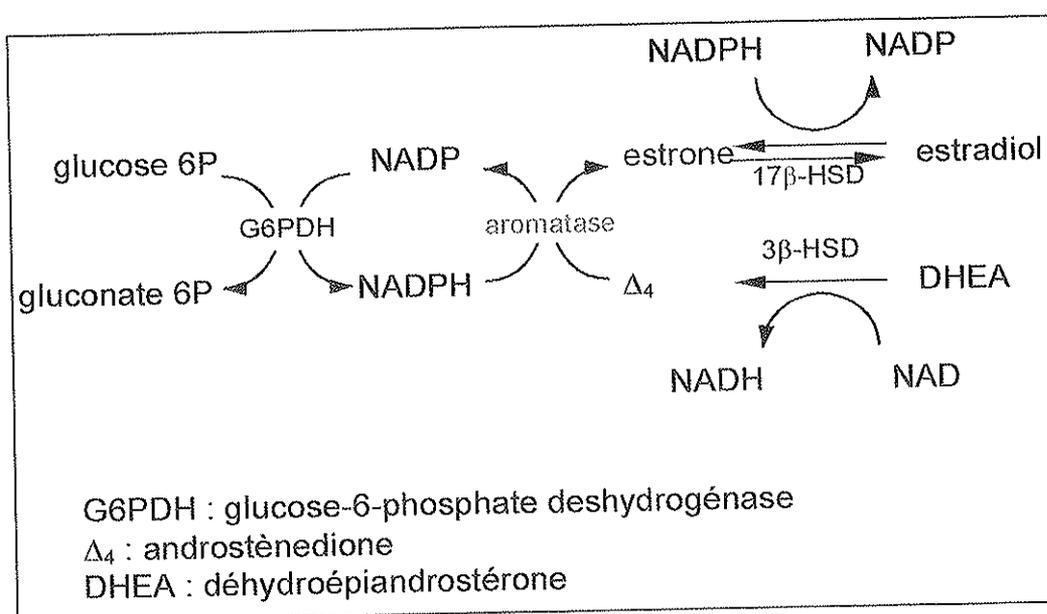
Dans le cadre de nos travaux, effectués au sein du laboratoire de Biochimie de la Faculté de Pharmacie de Limoges, la méthode utilisée est celle développée par J.C. Le Bail dans le cadre de son doctorat (Le Bail, 1998_c). Cette méthode est détaillée dans le chapitre suivant.

1.2. Principe d'étude de l'activité inhibitrice des flavonoïdes sur l'aromatase

1.2.1. Principe

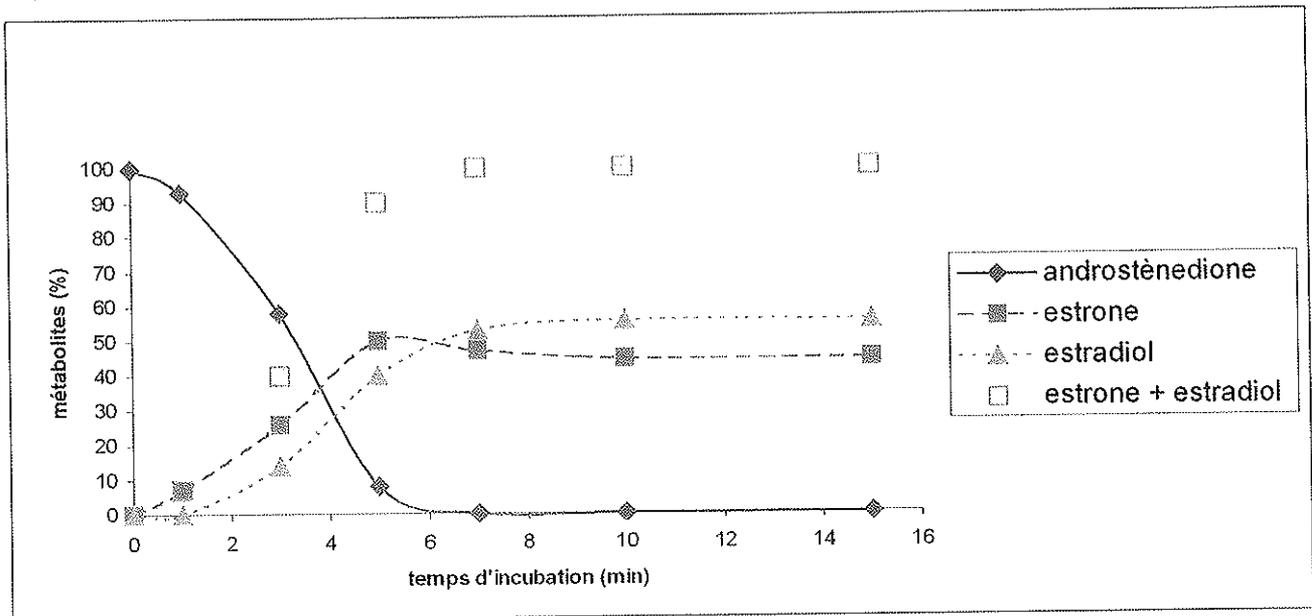
Le principe de mesure de l'activité anti-aromatase des flavonoïdes est présenté ci-après (schéma 3).

Schéma 3 : principe de mesure de l'activité anti-aromatase des flavonoïdes



La cinétique de transformation de l'androstènedione en estrogènes par les microsomes placentaires est illustrée par le schéma 4 (Le Bail, 1998_c).

Schéma 4 : Cinétique de transformation de l'androstènedione en estrogènes par les microsomes placentaires.



On remarque que la transformation de l'androstènedione est complète après 7 minutes d'incubation.

1.2.2. Obtention des microsomes placentaires

La faible quantité d'aromatase présente dans les cellules MCF-7 ainsi que dans la préparation microsomiale de ces cellules a conduit le laboratoire de Biochimie à mettre au point un protocole d'étude d'activité enzymatique à partir de microsomes placentaires. Ces microsomes présentent en effet un équipement enzymatique important (Le Bail, 1998_c).

Dans la cellule, le système du cytochrome P450 est situé dans le réticulum endoplasmique qui, après homogénéisation du tissu et ultracentrifugation, se retrouve dans la fraction dite microsomiale, d'où le terme d'enzymes microsomiales.

1.2.3. Incubation

Les mesures de l'activité inhibitrice de l'aromatase de l'ensemble des flavanones ont été effectuées par nos soins dans le laboratoire de Biochimie.

La réaction est effectuée dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 0,1 M, dithiothréitol 10^{-3} M, pH 7,4) en présence de NADP (0,5 mM), de glucose-6-phosphate (3 mM), du produit à tester à des concentrations variables, de glucose-6-phosphate deshydrogénase (0,1 U/ml) et des microsomes placentaires. Les tubes sont pré-incubés pendant 30 secondes à 37°C puis l'androstènedione radiomarquée (20 nM) est ajoutée. Enfin, les tubes sont incubés sous agitation à 37°C pendant 7 minutes. Les incubations sont arrêtées par addition de méthanol / HCl.

1.2.4. Extraction

Elle s'effectue dans un tube ltrich en ajoutant un mélange acétate d'éthyle 50 / cyclohexane 50. Les tubes sont ensuite vortexés et, après décantation, le surnageant est récupéré et évaporé sous azote à 50°C. Les extraits secs sont repris dans 500 μl d'éthanol ; une nouvelle évaporation est effectuée.

1.2.5. Etude HPLC

Les métabolites issus de l'incubation sont analysés par HPLC en phase normale sur une colonne silice de diamètre 5 μ . Le système chromatographique comporte une pompe Kontron 420 (débit : 1 ml / min). La radioactivité est mesurée par un système Packard FLO-ONE / beta detector Series A-500 avec un débit de liquide scintillant ULTIMA-FLO™ Packard de 1,5 ml / min. Chaque échantillon à analyser est repris dans 50 μl de phase mobile (isooctane 64 / acétate d'éthyle 36).

Les temps de rétention des stéroïdes sont les suivants :

estrone : 5,2 min ; estradiol : 7,5 min ; androstènedione : 15,8 min.

Le pourcentage d'inhibition de l'aromatase correspond au pourcentage de $\Delta 4$ non transformé. Le principe de calcul est le suivant :

Il faut calculer, dans un premier temps la quantité de radioactivité totale engagée dans la réaction au départ. Pour cela, on additionne les surfaces sous courbes d'estrone (E_1), d'estradiol (E_2) et de $\Delta 4$. Or, la $\Delta 4$ utilisée est la $[1,2,6,7-^3\text{H}] \Delta 4$ (87 Ci / mmol), elle comporte quatre hydrogènes radiomarqués. Par conséquent, l'estrone et l'estradiol ne comporteront que deux hydrogènes radiomarqués ($6,7-^3\text{H}$). Ils sont donc deux fois moins marqués que la $\Delta 4$. On multipliera donc les surfaces sous courbes d'estrone et d'estradiol par 2.

$$\text{Radioactivité totale} = [(\text{surface } E_1 + \text{surface } E_2) \times 2] + \text{surface } \Delta 4$$

Donc, le pourcentage de $\Delta 4$ non transformée est calculé de la façon suivante : $(\text{surface } \Delta 4 / \text{radioactivité totale}) \times 100$, qui correspond également au pourcentage d'inhibition de l'aromatase.

Une courbe est alors tracée, exprimant les pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'inhibiteur. La CI_{50} est ensuite déterminée graphiquement.

1.3. Le protocole aromatase

1.3.1. Remarques

L'aromatase est contenue dans les microsomes placentaires. Elle transforme l'androstènedione en estrone et estradiol.

Les premières expérimentations ont été effectuées avec 7 μ l de microsomes préparés en avril 1999, dans le cadre de la thèse de J.C. Le Bail. Lors de ces premières manipulations, l'étude des témoins positifs (en absence de l'inhibiteur) a montré une quantité résiduelle de Δ 4. Cela signifie que les microsomes n'ont pas assuré une transformation complète de la Δ 4 en estrogènes. Il faut donc vérifier si une quantité supérieure de microsomes peut entraîner une aromatisation totale.

Sur des témoins positifs, il a été introduit des quantités variables de microsomes (de 7 à 9 μ l). Même en présence de la plus grande quantité de microsomes, la Δ 4 n'a pas été totalement transformée en estrone et estradiol. On peut donc conclure qu'après un délai d'utilisation voisin d'une année, l'équipement enzymatique des microsomes se dégrade et ne peut pas assurer une transformation complète de l'androstènedione.

Les expérimentations ont été renouvelées avec un lot de microsomes préparés en juin 2000 pour cette série d'évaluations. Il s'est avéré que 6 μ l de microsomes était alors suffisant pour assurer l'aromatisation totale de l'androstènedione. Toutes les autres manipulations ont donc été effectuées avec 6 μ l de microsomes.

1.3.2. Protocole

Produits :

- Solvant d'extraction : cyclohexane 50 / acétate d'éthyle 50
- Méthanol 50 / HCl (1N) 50
- Tampon : KH_2PO_4 0,1 M ; dithiothréitol (DTT) 10^{-3} M ; pH 7,4

Exemple : pour 100 ml de tampon

- 1) 1,36 g de KH_2PO_4
 - 2) 15,4 mg de DTT
 - 3) 90 ml d'eau distillée
 - 4) ajuster le pH à 7,4 par addition de soude 1N
 - 5) compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Glucose-6-phosphate-deshydrogénase : aliquots de 20 μl à 0,1 U/ml, conservés au congélateur à -20°C .

Préparation de l'androstènedione (à conserver en chambre froide) :

- 10 μl de Δ^4 radiomarquée [$1,2,6,7\text{-}^3\text{H}$] Δ^4 (87 Ci / mmol)
- 40 μl de Δ^4 froide à 10^{-4} M
- 150 μl d'éthanol

Préparer extemporanément (à conserver dans la glace pendant la manipulation) :

- solution de NADP : 3,8 mg / ml de tampon
- solution de glucose-6 phosphate : 9,2 mg / ml de tampon
- solution du produit à tester à 10^{-2} M dans l'éthanol
- solution du produit à tester à 10^{-4} M : dilution au 100^{ème} dans le tampon phosphate, de la solution à 10^{-2} M

Gamme de concentrations du produit à tester :

Pour 25 μM : ajouter 2,5 μl de la solution à 10^{-2} M

Pour 10 μM : ajouter 1 μl de la solution à 10^{-2} M

Pour 1 μM : ajouter 10 μl de la solution à 10^{-4} M

Pour 0,5 μM : ajouter 5 μl de la solution à 10^{-4} M

Pour 0,1 μM : ajouter 1 μl de la solution à 10^{-4} M

Manipulation : les tubes à hémolyse sont dans la glace.

Témoin négatif : 780 µl de tampon

100 µl de glucose 6 phosphate

100 µl de NADP

2 µl de glucose-6-phosphate-deshydrogénase

6 µl de microsomes

400 µl de méthanol / HCl

Témoin positif : 780 µl de tampon

100 µl de glucose 6 phosphate

100 µl de NADP

2 µl de glucose-6-phosphate-deshydrogénase

6 µl de microsomes

Gamme : 780 µl de tampon

100 µl de glucose 6 phosphate

100 µl de NADP

2 µl de glucose-6-phosphate-deshydrogénase

6 µl de microsomes

x µl du produit à tester selon la gamme de concentrations

Incubation : pré-incuber sous agitation pendant 30 secondes puis ajouter 2 µl de Δ^4 radiomarquée ; vortex et incubation sous agitation pendant 7 minutes.

Arrêt de l'incubation par 400 µl de méthanol / HCl ; vortex.

Extraction : transférer dans des tubes Ittrich ; ajouter 4,5 ml de cyclohexane / acétate d'éthyle ; vortex.

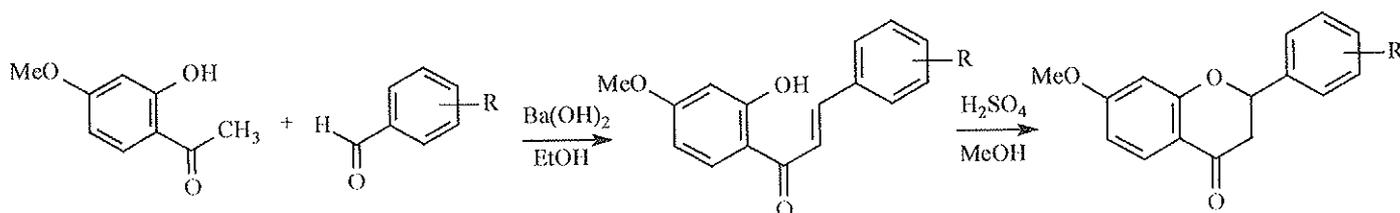
Prélever la phase organique supérieure avec une pipette pasteur et la mettre dans un tube à hémolyse. Évaporer le contenu des tubes sous azote.

Reprendre les résidus par 500 µl d'éthanol et évaporer sous azote.

1.4. Méthode de synthèse des flavonoïdes

Les travaux de synthèse ont été réalisés dans le laboratoire de Pharmacognosie par Mlle C. Pouget dans le cadre de son doctorat de l'Université de Limoges (Pouget, 2001_b). La stratégie de modulation du noyau B des flavanones qui a été retenue, repose sur la condensation de Claisen-Schmidt, réalisée en milieu alcalin et dans l'éthanol à reflux, entre des benzaldéhydes diversement substitués et, soit la 2-hydroxy-4-méthoxyacétophénone pour obtenir des analogues de la 7-méthoxyflavanone, soit la 2,4-dihydroxyacétophénone pour synthétiser des dérivés de la 7-hydroxyflavanone. Cette condensation aboutit à des 2'-hydroxychalcones qui, après traitement en présence d'une solution méthanolique d'acide sulfurique, donnent les flavanones correspondantes.

Schéma 5 : Modulation du noyau B de la 7-méthoxyflavanone.

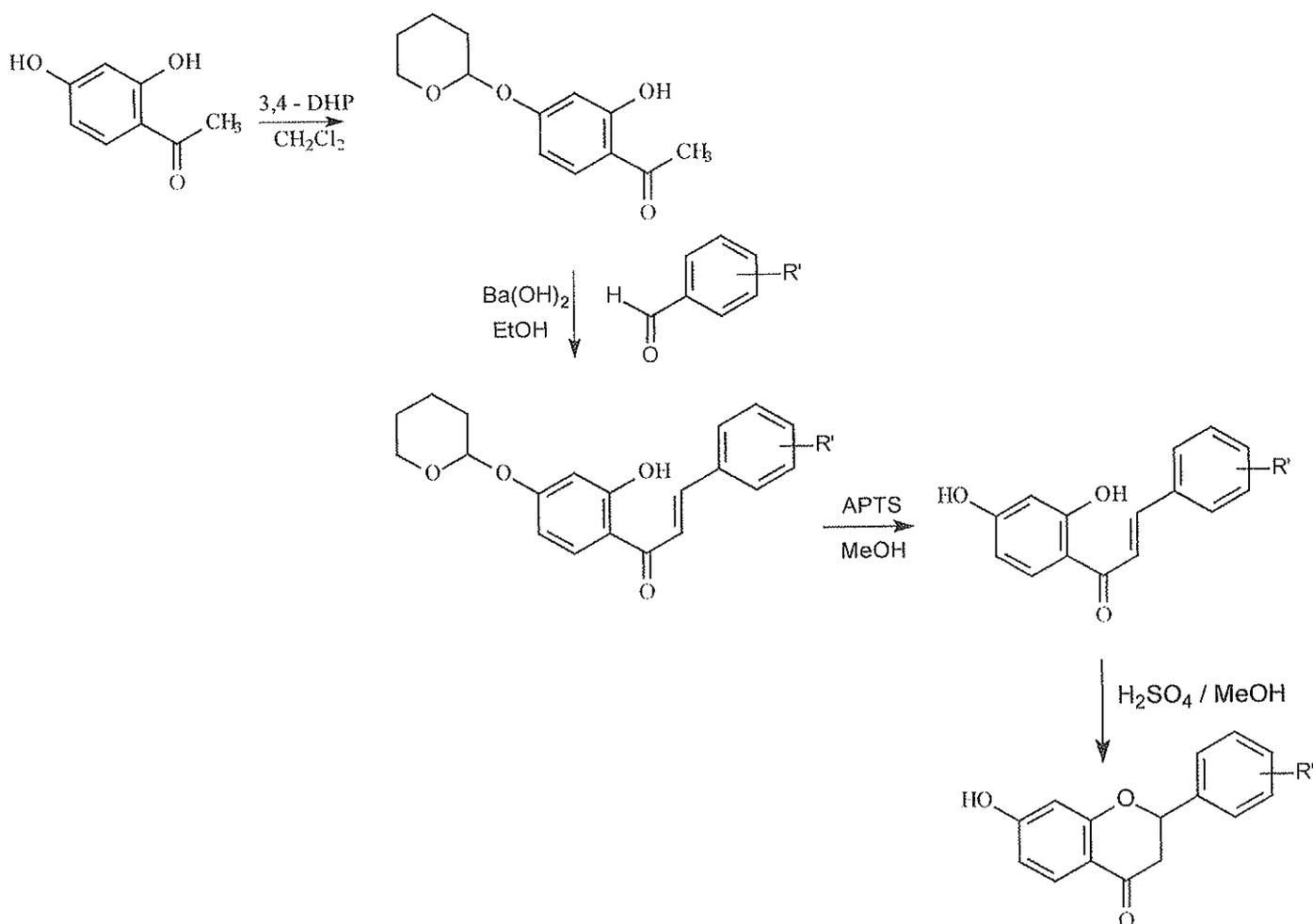


La mise en œuvre de cette stratégie de synthèse a conduit à l'obtention de 23 analogues de la 7-méthoxyflavanone dont la structure est donnée dans le tableau VII ci-après.

L'évaluation biologique de la série des analogues de la 7-méthoxyflavanone a permis de sélectionner les substituants qui influencent favorablement l'activité anti-aromatase. Ces substituants ont alors été introduits sur le squelette de la 7-hydroxyflavanone selon le schéma 6 ci-dessous. Le groupement hydroxyle en 4 de la 2,4-dihydroxyacétophénone subit une étape de protection par le 3,4-dihydro-2H-pyrane (3,4-DHP) en présence de pyridinium *p*-toluènesulfonate (PPTS).

La condensation de la 2-hydroxy-4-(tétrahydropyran-2-yloxy)acétophénone avec les benzaldéhydes permet d'obtenir les chalcones attendues qui sont ensuite déprotégées en présence d'acide *p*-toluènesulfonique. La cyclisation de ces chalcones, effectuée en présence d'une solution méthanolique d'acide sulfurique, aboutit aux flavanones correspondantes. Dans cette série, la synthèse de la 2',7-dihydroxyflavanone (F24) par cyclisation de la 2,2',4'-trihydroxychalcone, molécule disponible dans le commerce, a également été réalisée.

Schéma 6 : Modulation du noyau B de la 7-hydroxyflavanone.



2. RESULTATS ET DISCUSSION

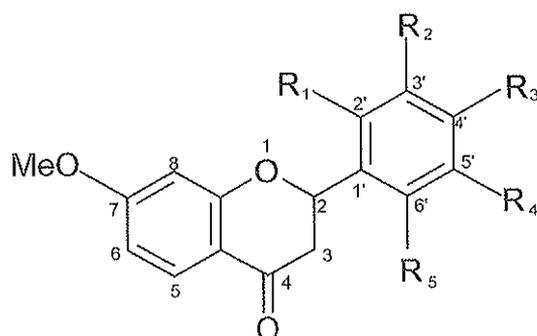
2.1. Modulation du noyau B à partir de la 7-méthoxyflavanone

2.1.1. Présentation des molécules

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la 7-méthoxyflavanone est un chef de file dans la recherche de molécules actives contre le cancer du sein. A partir de ce squelette, le noyau B a été modulé avec divers substituants tels que des groupements méthoxy et des groupements hydroxyle principalement ; des atomes d'halogènes et un groupement diméthylamino, sur la position 4' du cycle B, ont également été introduits.

La structure des molécules évaluées est précisée ci-dessous (schéma 7 et tableau VII).

Schéma 7 : structure des 7-méthoxyflavanones F₁ - F₂₃.



F₁ - F₂₃

Tableau VII : Présentation des molécules

CODE	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
7-méthoxyflavanone	H	H	H	H	H
F ₁	H	OH	H	H	H
F ₂	H	H	OH	H	H
F ₃	H	OH	OH	H	H
F ₄	H	OH	H	OH	H
F ₅	H	OH	OMe	H	H
F ₆	H	OMe	OH	H	H
F ₇	OMe	H	H	H	H
F ₈	H	OMe	H	H	H
F ₉	H	H	OMe	H	H
F ₁₀	OMe	OMe	H	H	H
F ₁₁	OMe	H	OMe	H	H
F ₁₂	OMe	H	H	OMe	H
F ₁₃	OMe	H	H	H	OMe
F ₁₄	H	OMe	OMe	H	H
F ₁₅	H	OMe	H	OMe	H
F ₁₆	OMe	OMe	OMe	H	H
F ₁₇	OMe	H	OMe	OMe	H
F ₁₈	H	OMe	OMe	OMe	H
F ₁₉	H	H	N-(CH ₃) ₂	H	H
F ₂₀	H	H	Br	H	H
F ₂₁	H	H	F	H	H
F ₂₂	H	H	CN	H	H
F ₂₃	H	H	Cl	H	H

2.1.2. Présentation des résultats

Ces molécules ont été évaluées à différentes concentrations, pour lesquelles le pourcentage d'inhibition a été calculé. A partir de ces résultats, nous avons déterminé graphiquement la CI_{50} , c'est à dire la concentration à laquelle la molécule va inhiber l'activité de l'aromatase à 50 %. Les pourcentages exprimés correspondent à la moyenne de 2 expérimentations. La déviation doit être inférieure à ± 5 %.

Les résultats présentés ci-après ont fait l'objet d'une publication internationale (Pouget, 2002).

Tableau VIII : activité anti-aromatase des dérivés de la 7-méthoxyflavanone.

	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration					CI_{50} (μM)
	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	10 μM	25 μM	
Aminoglutéthimide			9,6 \pm 0,9	64,2 \pm 1,1	75,0 \pm 1,0	5,2
7-OMe flavanone			3,9 \pm 1,6	54,7 \pm 0,8	67,5 \pm 2,3	8,0
F ₁		5,9 \pm 0,2	15,8 \pm 0,7	77,3 \pm 1,3	83,0 \pm 0,1	3,5
F ₂			16,2 \pm 1,4	75,4 \pm 0,8	81,0 \pm 1,1	3,7
F ₃	3,4 \pm 0,4		29,0 \pm 2,1	86,8 \pm 2,6	88,4 \pm 1,5	2,5
F ₄		7,0 \pm 0,5	15,0 \pm 2,2	78,5 \pm 0,5	83,9 \pm 0,9	3,5
F ₅			4,1 \pm 1,1	60,8 \pm 5,5	71,5 \pm 1,3	6,2
F ₆			7,5 \pm 0,4	64,7 \pm 1,5	76,4 \pm 0,1	5,4
F ₇			1,7 \pm 0,2	59,9 \pm 5,5	78,1 \pm 0,3	6,6
F ₈			1,8 \pm 0,2	43,6 \pm 0,4	61,2 \pm 1,3	14,2
F ₉			1,7 \pm 0,2	43,8 \pm 4,7	65,1 \pm 0,8	13,6
F ₁₀			2,0 \pm 0,5	59,8 \pm 0,9	72,2 \pm 2,3	6,6
F ₁₁			2,2 \pm 0,3	55,2 \pm 1,7	72,8 \pm 0,5	8,0
F ₁₂				26,3 \pm 6,3		
F ₁₃				25,7 \pm 0,6		
F ₁₄				42,7 \pm 3,5		
F ₁₅				31,9 \pm 0,5		

F ₁₆			1,9 ± 0,4	70,1 ± 1,5	79,8 ± 3,1	4,8
F ₁₇				29,3 ± 1,6		
F ₁₈				33,9 ± 0,7		
F ₁₉				16,6 ± 0,7		
F ₂₀				41,2 ± 2,7		
F ₂₁				42,3 ± 1,1		
F ₂₂				38,3 ± 1,4		
F ₂₃				47,3 ± 4,7		

La 7-méthoxyflavanone est considérée comme une molécule de référence pour notre étude. Elle présente une CI₅₀ de 8,0 µM.

Le but de nos recherches est de synthétiser des molécules qui, à faible concentration, ont une activité inhibitrice élevée sur l'aromatase. On considère une molécule potentiellement intéressante quand sa CI₅₀ est améliorée par rapport à celle de la 7-méthoxyflavanone. C'est pourquoi la plupart des molécules dont le pourcentage d'inhibition à 10 µM est inférieur à 50 % ne font pas l'objet d'une détermination de leur CI₅₀.

2.1.3. Analyse des résultats

On remarque que la présence d'un groupement hydroxyle (-OH) en position 3' sur le noyau B augmente de façon significative l'activité de la molécule. La 3'-hydroxy-7-méthoxyflavanone a une CI₅₀ de 3,5 µM.

Il en est de même lors de la présence d'un hydroxyle sur le carbone 4' qui améliore l'activité de façon similaire (la 4'-hydroxy-7-méthoxyflavanone a une CI₅₀ de 3,7 µM).

Lorsque la molécule est doublement substituée par des hydroxyle en 3' et en 4', l'activité progresse encore : la CI₅₀ de la 3',4'-dihydroxy-7-méthoxyflavanone est alors de 2,5 µM. On peut donc penser que les groupements hydroxyle, placés sur les carbones 3' et 4' agissent en synergie. La 3',4'-dihydroxy-7-méthoxyflavanone est une molécule qui présente une activité inhibitrice de l'aromatase élevée, deux fois supérieure à celle de l'aminoglutéthimide.

En revanche, le groupement hydroxyle en position 5', en association avec un hydroxyle en position 3' ne provoque aucun changement d'activité par rapport à la 3'-hydroxy-7-méthoxyflavanone. Les CI_{50} de la 3',5'-dihydroxy-7-méthoxyflavanone et de la 3'-hydroxy-7-méthoxyflavanone sont identiques (3,5 μM).

Après l'analyse de ces derniers résultats, des groupements méthoxy (-OMe) ont été introduits sur les mêmes carbones que précédemment.

On remarque que la présence d'un méthoxy en 3' diminue fortement l'activité anti-aromatase ; en effet, la 3',7-diméthoxyflavanone a une CI_{50} de 14,2 μM , donc bien supérieure à celle de la 7-méthoxyflavanone. Il en est de même pour la 4',7-diméthoxyflavanone : l'addition d'un groupement méthoxy en 4' est donc défavorable à l'effet inhibiteur. Le méthoxy introduit en 5' diminue également la puissance inhibitrice de la molécule ; la 3',7-diméthoxyflavanone a en effet une activité supérieure à la 3',5',7-triméthoxyflavanone.

En revanche, la présence d'un méthoxy sur le carbone 2' a un effet bénéfique sur l'activité anti-aromatase de la 7-méthoxyflavanone. En effet, la 2',7-diméthoxyflavanone a une activité supérieure à celle de la 7-méthoxyflavanone. Toutefois, il semble que ce soit la seule position où l'addition d'un groupement méthoxy entraîne une augmentation de l'activité par rapport à la 7-méthoxyflavanone.

L'effet du 2'-méthoxy est confirmé par plusieurs observations :

- la CI_{50} de la 2',3',7-triméthoxyflavanone (6,6 μM) est inférieure à celle de la 3',7-diméthoxyflavanone, mais elle est identique à celle de la 2',7-diméthoxyflavanone (l'addition d'un groupement méthoxy en 3' associé à un groupement méthoxy en 2' ne fait pas varier la puissance de la molécule),
- la 2',4',7-triméthoxyflavanone est moins active que la 2',3',7-triméthoxyflavanone, mais l'activité est tout de même améliorée par rapport à la 4',7-diméthoxyflavanone,
- en ce qui concerne les dérivés trisubstitués sur le noyau B, la seule molécule présentant une activité améliorée est la 2',3',4',7-tétraméthoxyflavanone. La présence du groupement méthoxy en 2' est certainement responsable de cette activité.

En revanche, on remarque que les molécules comportant des substituants méthoxy en 2' et 5' ou en 2' et 6' présentent une activité anti-aromatase faible. Il apparaît que les méthoxy positionnés en 5' et en 6' ont une influence négative sur l'activité anti-aromatase.

Pour les deux autres molécules trisubstituées sur le noyau B, à savoir la 2',4',5',7-tétraméthoxyflavanone et la 3',4',5',7-tétraméthoxyflavanone, leur faible activité semble confirmer que le groupement méthoxy en 5' a une influence défavorable.

Il semble évident que les hydroxyle positionnés en 3' et en 4' ont un effet bénéfique important. En revanche, les méthoxy placés sur les mêmes carbones, provoquent une diminution de l'activité anti-aromatase. Il faut cependant noter que les groupements hydroxyle semblent compenser la perte d'activité engendrée par les autres substituants tels que les méthoxy. C'est du moins ce que prouvent nos résultats avec la 3'-hydroxy-4',7-diméthoxyflavanone ($CI_{50} = 6,2 \mu M$) et la 4'-hydroxy-3',7-diméthoxyflavanone ($CI_{50} = 5,4 \mu M$).

Ces travaux montrent donc que la nature des substituants du noyau B influence l'activité anti-aromatase, mais que leur position joue également un rôle quant à cette activité.

Whomsley *et al.* (1993) ont effectué des recherches sur des inhibiteurs de l'aromatase imidazolés présentant un phényle. Ils ont montré que des atomes d'halogènes comme le chlore et le fluor ainsi qu'un groupement cyano, introduits en position 4' (c'est à dire en position *para* du phényle) augmentaient l'activité anti-aromatase de la molécule. D'autres études ont confirmé l'action favorable du brome, toujours en *para* d'un phényle (Le Borgne, 1999).

Aussi, nous avons introduit des substituants halogénés (chlore, brome, fluor) et un groupement cyano en position 4' sur le cycle B. Il en résulte que ces substituants n'ont que peu d'influence sur l'activité anti-aromatase de la 7-méthoxyflavanone. Le pourcentage d'inhibition à 10 μM de ces quatre molécules (la

4'-chloro-7-méthoxyflavanone, la 4'-bromo-7-méthoxyflavanone, la 4'-fluoro-7-méthoxyflavanone, la 4'-cyano-7-méthoxyflavanone) est nettement inférieur à celui de notre molécule de référence.

Enfin, l'introduction d'un groupement diméthylamino (donneur de protons, au même titre que le groupement hydroxyle), en position 4' sur la 7-méthoxyflavanone réduit de façon considérable l'activité de la molécule.

2.2. Modulation du noyau B à partir de la 7-hydroxyflavanone

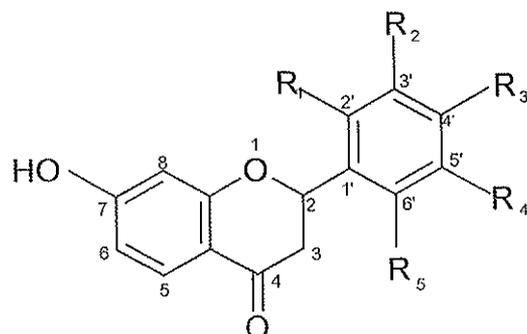
2.2.1. Présentation des molécules

La 7-hydroxyflavanone est considérée comme le deuxième chef de file de notre étude. Elle présente une activité anti-aromatase supérieure à celle de la 7-méthoxyflavanone.

A partir de l'étude précédente, les substituants les plus actifs se sont révélés être les groupements hydroxyle, positionnés sur les carbones 3' et 4'. Nous allons à présent évaluer leurs effets sur la 7-hydroxyflavanone. L'objectif de ces substitutions est d'obtenir des molécules présentant une activité anti-aromatase plus élevée que celle des flavanones précédentes.

La structure des molécules évaluées est précisée ci-après (schéma 8 et tableau IX).

Schéma 8 : structure des 7-hydroxyflavanones F₂₄ - F₂₇.



F₂₄ - F₂₇

Tableau IX : présentation des molécules.

CODE	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
7-hydroxyflavanone	H	H	H	H	H
F ₂₄	OH	H	H	H	H
F ₂₅	H	OH	H	H	H
F ₂₆	H	H	OH	H	H
F ₂₇	H	OH	OH	H	H

2.2.2. Présentation des résultats

La manipulation et les méthodes de calculs sont identiques à celles effectuées pour les dérivés de la 7-méthoxyflavanone. En revanche, les molécules étant plus actives, les pourcentages d'inhibition à 0,5 µM ont dû être mesurés.

Tableau X : activité anti-aromatase des dérivés de la 7-hydroxyflavanone

	Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration				Cl ₅₀ (µM)
	0,5 µM	1 µM	10 µM	25 µM	
7-OHflavanone		10,2 ± 0,1	76,1 ± 4,0	82,7 ± 0,2	3,8
F ₂₄	6,8 ± 0,1	15,6 ± 0,2	74,2 ± 2,5	81,6 ± 0,1	3,8
F ₂₅	12,9 ± 1,4	34,3 ± 2,2	81,7 ± 0,8	88,0 ± 0,1	2,1
F ₂₆	8,4 ± 1,1	19,5 ± 2,6	75,5 ± 0,9	82,6 ± 3,3	3,4
F ₂₇	18,1 ± 0,9	31,7 ± 0,3	82,0 ± 1,3	86,2 ± 2,1	2,2

2.2.3. Analyse des résultats

La substitution en 3' par un groupement hydroxyle induit une augmentation importante de l'activité anti-aromatase de la molécule. La Cl₅₀ de la 3',7-dihydroxyflavanone est de 2,1 µM. La 3',7-dihydroxyflavanone est ainsi la molécule la plus active parmi toutes les flavanones synthétisées.

En revanche, l'hydroxyle positionné sur le carbone 4' n'exerce que peu d'influence sur l'activité inhibitrice de l'aromatase ; en effet la Cl₅₀ de la 4',7-dihydroxyflavanone est de 3,4 µM.

La double hydroxylation en 3' et 4' n'induit pas de changement significatif de l'activité par rapport à la 3',7-dihydroxyflavanone. Ce résultat confirme bien le fait que l'hydroxylation en 4' sur la 7-hydroxyflavanone n'a que peu d'influence sur l'activité anti-aromatase.

Enfin, la substitution en 2' par un groupement hydroxyle n'exerce aucun effet puisque la Cl₅₀ de la 2',7-dihydroxyflavanone est identique à celle de la molécule de référence.

2.3. Discussion

Après l'analyse de tous les résultats obtenus sur les deux séries de molécules dérivées de la 7-méthoxyflavanone et de la 7-hydroxyflavanone, on peut conclure que le groupement hydroxyle positionné sur le carbone 3' induit une augmentation significative de l'activité anti-aromatase.

En revanche, l'influence du 4'-hydroxyle dépend du substituant placé en position 7 sur le noyau A. En effet, l'hydroxyle introduit sur le carbone 4' de la 7-méthoxyflavanone provoque une augmentation importante de l'activité alors qu'il a peu d'influence lorsque le substituant en 7 est un hydroxyle.

Des recherches effectuées sur des flavones présentant un hydroxyle en 7 avaient également montré que l'hydroxylation en 4' n'apportait qu'un changement négligeable de l'activité (Ibrahim, 1990). L'étude menée par Le Bail *et al* (1998_b) avait même montré une diminution de l'effet inhibiteur liée à l'hydroxylation en 4' puisque l'apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone) s'avérait moins active que la chrysin (5,7-dihydroxyflavone).

Les hydroxyles positionnés sur les carbones 3' et 4' de la 7-méthoxyflavanone améliorent l'activité inhibitrice de façon significative alors que la synergie de ces deux substituants n'est pas démontrée sur le squelette de la 7-hydroxyflavanone.

Les dérivés hydroxylés de la 7-méthoxyflavanone et de la 7-hydroxyflavanone qui ont été synthétisés au cours de ces recherches, sont plus puissants que l'aminoglutéthimide, mais ils restent cependant nettement moins actifs que les inhibiteurs de troisième génération tels que l'anastrozole et le létrozole (CI_{50} égale à 0,018 μ M, mesurée sur notre système).

CONCLUSION

Il est aujourd'hui clairement établi que l'incidence du cancer du sein croît dans tous les pays, qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement. Le cancer du sein représente donc une pathologie très préoccupante pour les années à venir. De plus, les thérapies utilisées sont souvent difficiles à supporter. Néanmoins, l'hormonothérapie prend une place de plus en plus importante dans le cadre du traitement du cancer du sein hormonodépendant. Ainsi, le développement de nouvelles molécules inhibitrices de l'aromatase revêt un intérêt capital puisqu'il est à présent clairement démontré que cette classe médicamenteuse apporte une amélioration significative de la vie des patientes atteintes d'un cancer du sein.

Outre les inhibiteurs synthétiques de l'aromatase, il existe des molécules d'origine naturelle qui présentent des propriétés inhibitrices de l'enzyme telles que les flavonoïdes.

Notre étude montre que certaines flavanones hydroxylées sur le noyau B en position 3' et/ou 4' sont plus actives que l'aminoglutéthimide, premier inhibiteur de l'aromatase utilisé en clinique. Cependant, l'activité de ces flavanones demeure largement plus faible que celles des dernières molécules développées, comme l'anastrozole ou le létrozole. Ces flavanones n'auront donc pas de rôle au niveau curatif. En revanche, on peut envisager que ces flavonoïdes, à travers ces propriétés inhibitrices de l'aromatase, soient un jour utilisées en chimioprévention du cancer du sein.

Pour cela, il conviendrait de procéder à des études complémentaires, concernant des systèmes biologiques impliqués dans le développement d'un cancer du sein. Ainsi, il semble intéressant d'évaluer l'affinité des flavanones étudiées pour le récepteur aux estrogènes étant donné le caractère estrogénique d'une des deux molécules mères de notre étude, à savoir la 7-hydroxyflavanone. Des travaux sur l'absorption et le métabolisme de ces flavanones sont également nécessaires. En effet, une étude montre que certains flavonoïdes ne possèdent pas d'action anti-aromatase *in vivo*, sans doute à cause de leur faible biodisponibilité (Saarinen, 2001).

Notre étude, complétée par ces travaux, pourrait alors constituer une base de données scientifiques sur laquelle s'appuyer en vue de développer des composés flavonoïdiques à visée préventive sur le cancer du sein, à l'image des isoflavones du soja utilisées pour lutter contre les troubles de la ménopause.

Il ne faut pas oublier le fait que ces flavonoïdes se retrouvent, pour certains, dans notre alimentation et que leur présence, à travers leurs multiples propriétés (anti-aromatase, anti-radicalaire, anti-oxydante), est sans doute responsable d'un effet protecteur vis à vis des néoplasies telles que le cancer du sein. En effet, plusieurs études semblent montrer qu'une association de ces flavonoïdes avec des micronutriments comme la vitamine C, la vitamine E et le β -carotène augmenterait la protection contre le cancer du sein.

C'est pourquoi le rôle des professionnels de santé parmi lesquels figurent sans conteste le pharmacien d'officine, est d'informer les patients et de les orienter vers des habitudes alimentaires basées sur un régime riche en fruits et légumes. Notre travail est donc une preuve supplémentaire que notre alimentation est sans nul doute "notre première médecine".

Enfin, notre travail constitue aussi une base de données pour des études de modélisation moléculaire en vue d'une meilleure compréhension du site actif de l'aromatase. En effet, ces travaux de modélisation peuvent éventuellement permettre d'établir une corrélation entre la structure des molécules et leur activité anti-aromatase. De ces résultats, pourront découler des informations sur le site actif de l'enzyme, éléments clés dans le développement de nouveaux inhibiteurs plus spécifiques et plus puissants.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADLERCREUTZ (H.).- Phytoestrogens : epidemiology and a possible role in cancer protection.- Environmental Health Perspectives .- 1995, vol 103.- pp. 103-112.
2. ASTRA-ZENECA laboratoires.- Note d'information sur l'ARIMIDEX®.- 2000.
3. AUVRAY (P.), BICHAT (F.), GENNE (P.).- Evaluation préclinique de l'activité antitumorale des inhibiteurs de l'aromatase.- Bull Cancer.- 2000.- pp. 7-22.
4. BIRT (D.F.), HENDRICH (S.), WANG (W.).- Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids.- Pharmacology and Therapeutics.- 2001, n° 90.- pp. 157-177.
5. BRUNETON (J.).- Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.- Troisième édition.- 1999.- pp. 310-345.
6. CAMPBELL (D.R.), KURZER (M.S.).- Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes.- J. Steroid Biochem. Molec. Biol.- 1993, vol 46, n°3.- pp. 381-388.
7. DEBAERT (M.), POISSON (J.), LOISEAU (P.).- Traité de chimie thérapeutique.- Médicaments en relation avec des systèmes hormonaux.- Edition médicale internationale, 1995.- vol 4, chap 10.- pp. 479-500.
8. DE CREMOUX (P.).- Les inhibiteurs de l'aromatase : aspects pharmacologiques.- Bull Cancer.- 2000.- pp. 23-29.
9. DOROSZ (Ph).- Guide pratique des médicaments.- 20^e édition.- Maloine, Paris, 2000.- pp. 566-571.- pp. 1484-1589.
10. ELIA (D.).- Les phytoestrogènes : actualité et perspectives.- Actualités Pharmaceutiques.- 1999, n°381.- pp. 17-19.
11. FEUTRIE (M.L.), BONNETERRE (J.).- Les anti-aromatases.- Bull Cancer.- 1999, vol 86, n°10.- pp. 821-827.
12. GOURINEL.- Le cancer du sein.- Actualités Pharmaceutiques.- 1996, n°357.- pp. 38-47.
13. HERTOOG (M.G.L.), HOLLMAN (P.C.H.), KATAN (M.B.) *and al.*- Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands.- Nutrition Cancer.- 1993, vol 20.- pp. 21-29.
14. IBRAHIM (A.R.), ABUL-HAJJ (Y.J.).- Aromatase inhibition by flavonoids.- J. Steroid Biochem. Molec. Biol.- 1990, vol 37, n°2.- pp. 257-260.

15. INGRAM (D.), SANDERS (K.), KOLYBABA (M.) *and al.*- Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer.- *The Lancet*.- 1997, vol 350.- pp. 990-994.
16. JEONG (H.J.), GEUN SHIN (Y.), KIM (I.H.) *and al.*- Inhibition of aromatase activity by flavonoids.- *Natural Products*.- 1999, vol 22, n°3.- pp. 309-312.
17. KAO (Y.C.), ZHOU (C.), SHERMAN (M.) *and al.*- Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: a site-directed mutagenesis study.- *Environmental Health Perspectives*.- 1998, vol 106, n°2.- pp. 85-92.
18. KELLIS (J.T.), VICKERY (L.E.)- Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones.- *Science*.- 1984, vol 225.- pp. 1032-1034.
19. KERBRAT (P.), LEFEUVRE (C.)- Antiaromatases : revue des résultats cliniques.- *Bull Cancer*.- 2000.- pp. 31-39.
20. KUO (S.M.)- Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism.- *Critical Reviews in Oncogenesis*.- 1997, vol 8, n° 1.- pp. 47-69.
21. LE BAIL (J.C.), VARNAT (F.), NICOLAS (J.C.) *et al.*- Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids.- *Cancer Letters*.- 1998_a, n° 130.- pp. 209-216.
22. LE BAIL (J.C.), LAROCHE (T.), MARRE-FOURNIER (F.), *et al.*- Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids.- *Cancer Letters*.- 1998_b, 133.- pp. 101-106.
23. LE BAIL (J.C.)- Conversion métabolique du sulfate de déhydroépiandrostérone en composés à activité estrogénique dans les cellules cancéreuses mammaires.- 204p.- Th. : Biochimie : Limoges : 1998_c.
24. LE BAIL (J.C.), POUGET (C.), FAGNERE (C.), *et al.*- Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities.- *Life Sciences*.- 2001, 68.- pp. 751-761.
25. LE BORGNE (M.), MARCHAND (P.), DELEVOYE-SEILLER (B) *and al.*- New selective nonsteroidal aromatase inhibitors: synthesis and inhibitory activity of 2, 3 or 5-(α -azolybenzyl)-1H-indoles.- *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*.- 1999, n°9.- pp. 333-336.
26. LEE (D.), BHAT (K.P.), FONG (H.H.) *and al.*- Aromatase inhibitors from *Broussonetia papyrifera*.- *J. Nat. Prod.*- 2001, vol 64, n°10.- pp. 1286-1293.

27. NAMER (M.).- Les inhibiteurs de l'aromatase : perspectives thérapeutiques.- Bull Cancer.- 2000.- pp. 41-45.
28. PELISSERO (C.), LENCZOWSKI (M.J.P.), CHINZI (D.) *and al.*- Effects of flavonoids on aromatase activity, an *in vitro* study.- J. Steroid Biochem. Molec. Biol.- 1996, vol 57, n°3-4.- pp. 215-223.
29. PETERSON (J.), DWYER (J.) *and al.*- Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity.- Nutrition research.- 1998, vol 18, n°12.- pp. 1995-2018.
30. POUGET (C.), LAUTHIER (F.), SIMON (A.) *and al.*- Flavonoids: structural requirements for antiproliferative activity on breast cancer cells.- Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.- 2001_a, n°11.- pp. 3095-3097.
31. POUGET (C.).- Pharmacomodulation de flavonoïdes : conception et synthèse de nouveaux inhibiteurs de l'aromatase.- 185p.- Th. :pharmacognosie : Limoges : 2001_b.
32. POUGET (C.), FAGNERE (C.), BASLY (J.P.), BESSON (A.E) *and al.*- Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones.- Pharmaceutical Research.- 2002, vol 19, n°3.
33. RIMM (E.B.), KATAN (M.B.), ASCHERIO (A.) *and al.*- Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals.- Ann Intern Med.- 1996, vol 125, n°5.- pp. 384-389.
34. ROSENBERG ZAND (R.S.), JENKINS (D.J.A.), DIAMANDIS (E.P.).- Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds.- Breast Cancer Research and Treatment.- 2000, n°62.- pp. 35-49.
35. SAARINEN (N.), JOSHI (S.C.), AHOTUPA (M.) *and al.*- No evidence for the *in vivo* activity of aromatase-inhibiting flavonoids.- J. Steroid Biochem. and Molec. Biol.- 2001, n°78.- pp. 231-239.
36. THOMPSON (E.A.), SIITERI (P.K.).- Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione.- The Journal of Biological Chemistry.- 1974, vol 249, n°17.- pp. 5364-5372.
37. TIXIER (E.).- Traitement du cancer du sein chez la femme ménopausée par l'aminoglutéthimide.- 197p.- Th.D : pharmacie : Limoges : 1994 ; numéro 360.
38. TOURAINÉ (P.), THIS (P.), MAUVAIS-JARVIS (P.).- Vers une prévention hormonale du cancer du sein.- Pour la Science.- 1995.- pp. 58-63.

39. WANG (C.), MAKELA (T.), ADLERCREUTZ (H.).- Lignans and flavonoids inhibit aromatase enzyme in human preadipocytes.- J. Steroid Biochem. Molec. Biol.- 1994, vol 50, n° 3-4.- pp. 205-212.
40. WHOMSLEY (R.), FERNANDEZ (E.), NICHOLLS (P.J.) *and al.*- Substituted 1-[(benzofuran-2-yl)-phenylmethyl]-imidazoles as potent inhibitors of aromatase *in vitro* and in female rats *in vivo*.- J. Steroid Biochem. Molec. Biol.- 1993, vol 44, n°4-6.- pp. 675-676.
41. ZHOU (D.), POMPON (D.), CHEN (S.).- Stable expression of human aromatase complementary DNA in mammalian cells: a useful system for aromatase inhibitor screening.- Cancer Research.- 1990, n°50.- pp. 6949-6954.

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribo nucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMP _c	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribo nucléique
°C	degré Celcius
Ci	Curie
CI ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
DCI	Dénomination commune internationale
Δ ₄	Androstènedione
DHEA	Déhydroépiandrostérone
FDA	Food and drug administration
FSH	Hormone Folliculostimulante
G6PDH	Glucose-6-phosphate deshydrogénase
γ-GT	Gamma-glutamyl transférase
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide haute pression
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LH	Luteinizing hormone
LH-RH	Luteinizing hormone-releasing hormone
M	Molaire (mol.L ⁻¹)
Min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
μM	Micromolaire
nM	Nanomolaire
RE	Récepteurs aux estrogènes
RP	Récepteurs à la progestérone
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SHBG	Sex hormon binding globulin
TSH	Thyroid stimulating hormone
U/ml	Unité par millilitre

Index des schémas et tableaux.

Schémas

Schéma 1 : <i>Biosynthèse des estrogènes par aromatisation</i>	Page 24
Schéma 2 : <i>Biosynthèse des flavonoïdes</i>	Page 40
Schéma 3 : <i>Principe de mesure de l'activité anti-aromatase des flavonoïdes</i>	Page 53
Schéma 4 : <i>Cinétique de transformation de l'androstènedione en estrogènes par les microsomes placentaires</i>	Page 54
Schéma 5 : <i>Modulation du noyau B de la 7-méthoxyflavanone</i>	Page 60
Schéma 6 : <i>Modulation du noyau B de la 7-hydroxyflavanone</i>	Page 61
Schéma 7 : <i>Structure des 7-méthoxyflavanones F₁-F₂₃</i>	Page 62
Schéma 8 : <i>Structure des 7-hydroxyflavanones F₂₄-F₂₇</i>	Page 69

Tableaux

Tableau I : <i>Les antimétabolites</i>	Page 16
Tableau II : <i>Les agents alkylants</i>	Page 17
Tableau III : <i>Les agents intercalants</i>	Page 18
Tableau IV : <i>Les agents agissant sur le fuseau</i>	Page 18
Tableau V : <i>Récapitulatif des inhibiteurs de l'aromatase</i>	Page 26
Tableau VI : <i>Puissance relative des inhibiteurs de l'aromatase, déterminée in vitro sur des microsomes placentaires</i>	Page 35
Tableau VII : <i>Présentation des molécules dérivées de la 7-méthoxyflavanone</i>	Page 63
Tableau VIII: <i>Activité anti-aromatase des dérivés de la 7-méthoxyflavanone</i>	Page 64
Tableau IX : <i>Présentation des molécules dérivées de la 7-hydroxyflavanone</i>	Page 69
Tableau X : <i>Activité anti-aromatase des dérivés de la 7-hydroxyflavanone</i>	Page 70

TABLE DES MATIERES

PLAN	1
INTRODUCTION	3
CANCER DU SEIN ET FLAVONOIDES	6
1. LE CANCER DU SEIN	7
1.1. EPIDEMIOLOGIE	7
1.2. ETIOLOGIE.	8
1.2.1. Héritéité et facteurs génétiques.....	8
1.2.2. Antécédents personnels	9
1.2.3. Facteurs hormonaux	9
1.2.4. Facteurs nutritionnels et environnementaux.....	10
1.3. LES DIFFERENTES FORMES DE CANCER DU SEIN.....	10
1.4. LE DEPISTAGE	12
1.5. LE TRAITEMENT	12
1.5.1. Les traitements non médicamenteux	12
1.5.1.1. <i>La chirurgie</i>	12
1.5.1.2. <i>La radiothérapie</i>	14
1.5.2. Les traitements médicamenteux	15
1.5.2.1. <i>La chimiothérapie</i>	15
1.5.2.2. <i>L'hormonothérapie</i>	19
1.6. LES INHIBITEURS DE L'AROMATASE.....	23
1.6.1. L'aromatase	23
1.6.2. La biosynthèse des estrogènes	23
1.6.3. Classification.....	25
1.6.4. Propriétés des différentes molécules.....	27
1.6.4.1. <i>L'aminoglutéthimide</i>	27
1.6.4.2. <i>Le roglétimide</i>	28
1.6.4.3. <i>Le formestane (ou CGP 32349)</i>	29
1.6.4.4. <i>L'exémestane (ou FCE 24304)</i>	30
1.6.4.5. <i>Le fadrozole (ou CGS 16949)</i>	31
1.6.4.6. <i>Le létrozole (ou CGS 20267)</i>	32

1.6.4.7. <i>Le vorozole (ou R 76713)</i>	33
1.6.4.8. <i>L'anastrozole (ou ICI D 1033)</i>	34
1.6.5. Les inhibiteurs naturels	36
2. LES FLAVONOÏDES	37
2.1. GENERALITES	37
2.1.1. Distribution et localisation	37
2.1.2. Structure chimique et classification	37
2.1.2.1. <i>Les flavones</i>	38
2.1.2.2. <i>Les flavanones</i>	39
2.1.2.3. <i>Les chalcones</i>	39
2.1.3. Origine biosynthétique des flavonoïdes	40
2.1.4. Les flavonoïdes dans l'alimentation	41
2.1.5. Propriétés biologiques	42
2.1.5.1. <i>Rôle dans la perméabilité capillaire</i>	42
2.1.5.2. <i>Action préventive sur le cancer</i>	43
2.1.5.3. <i>Flavonoïdes et inhibition enzymatique</i>	44
2.1.5.4. <i>Autres propriétés</i>	45
2.2. L'ACTIVITE ANTI-AROMATASIQUE DES FLAVONOÏDES	46
2.2.1. Relations structure/activité	47
2.2.2. Stratégie d'étude de l'influence des substituants sur le noyau B des flavanones ..	49
TRAVAUX PERSONNELS	51
1. MATERIELS ET METHODES	52
1.1. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES : SYSTEMES ET METHODES UTILISES	52
1.1.1. Systèmes biologiques	52
1.1.2. Les méthodes de mesure	53
1.2. PRINCIPE D'ETUDE DE L'ACTIVITE INHIBITRICE DES FLAVONOÏDES SUR L'AROMATASE	53
1.2.1. Principe	53
1.2.2. Obtention des microsomes placentaires	54
1.2.3. Incubation	55
1.2.4. Extraction	55
1.2.5. Etude HPLC	55

1.3. LE PROTOCOLE AROMATASE.....	57
1.3.1. Remarques.....	57
1.3.2. Protocole.....	58
1.4. METHODE DE SYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES	60
2. RESULTATS ET DISCUSSION	62
2.1. MODULATION DU NOYAU B A PARTIR DE LA 7-METHOXYFLAVANONE	62
2.1.1. Présentation des molécules.....	62
2.1.2. Présentation des résultats	64
2.1.3. Analyse des résultats.....	65
2.2. MODULATION DU NOYAU B A PARTIR DE LA 7-HYDROXYFLAVANONE	68
2.2.1. Présentation des molécules.....	68
2.2.2. Présentation des résultats	69
2.2.3. Analyse des résultats.....	70
2.3. DISCUSSION.....	71
CONCLUSION.....	72
BIBLIOGRAPHIE	75
ABREVIATIONS.....	80
INDEX DES SCHEMAS ET TABLEAUX.....	82
TABLE DES MATIERES.....	84

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 308

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

BESSON Anne-Elise.- Evaluation de l'activité anti-aromatase de flavonoïdes synthétiques.- 87p

Thèse D. : Pharm. ; Limoges ; 2002.

RESUME :

Le cancer du sein est actuellement un réel problème de santé publique. C'est en effet la forme de cancer la plus fréquente parmi les femmes ménopausées vivant dans les pays développés.

Outre les divers traitements actuellement utilisés, l'hormonothérapie est une nouvelle ligne thérapeutique qui vise à modérer les quantités d'estrogènes présentes dans les tumeurs mammaires.

La synthèse d'estrogènes est entretenue par un complexe enzymatique, l'aromatase, qui est donc directement impliquée dans les pathologies cancéreuses.

Les flavonoïdes sont des molécules végétales possédant une activité anti-aromatase. Ils inhibent donc la biosynthèse des estrogènes au niveau tumoral.

Les flavanones et les flavones ont été étudiées dans ce travail. Il apparaît que leur puissance d'inhibition varie en fonction de la position et de la nature des substituants introduits sur le noyau B de leur squelette.

Certaines flavanones hydroxylées en 3' et en 4' se sont révélées plus actives que l'aminoglutéthimide, premier inhibiteur de l'aromatase utilisé en clinique, mais leur activité reste cependant inférieure à celle des autres molécules prescrites actuellement.

Les flavonoïdes ne semblent pas pouvoir jouer un rôle en traitement curatif mais on peut néanmoins envisager leur utilisation en chimioprévention de cette néoplasie.

MOTS CLES :

- Cancer du sein
- Hormonothérapie
- Inhibiteurs de l'aromatase
- Flavonoïdes
- Flavanones

— Laboratoire de Biochimie, Faculté de Pharmacie de l'Université de LIMOGES —
— 2 rue du Docteur MARCLAND - 87000 LIMOGES —