

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE 2001/2002

THESE N°

312.11



L'AROMATASE ET SES INHIBITEURS.
UTILISATIONS DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DU SEIN.

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le : 21 Mai 2002

PAR

Thibault LAROCHE
Né le 26 Mai 1975 à Bruxelles.

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. le Professeur Gérard HABRIOUX..... - Président
M. le Professeur Albert CHULIA..... - Juge
M. le Maître de conférences Jean Philippe BASLY..... -Juge
Mlle. Alice ROUX.....-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	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE
	CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
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
DELEBASSE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	THERAPEUTIQUE
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
MARION Sandrine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
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
VIGNOLLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT :**FAURE Monique**

PHARMACIE GALENIQUE

PROFESSEUR CERTIFIE:**MARBOUTY Jean-Claude**

ANGLAIS

ATER :**CALLISTE Claude**

BIOPHYSIQUE

MARFAK Abdelghafour

BIOPHYSIQUE

RIAH DEHKORDI Homayoun

PHYSIOLOGIE-PARASITOLOGIE

TALLET Dominique

PHARMACOLOGIE

REMERCIEMENTS:

Je tiens à remercier l'ensemble des enseignants de la Faculté de Pharmacie de Limoges qui m'ont permis d'accomplir mon cursus universitaire dans les meilleures conditions imaginables.

Je souhaite aussi remercier les personnes qui m'ont fait le plaisir de bien vouloir juger mon travail, à savoir Mr le professeur J.Chulia, Mr J-P.Basly, Mlle A. Roux et tout particulièrement Mr le Professeur G.Habrioux qui a accepté de présider ce jury et qui a su m'accorder une oreille attentive tout au long de mes études.

Je remercie mes parents, ma famille et Carole qui m'ont épaulé, soutenu et entouré durant toutes ces années.

Enfin je remercie Cassian pour tout le bonheur qu'il apporte à son "étudiant de papa".

ABREVIATIONS

µg	Microgramme
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messagé
BRCA	Breast Cancer
Δ ₄	4-androstène-3,17-dione
DHA	Déhydroépiandrosterone
E ₁	Estrone
E ₂	Estradiol
DMBA	Diméthylbenzanthracène
EGF	Epidermal Growth Factor
ERE	Élément de réponse aux estrogènes
FSH	Folliculing stimulating hormone
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
IGF	Insuline like growth factor
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
kg	Kilogrammes
l	Litre
LH	Luteinizing Hormone
ml	Millilitre
pb	Paires de bases
pg	Picogramme
RE	Récepteur aux estrogènes
SDHA	Sulfate de déhydroépiandrosterone
SHBG	Sexual hormone binding globuline

INTRODUCTION.

Le cancer du sein est actuellement la forme de cancer la plus fréquente parmi les femmes d'Amérique du Nord, d'Amérique Latine, d'Australie, d'Asie et de presque tous les pays d'Europe. On estime que ce cancer touchera cinq millions de femmes dans le monde au cours de la prochaine décennie (Jensen *et al.* 1990). L'incidence du cancer du sein augmente dans la quasi totalité des pays, qu'ils soient industrialisés ou en voie de développement, cette augmentation étant en moyenne de 1 % par an (Sondik, 1994).

L'incidence du cancer du sein croît rapidement entre 40 et 50 ans, puis continue d'augmenter avec l'âge après la ménopause. En France, l'incidence annuelle des cancers du sein peut-être estimée à 39000 nouveaux cas par an, dont 28000 chez des femmes ménopausées. On peut considérer de manière large qu'une femme sur onze développera cette pathologie au cours de sa vie.

L'étiologie de la majorité des cancers du sein demeure inconnue, et il est possible que de nombreux facteurs, non encore identifiés, soient impliqués lors de l'initiation de cette pathologie. Cependant, un grand nombre d'éléments sont en faveur d'une place prépondérante des facteurs hormonaux dans l'étiologie de certains cancers du sein.

Les estrogènes jouent ainsi un rôle important dans le développement du tissu mammaire et leur contribution dans la croissance de certains cancers du sein a été reconnue il y a plus d'un siècle. En effet dès 1896, Georges Beatson rapportait pour la première fois une amélioration obtenue après ovariectomie chez une femme de 33 ans, qui présentait un cancer du sein inopérable. Même si le terme d'hormone n'existait pas encore, il s'agissait sans doute là de la première tentative d'hormonothérapie du cancer du sein (Beatson, 1896).

Aujourd'hui, on parle même pour certaines formes de cancers du sein, de cancers hormono dépendants qui sont induits par les estrogènes (Pasqualini, 1994). De nombreuses études ont ainsi révélé que l'estradiol avait la capacité de stimuler la croissance des cellules cancéreuses mammaires et d'en modifier l'aspect par une intense activité proliférative.

L'estradiol apparaît donc comme un facteur majeur de l'initiation et de la promotion du cancer du sein de type hormono dépendant.

Chez les femmes ménopausées, la production stéroïdienne des ovaires diminue progressivement pour pratiquement disparaître. La quasi-totalité de l'estrone et de l'estradiol produite chez les femmes après la ménopause est le résultat de la conversion périphérique des androgènes surrénaliens en estrogènes par un complexe enzymatique multicomposant: **l'aromatase** (Grodin *et al.* 1973).

Cette activité enzymatique a été détectée dans les 2/3 des cancers du sein (Lipton *et al.* 1992). Il faut également noter que les tumeurs mammaires des femmes ménopausées contiennent de fortes concentrations d'estrogènes alors qu'à cette période de la vie, les taux plasmatiques d'estrogènes s'effondrent (Edery *et al.* 1981). Il apparaît donc clairement que les estrogènes sont impliqués dans les formes hormono dépendantes du cancer du sein et on peut légitimement penser que l'aromatase présente un intérêt certain dans le métabolisme des tumeurs mammaires.

A la suite des travaux de Beatson en 1896, les manipulations hormonales se sont diversifiées et se sont imposées comme un des traitements les plus efficaces du cancer du sein. Actuellement, l'hormonothérapie se résume essentiellement à quatre modalités:

- La castration suivant toutes ses formes (chirurgicale, radiothérapique ou médicale par les analogues de la LH-RH).
- Les anti-estrogènes qui interagissent avec les récepteurs estrogéniques.
- Les progestatifs synthétiques à hautes doses.
- Les anti-aromatases qui inhibent la conversion périphérique des androgènes surrénaliens en estrogènes.

Bien que ces différentes hormonothérapies aient des mécanismes d'action variés, toutes concourent à la suppression de l'effet mitogène des estrogènes sur les cellules tumorales mammaires.

Cette dernière classe des anti-aromatase sera le sujet central de ce travail. Actuellement, un grand intérêt est porté au développement d'inhibiteurs de l'aromatase suffisamment efficaces pour être utilisés dans le traitement de patientes atteintes de cancer du sein (Reed *et al.* 1993). En effet, l'aromatase est une réaction unique dans la biosynthèse des stéroïdes puisqu'il s'agit de la dernière étape de la synthèse des estrogènes. Le blocage de l'aromatase n'affecte donc pas la synthèse des autres stéroïdes. C'est pour ces raisons que l'aromatase est une cible privilégiée à inhiber (Brodie, 1993).

CHAPITRE I: L'AROMATASE.

A. Nature de l'aromatase.

Il s'agit en fait d'un complexe enzymatique multicomposant associant:

- un cytochrome P450 spécifique dénommé P450 aromatase (P450_{arom}) ou P450XIX ou encore CYP19.
- une flavoprotéine ubiquitaire la NADPH réductase ou NADPH-cytochrome c réductase et la NADPH-cytochrome b₅.
- des phospholipides membranaires associés .

L'aromatase est donc une protéine héminique, associant une partie organique porphyrinique et un atome de fer divalent. Cet atome de fer est lié aux atomes d'azote du noyau porphyrine par quatre liaisons de coordination, mais conserve une liaison libre susceptible de capter une molécule d'oxygène. Cette liaison libre du fer participe donc au site catalytique de l'enzyme

L'aromatase fait partie de la super famille des hémoprotéines du type cytochrome P450 qui contient plus de 300 exemples différents (Nelson *et al.* 1993).

Les cytochromes P450 des espèces mammifères sont toujours des protéines membranaires qui nécessitent un traitement par des détergents pour être solubilisées, et ne peuvent donc pas être analysées par solubilisation et cristallographie. Ce sont donc des molécules dont la structure est encore aujourd'hui connue de manière incomplète.

Depuis 1987, on arrive cependant à déterminer par cristallographie la structure de certaines enzymes P450 issues de différentes bactéries. On a ainsi pu établir la structure de P450cam isolé à partir de *Pseudomonas putida* (Poulos *et al.* 1987), de P450terp isolé à partir de *Pseudomonas sp* (Haseman *et al.* 1994) et surtout de P450BM3 extrait de *Bacillus megaterium* qui est le seul à fonctionner avec un système NADPH- P450 réductase, comme les P450 de mammifères (Ravichandran *et al.* 1993).

En superposant les structures cristallographiques de ces trois différents types de P450 au niveau de la région de l'hème, on peut identifier une structure centrale très bien conservée pour ces molécules de cytochromes P450.

On a ainsi pu mettre en évidence des structures à type d'hélice qui sont très conservées et qui ont été baptisées hélices D, E, I, J, K, L; deux régions très similaires dénommées " β sheets" 1 et 2 et enfin la région de liaison à l'hème et son extrémité N-terminale appelée "meander" (Figure 1-1).

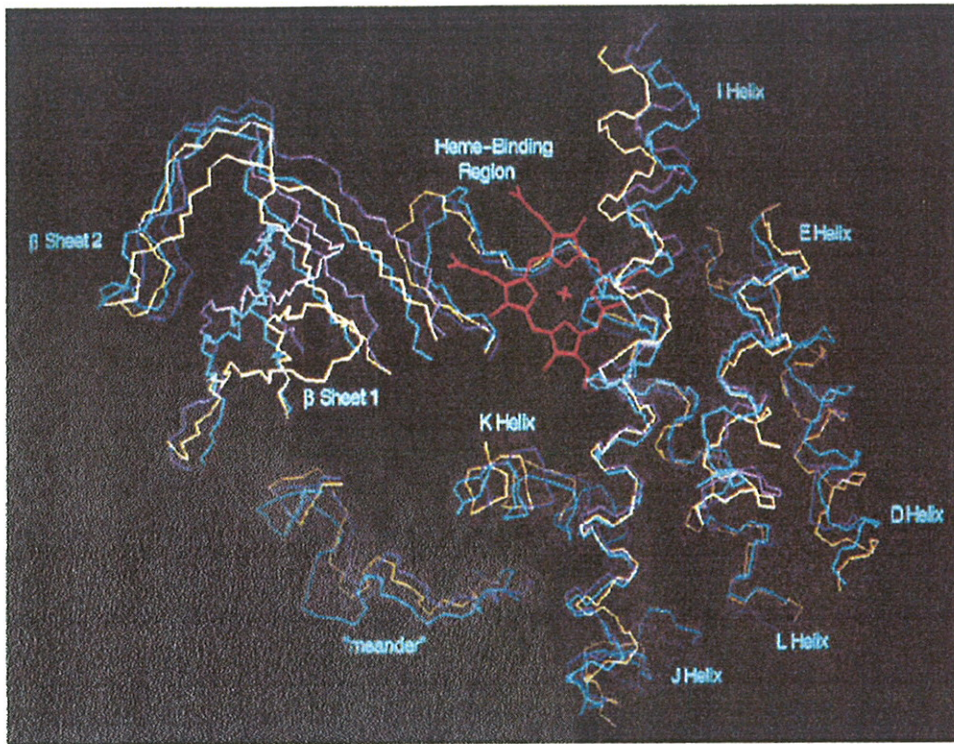


Figure 1.1: Structures superposées autour de la région de l'hème de différents P450 (d'après Graham-Lorence *et al.* 1995).

P450cam: jaune, *P450terp*: violet, *P450BM3*: bleu.

Ces structures sont très conservées y compris au niveau de leur alignement de séquences protéiques. En effet, phylogénétiquement, l'aromatase est une des protéines les mieux conservées (Simpson *et al.* 1993). L'analyse comparée des séquences protéiques d'aromatase humaine, de rat, de souris, de bovin et de poulet montre une très forte homologie entre elles.

On peut donc légitimement supposer que cette structure centrale est aussi commune à P450 aromatisase. On a donc essayé de construire un modèle structurel de P450 aromatisase autour de cette région conservée (Graham-Lorence *et al.* 1995). Pour les régions moins conservées entre les différents P450, on a choisi de prendre plutôt comme modèle le

P450BM3 qui est le plus proche de P450 aromatase. Ce modèle de structure a ensuite été évalué en effectuant des simulations dynamiques, afin de vérifier la cohérence de la structure au niveau stérique.

Enfin, pour compléter ce modèle, on a étudié les différentes manières dont se lient les principaux substrats à l'aromatase. On a ainsi pu décrire une sorte de tunnel d'accès au site de liaison. Les dimensions et la configuration de ce tunnel d'accès sont déterminées à partir des caractéristiques structurales des différents substrats pouvant se lier à l'aromatase. Le site d'activité lui-même a été construit, en partant du postulat que les substrats se lient au site d'activité de l'aromatase par l'intermédiaire d'interactions de type hydrophobe.

Nous avons donc un modèle de structure tri dimensionnel de la protéine d'aromatase (Figure 1.3). Il ne s'agit certes que d'une hypothèse de structure, mais ce modèle a été validé par la modélisation de l'action inhibitrice des différents énantiomères du vorozole. En effet l'énantiomère (S) du vorozole peut se lier au niveau du site d'activité du modèle alors que son énantiomère (R) inactif ne peut s'y loger.

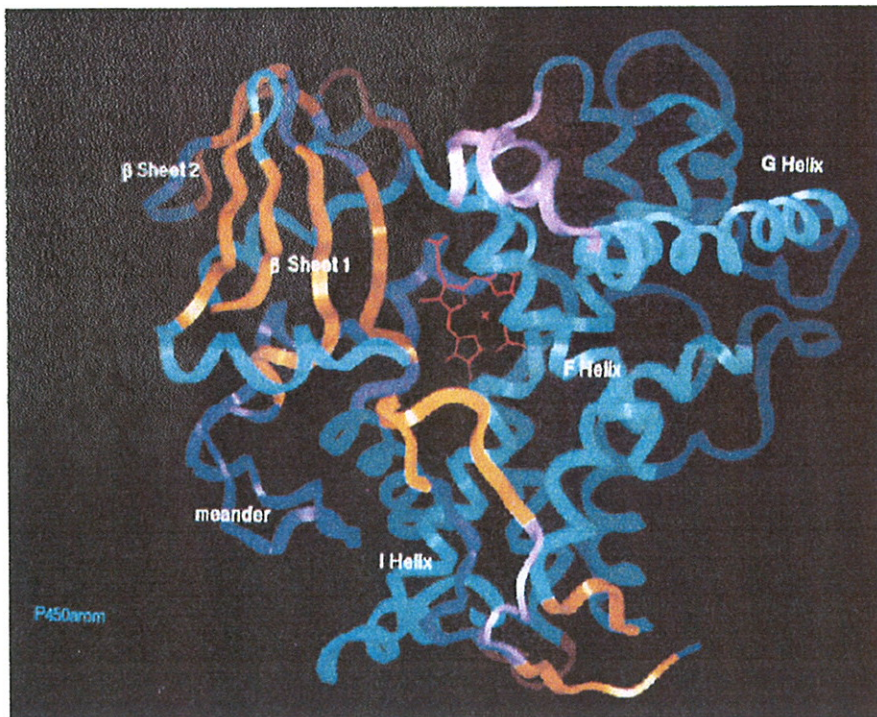


Figure 1.3: modèle structural de P450arom, vue du côté distal par rapport à la région de l'hème (d'après Graham-Lorence *et al.*1995).

Une autre approche possible pour définir la structure de l'aromatase est basée sur l'étude plus spécifique des modes de liaison des inhibiteurs sur la protéine. Il s'agit en fait de trouver des modèles de structure des sites actifs, permettant d'expliquer les propriétés inhibitrices d'un maximum de molécules et respectant leur mécanisme d'action (figure 1.4). Lors de ce type de travaux, on étudie les propriétés inhibitrices des molécules lorsque l'on fait varier certains paramètres, comme le degré de substitution de la molécule, la longueur des chaînes substituantes, la rigidité de la molécule ou même la nature de l'éventuel hétéroatome (Numazawa *et al.*1997).

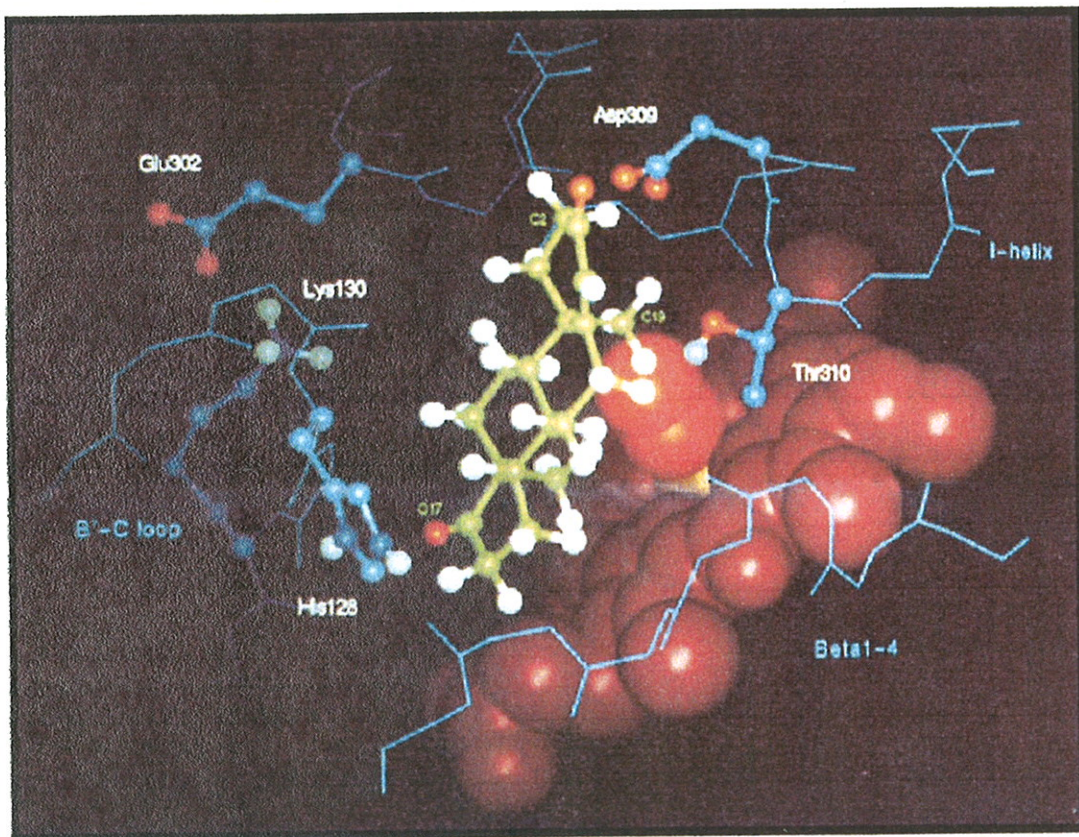


Figure 1.4: Modèle du site actif de l'aromatase, avec l'hème représenté en rouge et l'androstènedione comme substituant en vert (d'après Graham-Lorence *et al.*1995).

Grâce à ces différents types d'études, nous savons que l'aromatase possède deux sites de liaison distincts (Brodie *et al.* 1993) :

- le site d'activité de l'aromatase au niveau duquel se lient par exemple des substrats comme l'androstènedione (Auvray *et al.* 1998). Ce site est précédé d'une sorte de tunnel d'accès, et serait entouré de deux "poches" de liaisons hydrophobes (Tudor *et al.* 1996).
- un site de fixation proche du noyau porphyrinique de l'hème. A ce niveau, les inhibiteurs sont capables de se lier à l'aromatase par une liaison de coordination avec l'atome de fer hémique (Ahmed *et al.* 1995).

B. Distribution et localisation de l'aromatase.

L'aromatase, comme l'ensemble des cytochromes monooxygénases, possède une structure globulaire, enchâssée dans la double couche lipidique membranaire par son extrémité N-terminale. La majeure partie de l'enzyme est exposée à la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique (Means *et al.* 1989). Cependant, Amarneh et Simpson en 1996 ont détecté la présence d'aromatase ainsi que différents cytochromes P450 à la surface membranaire d'autres types cellulaires que le réticulum endoplasmique.

On a ainsi pu mettre en évidence la présence et l'activité de l'aromatase dans des préparations mitochondriales de placenta et d'autres tissus. On a même réussi à montrer que l'activité aromatasique des mitochondries était surtout localisée au niveau de leur membrane externe (Ortiz de Montellano, 1986).

Des activités aromatasiques ont donc pu être mises en évidence dans des fibroblastes en culture (Sasano et Ozaki, 1997), au niveau des seins, de l'endomètre (Miller, 1991), de la prostate (Hiramatsu *et al.* 1997) et des tissus osseux (Sasano *et al.* 1997).

Chez les femmes, l'aromatase est exprimée en premier lieu au niveau des cellules thécales de l'ovaire et ensuite de manière plus significative dans les cellules de la granulosa du follicule en développement (Inkster *et al.* 1991). Durant la grossesse, l'enzyme est retrouvée en abondance dans le syncytiotrophoblaste du placenta (Inkster *et al.* 1989).

Les tissus extraglandulaires sont une source non négligeable d'estrogènes chez la femme. Avant la ménopause seulement 10 à 15 % de la production totale d'estrone est d'origine extraglandulaire, alors que chez la femme post ménopausique, la quasi totalité des estrogènes a une origine extraglandulaire (Mauvais Jarvis *et al.* 1983).

Le tissu adipeux semble être un site important de cette aromatisation. En effet, Grodin *et al.* (1973) de même que Simpson *et al.* (1989) ont démontré *in-vitro* la possibilité de transformation des androgènes en estrogènes au niveau des cellules adipeuses. Ce mécanisme est sans doute responsable d'une augmentation de la concentration des estrogènes au niveau mammaire qui est un tissu riche en cellules adipeuses.

Les femmes ménopausées produisent en moyenne 100 µg d'estrone par jour (plus en cas d'obésité), dont la plus grande partie est convertie en estradiol par la 17β-hydroxystéroïde deshydrogénase pour donner des concentrations circulantes de 10 à 20 pg d'estradiol (Kirschner *et al.* 1982). Bien que ces taux plasmatiques circulants d'estradiol soient bas, les concentrations dans les tissus de cancer mammaires peuvent être jusqu'à dix fois supérieurs (Edery *et al.* 1981). On incrimine donc une aromatisation à l'intérieur même du tissu tumorale, d'autant plus que l'aromatase est détectée dans les deux tiers des cancers du sein humains (Lipton *et al.* 1992).

L'activité de l'aromatase n'est pas détectable dans le tissu endométriale sain, mais cette enzyme est exprimée de manière aberrante lors des endométrioses (Toda *et al.* 1993, Bulun *et al.* 2000).

Chez l'homme, l'aromatase est présente au niveau des testicules dans les cellules de Leydig (Brodie *et al.* 1993). On pense que l'estradiol produit par cette aromatase testiculaire pourrait être impliqué dans la régulation de la biosynthèse des androgènes et dans la prolifération des cellules de Sertoli et de Leydig (Payne *et al.* 1987).

Très tôt, lors du développement, on peut détecter une production locale d'estrogènes dans le cerveau qui est essentielle au développement du phénotype masculin (Naftolin *et al.* 1975). On a de plus retrouvé la présence d'aromatase dans certaines structures du système nerveux central. Les stéroïdes issus de l'activité de l'aromatase, pourraient donc agir comme de véritables neurostéroïdes (Lephart, 1996).

Les résultats de Bershtein *et al.* (1996) suggèrent que le tissu musculaire serait aussi un site important d'aromatation.

C. Les gènes de l'aromatase.

Le cytochrome P450 est généralement décrit comme étant codé par un seul gène situé sur le chromosome 15, sur la bande q21 (Chen *et al.* 1988) et ne donnant qu'une seule enzyme (Toda *et al.* 1990).

Cependant, on a récemment montré l'existence de différents gènes de CYP 19 qui coderaient des isoformes d'aromatase au niveau du cerveau et des ovaires, chez des poissons rouges (Tchoudakova, 1998).

Ce gène de l'aromatase humaine est composé de dix exons et de neuf introns (Harada *et al.* 1990). Il possède le même nombre d'exons et d'introns que la plupart des autres cytochromes P450 intervenant dans la stéroïdogénèse, mais il s'étend sur plus de 70 kb au niveau du génome (Figure 1.5).

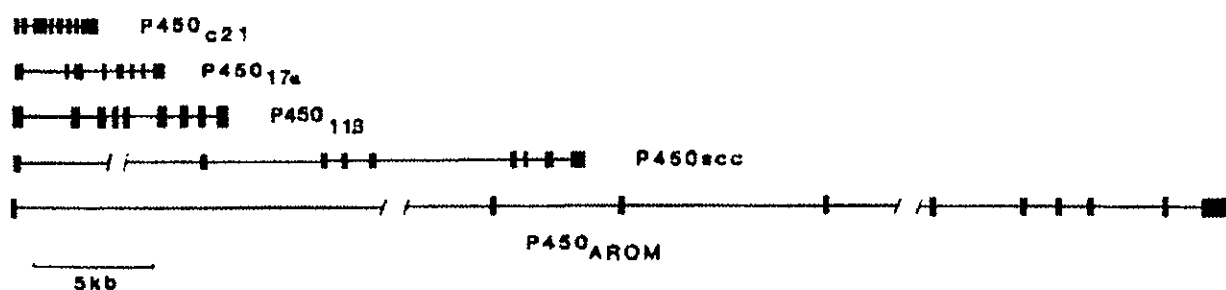


Figure 1.5: Alignement de gènes de différents cytochromes P-450 avec celui de l'aromatase (d'après Simpson *et al.* 1993).

Les exons des différents gènes sont représentés par les rectangles noirs. P450_{c21} : gène de la 21-hydroxylase; P450_{17α} : gène de la 17α-hydroxylase; P450_{11β} : gène de 11β-hydroxylase; P450_{ssc} : gène de la cholestérol monooxygénase (*side chain cleaving*); P450_{AROM} : gène de l'aromatase.

La région codante qui s'étend sur environ 32 kb ne contient que 9 exons et commence au niveau de la 38^{ème} paire de base du 2^{ème} exon. Chaque exon détermine une spécificité de la protéine:

- l'exon II va ainsi conditionner l'ancrage membranaire de la protéine.
- l'exon III permet la reconnaissance du substrat et la formation du canal d'accès au site d'activité.
- l'exon X détermine la région de fixation à l'hème, qui est commune aux différents P450 (Toda *et al.* 1990).

L'organisation du 1^{er} exon du gène de l'aromatase est unique dans la famille des cytochromes P450. En effet, le 1^{er} exon, non codant, sert de région régulatrice au gène et serait en fait constitué de plusieurs exons répartis sur plus de 35 kb en amont de l'exon II (Toda *et al.* 1996). La région réellement codante de 9 exons démarre donc en fait au niveau de l'exon II.

En faisant des amplifications et des séquençages d'ADNc, dérivés de transcrits de P450_{arom} présents dans des tissus variés, on s'est aperçu que la partie 5' terminale de l'ensemble de ces transcrits différait suivant leur provenance. L'ARNm de l'aromatase subirait donc un épissage particulier au niveau du 1^{er} exon selon le tissu dans lequel se trouve l'aromatase (Bulun *et al.* 1997). La nomenclature, ainsi que le nombre de ces exons non codants, sont variables et différent selon les auteurs, cependant la nomenclature issue de l'équipe de Simpson *et al.* 1989 semble être la plus couramment utilisée.

Ces exons non codants: I.1.2a, I.4, I.2, I.3, I.5, PII et 1f seraient temps et tissus dépendants. L'exon PII, partie non traduite de l'exon II, est retrouvé sur l'ensemble des transcrits quelle que soit leur provenance (Zhou *et al.* 1996). Les exons I.1.2a et I.2 seraient principalement utilisés au niveau du placenta, les exons I.4 et I.3 au niveau du tissu adipeux, l'exon I.4 étant aussi utilisé au niveau du foie et de la peau, l'exon I.5 serait utilisé au niveau du foie et des intestins chez le fœtus humain et enfin l'exon 1f serait spécifique des transcrits de l'aromatase au niveau du cerveau.

La compréhension des mécanismes liés à ces exons est d'autant plus importante que l'on a trouvé l'existence de plusieurs types d'exons I dans les cancers mammaires chez les femmes ménopausées. Les études ont de plus montré que les différents ARNm isolés à partir de tumeurs mammaires contenaient entre autres les exons PII et I.3, suggérant l'utilisation de promoteurs majeurs dans la régulation transcriptionnelle de cette enzyme, dans les cancers du sein.

D. Mécanisme de l'aromatase.

L'aromatase catalyse la conversion des androgènes tels que la testostérone ou l'androstènedione en estrogènes (estradiol et estrone), via trois hydroxylations successives et une déformylation oxydative de ceux-ci (figure 1.6). Cette réaction met en jeu trois étapes d'hydroxylations, chacune utilisant un équivalent moléculaire de NADPH et d'oxygène. Ces hydroxylations successives aboutissent à la perte du groupement méthyle angulaire du C19 et l'aromatisation du cycle A du stéroïde (Thomson *et al.* 1974).

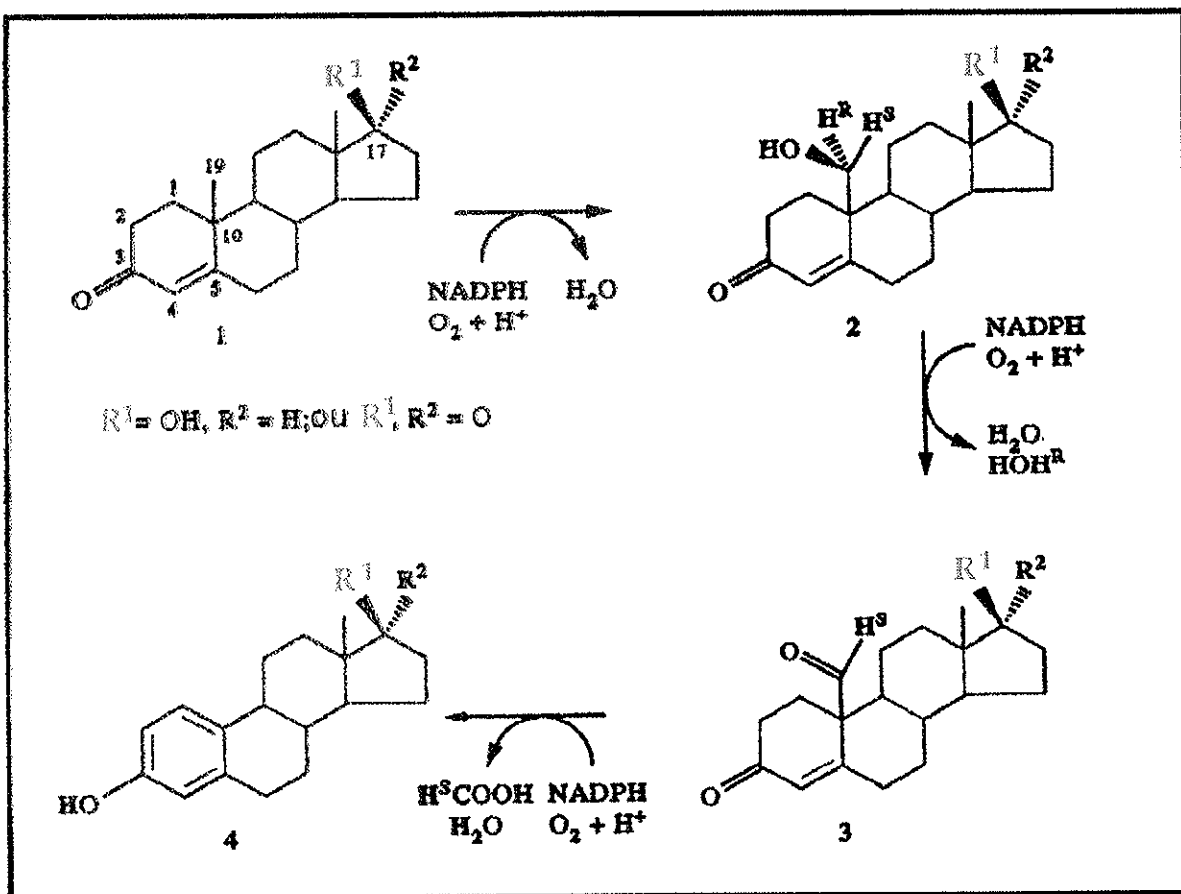


Figure 1.6: Conversion des androgènes en estrogènes par l'aromatase (d'après O.H.S. S. *et al.* 1993).

Les deux premières étapes d'hydroxylation sont des "hydroxylations types", décrites pour les cytochrome P450, avec maintien de la structure. Lors de la troisième étape oxydative, les atomes d'oxygènes, provenant chacun de la première et de la troisième molécule d'oxygène

consommées, sont incorporés dans l'acide formique formé avec le groupement méthyle du C19 (Akhtar *et al.* 1982).

Le mécanisme de la conversion des androgènes en estrogènes est constitué de trois étapes, chaque étape nécessitant une mole de NADPH et d'oxygène (Thompson et Siiteri, 1974). De manière schématique et globale, on a donc lors de ce processus, une aromatisation du cycle A, avec élimination du méthyle 19 et des hydrogènes en 1 β et 2 β .

Les deux premières oxydations s'effectuent sur le groupement méthyle en position 19 de la testostérone ou de l'androstènedione, pour donner dans un premier temps des intermédiaires 19 hydroxylés: 19-hydroxytestostérone et 19-hydroxyandrostènedione. Dans un deuxième temps, nous obtenons les intermédiaires oxo-testostérone et 19-oxo-androstènedione. La déformylation intervient ensuite pour donner des composés dienolones et dienones qui sont les dernières étapes avant d'obtenir les estrogènes (figure 1.7).

Les deux premières étapes sont relativement bien connues, la troisième reste pour le moment l'objet de diverses théories.

Les deux premières étapes oxydatives sont des hydroxylations typiques des cytochromes P450. Il y a conservation de la configuration stéréochimique du substrat et perte de l'hydrogène Pro R; situé en 19 sur l'intermédiaire hydroxylé en 19; au profit d'une molécule d'eau. De plus, en passant du composé 19 hydroxylé au composé 19-oxo, on a conservation de l'atome d'oxygène du substituant en 19 (Oh *et al.* 1993). Lors de la rupture de la liaison C10-C19 l'hydrogène 1 β est perdu de manière stéréospécifique, au profit du milieu aqueux..

Lors de la troisième étape, les atomes d'oxygène dérivés des premières et deuxièmes molécules d'oxygène consommées, sont incorporées dans de l'acide formique formé avec le groupe méthyle 19 (Akhtar *et al.* 1982).

Pour expliquer le mécanisme de la troisième étape, certains auteurs ont suggéré un mécanisme impliquant une attaque par des radicaux nucléophiles. Ces radicaux n'ayant pas été isolés, on ne connaît pas leur nature exacte, et trois types de mécanismes sont proposés (Ahmed *et al.* 1995).:

- Une attaque par un radical ferroxyl (Fe-O•)
- Une attaque par un radical peroxyde (Fe-O-O•)
- Un mélange des deux mécanismes.

En 1993, Oh et Robinson ont proposé un mécanisme détaillé du mode d'action de l'aromatase. Cette hypothèse de mécanisme ne fait pas l'unanimité, mais est souvent reprise

comme étant sans doute le modèle le plus vraisemblable. En effet, ce mécanisme permet d'expliquer la stéréospécificité et la stéréosélectivité des deuxièmes et troisièmes étapes.

Ainsi selon Oh et Robinson, lors de la première étape, le substrat androgénique se lie au site actif, orienté de façon à ce que l'hydrogène du méthyle 19 soit perpendiculaire au plan de l'hème. Ceci est possible grâce à la liaison du substrat à différents résidus du site actif. En effet, ces résidus établissent des liaisons hydrogènes avec le groupement cétonique en 3 et le groupement hydroxyle en 17. Nous avons donc un véritable ancrage du substrat à l'intérieur même du site actif, par un ensemble de liaisons hydrophobes. Ainsi, la fonction cétone en 3 du substrat établirait une liaison hydrogène avec l'histidine 128 de l'aromatase.

L'emplacement de l'hème est considéré comme étant voisin des carbones 1, 2, 10 et 19 du côté β du noyau stéroïdien (Graham-Lorence *et al.* 1991). On a de plus montré l'importance de la présence d'un résidu acide, le Glu-302, à proximité de l'hydrogène 2- β et du méthyle 19. En effet, lors de l'hydroxylation du substrat, la rotation de l'intermédiaire 19 hydroxylé autour de la liaison C10-C19 est restreinte du fait d'une liaison hydrogène entre le groupe 19 hydroxyle et le résidu Glu-302. Cette interaction est donc capitale à la stéréochimie de la réaction. L'ancrage du groupe hydroxyle 19 et la liaison hydrogène entre le groupe cétonique en 3 et l'histidine 128 peuvent expliquer la perte stéréospécifique de l'hydrogène 19-pro R lors de la deuxième étape.

Si l'on admet que la réaction se déroule selon un mécanisme de "rebond" de l'oxygène (figure 1.8, voie a), l'intermédiaire 19,19-gem-diol, lié au site actif par les deux points d'ancrage décrits ci-dessus, subit alors une déshydratation conduisant à l'intermédiaire 19-oxo du stéroïde et à la forme acide carboxylique du résidu Glutamine-302.

Le mécanisme de perte de l'hydrogène (figure 1.8, voie b), conduirait au même résultat stéréochimique avec maintien des liaisons hydrogènes entre l'intermédiaire formé et le site actif.

Grâce à la liaison hydrogène avec le résidu glutamate, la fonction 19 carbonyle est activée et l'intermédiaire 19-oxo se retrouve orienté de façon idéale dans le site actif pour y subir une attaque nucléophile. Cette attaque nucléophile se produirait grâce à l'intermédiaire peroxyde ferrique de l'hème au début de la troisième étape d'oxydation. Lors de cette attaque nucléophile, un proton serait transféré de l'acide glutamique vers l'oxygène 19 du stéroïde. Le groupe carboxylate résultant pouvant alors capter l'hydrogène 2 β , ce qui conduirait à une énolisation du groupe cétonique en 3. Le cycle A changerait alors de conformation du fait même de cette énolisation entre les C2 et C3 (figure 1.9).

A ce stade les liaisons hydrogènes entre les oxygènes 3 et 19 du stéroïde et les résidus du site actif disparaissent. Le changement de structure de ce dernier intermédiaire stéroïdien intervient alors avec une déshydratation et un transfert de proton (Cole *et al.* 1991). A la suite de ce changement de structure on a donc séparation de l'enzyme, de l'estrogène formé et d'une molécule d'acide formique.

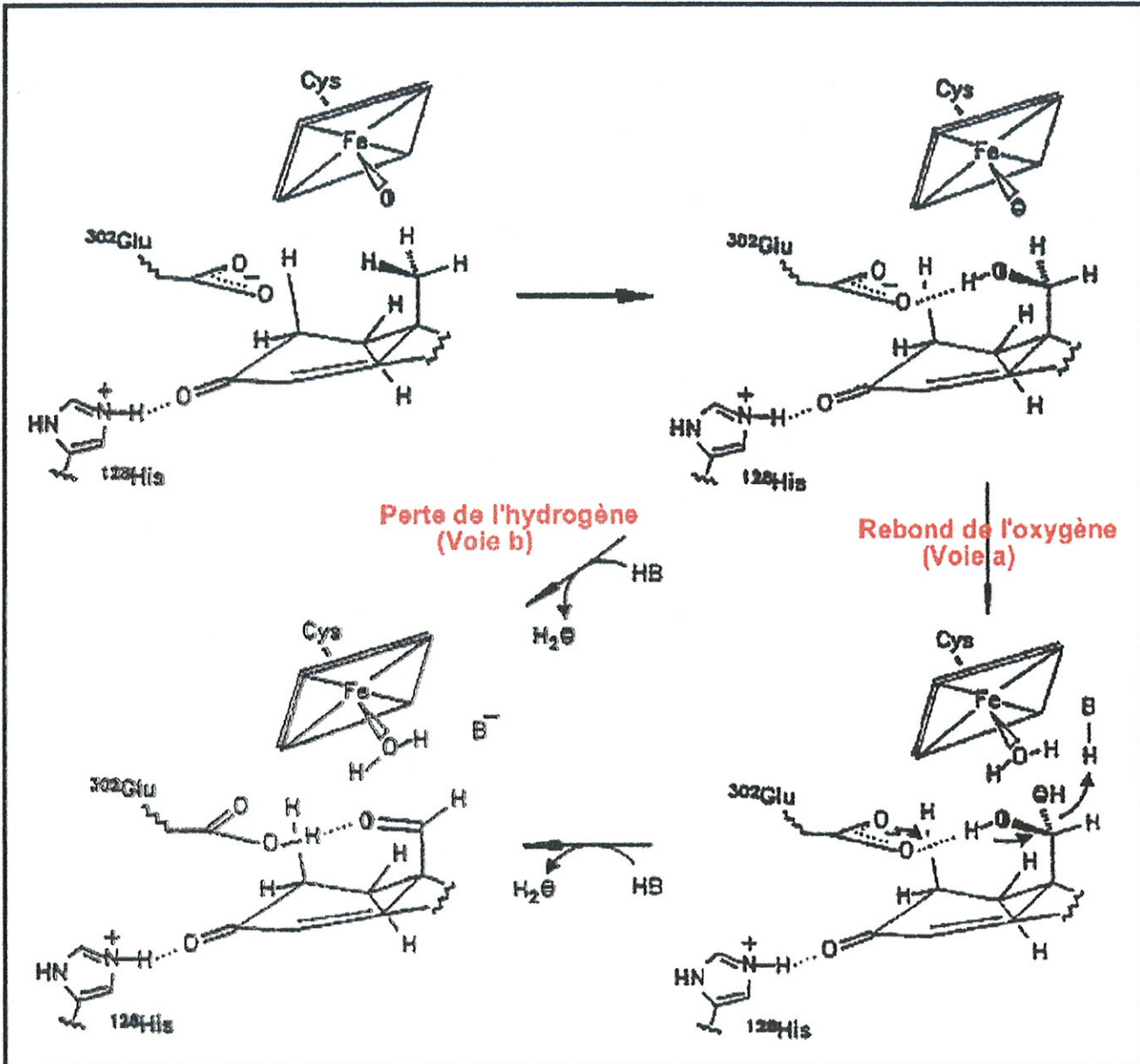


Figure 1.8: Première et deuxième étapes oxydatives du mécanisme d'action de l'aromatase (d'après O.H.S. S. *et al.*1993).

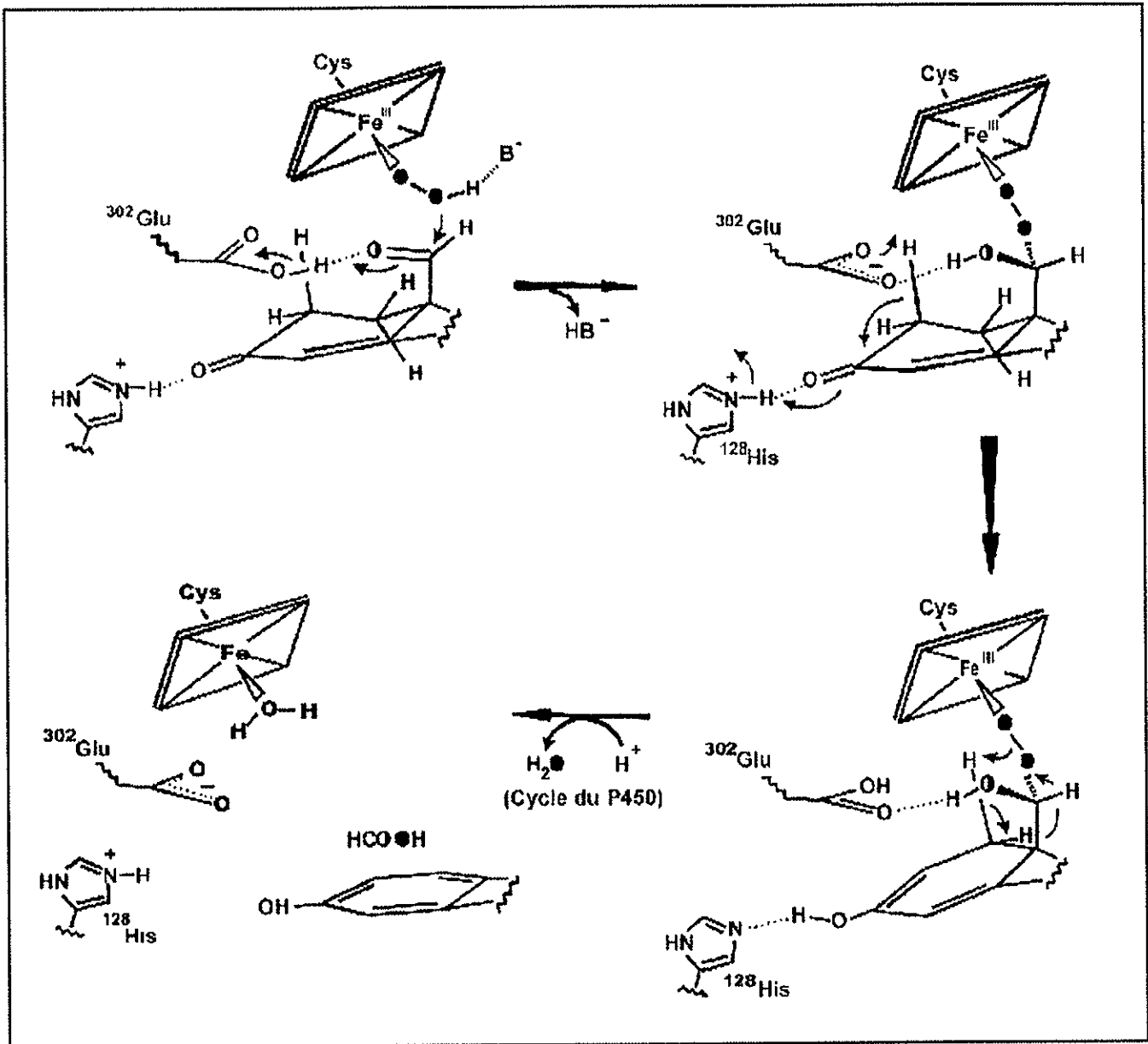


Figure 1. 9: Troisième étape du mécanisme d'action de l'aromatase (d'après O.H.S. S. *et al.* 1993).

E. Rôles de l'aromatase.

1. Rôle principal de l'aromatase.

Avant la ménopause, l'aromatation des androgènes en estrogènes se déroule surtout au niveau du tissu thécal des ovaires, dans les cellules de la granulosa. L'activité de cette aromatase étant sous le contrôle de la Folliculing Stimulating Hormone (FSH), l'activité de l'aromatase est maximale lors de l'ovulation (activité aromatasique dix fois supérieure qu'en dehors de cette partie du cycle).

Après la ménopause, la production glandulaire des estrogènes par les ovaires devient négligeable mais la synthèse des stéroïdes par les glandes surrénales demeure, en particulier celle d'androgènes comme la Déhydroépiandrostérone (DHA) et son ester le sulfate de Déhydroépiandrostérone (SDHA). Ces androgènes surrénaux servent ensuite de précurseurs à la synthèse d'androstènedione et de testostérone qui peuvent alors être transformés en estrogènes sous l'action de l'aromatase. Cette aromatisation périphérique des estrogènes est la principale source d'estrogènes chez la femme ménopausée (Lønning, 1996).

En dehors de cette implication dans le métabolisme des estrogènes, les autres rôles que peuvent jouer l'aromatase sont mal connus.

On s'intéresse beaucoup à l'éventuel rôle de l'aromatase au niveau cérébral lors du développement embryonnaire. L'aromatase que l'on détecte au niveau cérébral pourrait ainsi jouer un rôle, lors du développement, dans la différenciation sexuelle. Son inhibition, chez des poissons de type *tilapia*, au cours de leur développement conduisant à une masculinisation des sujets (Kwon *et al.* 2000).

2. Autres activités catalytiques de l'aromatase.

Outre l'activité de conversion des androgènes en estrogènes, l'aromatase possède plusieurs autres activités hydroxylases. En effet, ces activités catalytiques secondaires permettent, soit à partir des produits issus de l'aromatation, soit à partir d'autres substrats, la synthèse d'androstènedione hydroxylée en position 1 et 2 ou de cathécollestrogènes (2, 4 et 6 α -hydroxyestradiol)(Osawa *et al.* 1993 et 1997).

De plus, il semblerait que l'aromatase possède aussi une activité cocaïne N-déméthylase (Osawa *et al.* 1997).

3. Substrats de l'aromatase.

La mesure des concentrations endogènes des hormones pouvant servir de substrats à l'aromatase révèle des taux élevés d'androstènedione. Ce substrat est retrouvé en plus faible quantité dans les tumeurs mammaires, ce qui peut être en accord avec l'hypothèse selon laquelle, l'androstènedione serait le principal substrat de l'aromatase convertissant les stéroïdes au niveau du tissu cancéreux. En effet, *in-vivo* le premier produit formé est l'estrone, ensuite a lieu la conversion en estradiol catalysée par la 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase. On peut d'ailleurs noter qu'au sein des tissus malins, on retrouve surtout de l'estradiol (Thijssen *et al.* 1993).

F. Méthodes d'études de l'activité de l'aromatase.

La méthode classique d'étude de l'activité de l'aromatase a été décrite en 1974 par Thompson et Siiteri, il s'agit de la méthode dite de "l'eau tritiée". Ce protocole consiste à faire incuber l'aromatase dans un système régénérateur de NADPH (figure 1.10) en présence de substrats marqués par de l'eau tritiée ((1,2- ^3H) androstènedione). La source d'aromatase étant en général des microsomes placentaires. L'activité est mesurée par le suivi du taux d'incorporation de l'hydrogène marqué dans l'eau du milieu d'incubation. Cette méthode a été la première décrite et sert encore aujourd'hui de méthode de référence.

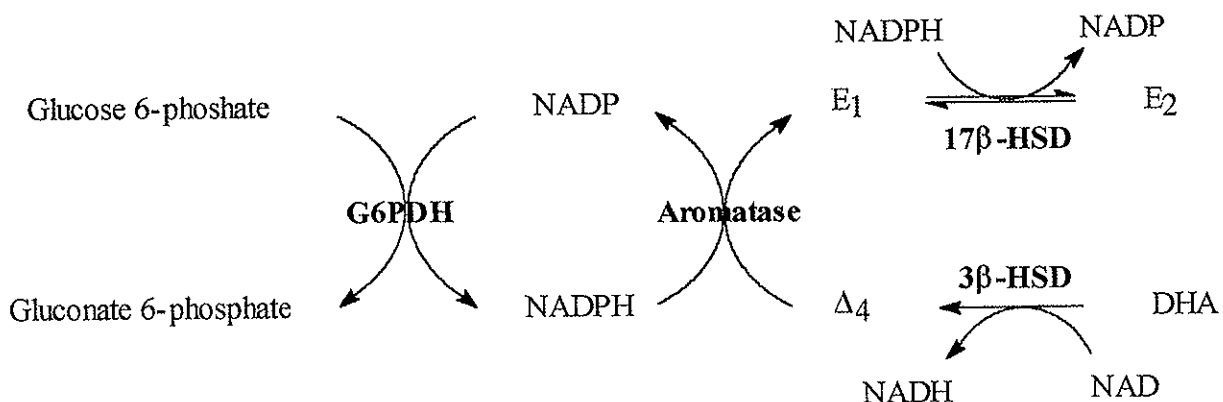


Figure 1.10 : Principe d'étude des différentes activités enzymatiques et son système régénérateur de NADPH.

G6PDH : glucose 6-phosphate déshydrogénase ; *3β-HSD* : 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase Δ_5/Δ_4 isomérase ; *17β-HSD* : 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase.

Cette méthode ne permet cependant pas de mesurer l'activité intra tumorale de l'aromatase. D'autres équipes ont donc cherché à améliorer cette méthode afin d'avoir accès à la mesure de cette activité tumorale. On utilise ainsi des modèles animaux sur lesquels on induit de manière chimique des tumeurs mammaires par l'administration de diméthylbenzanthracène (DMBA). On dispose ainsi de grandes quantités de cellules cancéreuses mammaires. Cette méthode d'étude *in vitro* permet d'avoir des valeurs d'activité plus proches de ce que doit être l'activité aromatasique physiologique au sein d'une tumeur mammaire (Dikkeschei *et al.* 1996).

La simple mesure du taux d'incorporation de l'hydrogène tritié dans le milieu aqueux ne donne pas un résultat d'une très grande précision. On a donc cherché à améliorer cette méthode en perfectionnant les moyens de détection des produits formés lors de la réaction.

On peut ainsi utiliser une chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (Dikkeschei *et al.* 1996), ou une chromatographie liquide haute pression (HPLC) couplée à un compteur de radioactivité (Le Bail *et al.* 1998). Ces méthodes permettent de plus une identification précise des produits de la réaction et une vision plus globale de l'implication de l'aromatase dans le métabolisme des estrogènes.

G. Régulation de l'activité de l'aromatase.

L'analyse de la région promotrice, ainsi que les régions des premiers exons non traduits, a suggéré la présence de certains motifs consensus (Simpson *et al.* 1996). On a ainsi pu mettre en évidence en amont du codon "start" une boîte "TATAA" à -23 pb, des boîtes "CAAT" à -41, -67, et -83 pb, une séquence du facteur de transcription Sp1 (boîte CG), mais aussi des séquences incluant différents éléments de régulation:

- Aux glucocorticoïdes (GRE) à -352 pb ainsi que dans le premier intron à +346 pb.
- A l'AMPc (CRE) à -211 pb.
- Aux interférons (GAS: interferon- γ activating sequence).

1. Stéroïdes.

Certains glucocorticoïdes endogènes ou synthétiques ont la capacité d'activer l'expression de l'aromatase dans de nombreux tissus périphériques. Ainsi la dexaméthasone,

qui est un glucocorticoïde hémisynthétique, peut stimuler l'expression de l'aromatase dans de nombreux types cellulaires et dans différents tissus (Berkovitz *et al.* 1988). Cette stimulation se fait dans un premier temps par fixation du glucocorticoïde au niveau d'un site récepteur et activation de ce site. Ce complexe ligand-récepteur va ensuite se lier à son élément de réponse (GRE).

Le cortisol, qui est un glucocorticoïde endogène peut induire l'activité de l'enzyme au niveau des tissus adipeux (Ryde *et al.* 1992).

De manière générale, on décrit les glucocorticoïdes comme de puissants inducteurs de l'activité du complexe de l'aromatase lors des expérimentations *in vitro* (Lønning *et al.* 1988), cependant *in vivo*, on ne retrouve pas de manière vraiment significative cette propriété d'activation de l'expression de l'enzyme.

2. AMPc.

Mendelson *et al.* (1982) ont montré que certaines formes analogues de l'AMPc, comme par exemple le dibutyryl-AMPc [(Bu)₂ AMPc], pouvaient augmenter de quinze fois l'activité aromatasique de cellules dérivant de tissus adipeux humains.

L'AMPc ainsi que son analogue [(Bu)₂ AMPc] possèdent ainsi la capacité d'activer la phosphorylation de la protéine CREB (cAMP Response Element Binding Protein) par l'action d'une protéine kinase AMPc dépendante permettant sa fixation sur son élément de réponse CRE (Etienne, 1996).

3. Cytokines.

De nombreuses recherches ont été effectuées afin de déterminer l'influence des cytokines sur l'expression de l'aromatase au sein de différents types cellulaires. Les cytokines IL-1, IL-6, TNF α en présence de dexaméthasone pourraient ainsi induire une augmentation de l'expression de l'aromatase aussi bien dans les tissus sains que dans les tissus tumoraux (Mac Diernid *et al.* 1994).

De même, des facteurs incluant IL-1 comme l'oncostatine M (OSM) ou le facteur d'inhibition des leucémies (LIF) pourraient induire une augmentation de l'expression de l'aromatase dans certains types cellulaires comme les fibroblastes (Zhao *et al.* 1995).

De plus, lors de la culture de certaines cellules cancéreuses mammaires ou fibroblastiques, on a pu détecter dans le milieu d'incubation des cytokines qui permettraient une stimulation de l'expression de P450 aromatasase au sein de ces cellules (Reed *et al.* 1993). Mais cette propriété des cytokines n'est pas observée de manière systématique et dépend en partie du type cellulaire cultivé.

Ces différentes cytokines agissent en se fixant sur l'association de deux glycoprotéines transmembranaires de 80 et 130 kDa. Lors de la fixation des cytokines à ces glycoprotéines, on a association de ce complexe à une protéine cytosolique (Jak) qui, par une cascade de réactions de phosphorylations entraîne la dimérisation d'un facteur de transcription cytosolique (STAT) et sa fixation sur un élément spécifique de réponse (Simpson *et al.* 1996).

3. FSH

L'ovaire comporte un tissu stromal ou interstitiel soumis à la régulation de la LH (Luteinizing Hormone) qui contrôle la production d'androstènedione et un tissu thécal, les cellules de la granulosa, sous l'influence de la FSH qui régule l'aromatase présente pour fabriquer l'estrone et l'estradiol du follicule ovarien (figure 1.11).

Le taux d'aromatase est donc maximal lors de l'ovulation (8 à 10 fois le taux observé lors des menstruations).

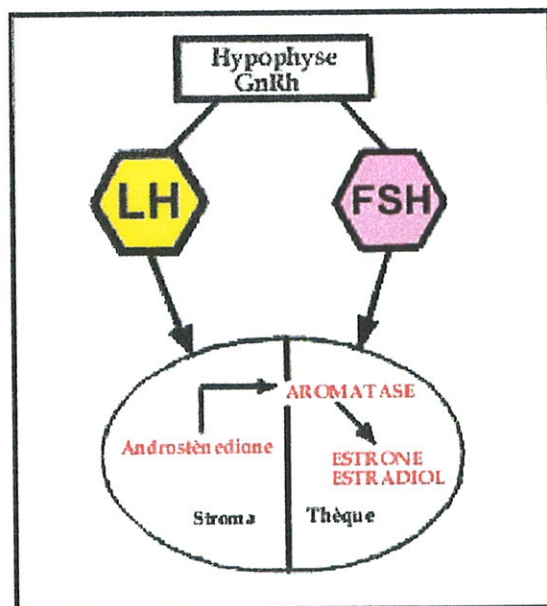


Figure 1.11: Régulation de l'activité de l'aromatase au niveau des ovaires.

**CHAPITRE II: LES
IMPLICATIONS
PATHOLOGIQUES DE
L'AROMATASE.**

Les estrogènes sont impliqués dans de nombreuses pathologies. L'aromatase étant une source d'estrogènes, cette enzyme joue un rôle important dans de nombreuses affections ayant une composante hormonale estrogénique. Bien évidemment le cancer du sein est la première de ces affections, et c'est pour cette indication principale que dans un premier temps on a développé les inhibiteurs de l'aromatase. Cependant, de récentes études tendent à montrer qu'il serait possible d'utiliser ces inhibiteurs de l'aromatase pour d'autres pathologies comme par exemple l'endométriose (Bulun *et al.* 1999, 2000), les carcinomes ovariens (Sasano *et al.* 1999) ou les pubertés précoces (Feuillan *et al.* 1999).

Les gynécomasties sont aussi des pathologies largement influencées par un déséquilibre estrogénique et pourraient donc répondre positivement à une action de molécules inhibitrices de l'aromatase (Braunstein, 1999).

On parle même maintenant d'une possible utilisation d'anti-aromatase dans certains cas d'hyperplasie bénigne de la prostate (Sciarra *et al.* 2000).

A. Le cancer du sein.

1. Epidémiologie.

Le cancer du sein est la principale cause de morbidité et de mortalité chez les femmes, ceci étant encore plus net chez les femmes âgées de 35 à 55 ans. Son incidence varie selon les pays, les chiffres les plus mauvais étant retrouvés dans les pays les plus développés. Ainsi l'incidence du cancer du sein (nombre de nouveaux cas recensés pour 100000 personnes et par an) est de 99 pour 100000 en Europe de l'ouest et de 113 pour 100000 aux Etats Unis (Reddy, 1998). L'incidence annuelle des cancers du sein en France peut être estimée à 39000 nouveaux cas, dont 28000 chez des femmes ménopausées (chiffres estimés à partir des données du registre du cancer 1995).

Dans la communauté européenne, une femme sur douze présente un risque de développer un cancer du sein. Ce type de cancer présente une incidence de 25 à 29 % sur l'ensemble des cancers féminins et un taux de mortalité de 15 à 18 % (Pasqualini, 1994).

La prévalence de ce cancer est en augmentation et en 1998, on estimait que près d'un million de nouveaux cas seraient diagnostiqués à travers le monde pour l'année 2000 et que près de 400000 femmes décèderaient de cette affection (Reddy, 1998).

Depuis les années 50, on constate une augmentation régulière de l'incidence, de l'ordre de 2 % par an. Malgré les progrès des méthodes de diagnostiques, en particulier de la mammographie et des avancées thérapeutiques, le taux de mortalité s'élève également mais de manière plus faible, soit environ 0.5 % par an et concerne surtout les femmes entre 60 et 74 ans, alors qu'il reste stable en dessous de 44 ans (Grumbach, 1996). L'âge moyen de la survenue du cancer du sein est de 58 ans, 70 % des cas surviennent après 50 ans et plus de 30 % se déclarent après 70 ans.

Ces données chiffrées montrent l'importance du problème chez les femmes ménopausées. Il est aujourd'hui évident que les facteurs hormonaux occupent une place prépondérante dans l'étiologie des cancers du sein. Cependant, l'origine d'un cancer du sein est manifestement multifactorielle. Le cancer du sein se développant dans un tissu dont la structure subit des variations cycliques et périodiques au cours des différents épisodes de la vie gynécoobstétricale. De nombreux facteurs de risque ont cependant pu être identifiés.

2. Facteurs de risque.

2.1. Facteurs de risques liés aux mastopathies bénignes.

De nombreux auteurs ont montré que les mastopathies bénignes multipliaient par deux le risque de cancer du sein. Le risque est différent selon la nature des anomalies morphologiques constatées (mastose sclérokystique, métaplasie, hyperplasie épithéliale), selon leur importance (hyperplasie proliférante, modérée ou légère) et selon le siège (au niveau des galactophores, des lobules ou au sein d'un foyer fibreux). Le risque est également différent selon le degré d'atypie des cellules ou selon les caractéristiques du tissu conjonctif mammaire. En résumé, les différentes études menées montrent que le risque le plus élevé semble correspondre aux maladies fibrokystiques associées à une hyperplasie proliférante et à un degré élevé d'atypie cellulaire.

Néanmoins, seul un très petit nombre de femmes atteintes de maladies bénignes du sein seront atteintes d'un cancer du sein (environ 8 % à 54 ans) et parmi les femmes atteintes d'un cancer du sein, rares sont celles qui avaient été opérées pour une lésion bénigne.

2.2. Facteurs génétiques.

Le risque lié à l'existence d'une lésion pré-cancéreuse est accru s'il existe des antécédents familiaux de cancer du sein. Le risque de cancer du sein est augmenté d'environ deux fois lorsque la mère ou la sœur est atteinte. Ce risque est encore accru si plusieurs parentes sont touchées (Gail *et al.* 1989) et ce, d'autant plus que le cancer est survenu jeune. Ainsi, un antécédent familial, avec un âge au moment du diagnostic supérieur à 60 ans ne serait plus un facteur de risque (Claus *et al.* 1990). Les cancers "familiaux" ne représenteraient en fait que 7 % des cancers du sein.

Des gènes de prédisposition BRCA₁ et BRCA₂ ont été localisés respectivement sur les chromosomes 17q21 et 13q. Les femmes qui héritent d'anomalies sur le gène BRCA₁ (Breast Cancer 1) ont un risque extrêmement élevé de développer un cancer du sein (87 % à 70 ans) et/ou un cancer de l'ovaire. Par contre, une anomalie sur le gène BRCA₂ s'associe uniquement à une augmentation du risque de cancer du sein. Certaines études suggèrent que ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Cannon-Albright *et al.*

1996). Parallèlement, une altération ou une perte du gène suppressif P53 a été identifiée chez des femmes avec un cancer du sein héréditaire. Il existe des familles pour lesquelles ces particularités génétiques sont transmises d'une génération à l'autre et qui présentent une multitude de cancers (par exemple dans le syndrome de Li Fraumeni qui est une association familiale de cancers).

2.3. Facteurs nutritionnels.

Un grand nombre d'arguments est en faveur d'une corrélation entre des facteurs nutritionnels et le risque de cancer du sein. Des études expérimentales menées chez l'animal, des études géographiques à l'échelon de certains pays et quelques enquêtes de type cas témoins ont montré que l'augmentation de la plupart des graisses accroît parallèlement le risque de cancer mammaire. Et, en corrélation avec ceci, on observe une augmentation de près de 20 % du risque de cancer du sein dans la population obèse de plus de 50 ans (Tretli, 1989). Il semble également que la consommation régulière de boissons alcoolisées pourrait accroître le risque de cancer du sein, et ce, de manière très significative dans les cas d'alcoolisme chronique. En revanche, une consommation importante de sélénium et de vitamine A dans l'alimentation pourrait diminuer ce risque.

Des études ont également montré qu'un régime alimentaire végétarien est nettement favorable à une baisse de la fréquence d'apparition du cancer du sein par rapport à un régime omnivore.

2.4. Radiations ionisantes.

Les femmes exposées à de hautes doses de radiations ionisantes ont un risque augmenté de cancer du sein comme en témoignent en particulier les études effectuées sur les survivantes japonaises d'Hiroshima et de Nagasaki et les études menées sur des femmes traitées et suivies pour une tuberculose pulmonaire, qui ont donc subi de nombreux contrôles radiographiques.

Il a été calculé que l'augmentation du nombre de cancers mammaires pourrait être de 6 cas par an et par rad pour un million de femmes. Il semble en effet probable, que les doses reçues au cours d'une longue période aient un pouvoir cumulatif et que l'on puisse parler d'un effet dose des radiations vis à vis des tumeurs mammaires. Le risque maximal se situe lorsque

l'irradiation a lieu lors de la puberté ou de la trentaine. Lors de ces périodes, les cellules épithéliales mammaires ont une grande activité mitotique et ne sont pas sous l'effet protecteur de la progestérone ou de la première grossesse menée à terme.

Cependant, les mammographies de surveillance ne délivrent que de très faibles doses de rayonnements, elles ne doivent donc pas être retenues comme un facteur de risque positif, et ceci d'autant plus, qu'après 50 ans un dépistage mammographique annuel systématique permet de réduire de manière très significative la mortalité par cancer du sein.

2.5. Facteurs environnementaux.

Certains éléments plaident en faveur de l'intervention de facteurs environnementaux. On sait, par exemple, que les asiatiques ont un risque moindre que les occidentaux de développer un cancer du sein. Or, les études menées sur les populations d'immigrés chinois ou japonais aux Etats-Unis montrent que les deuxièmes générations de ces populations présentent un risque qui a rejoint celui de la population occidentale. Les facteurs nutritionnels cités ci-dessus sont sûrement en cause, mais d'autres facteurs moins connus ne peuvent être écartés.

D'autre part des études ont mis en évidence des concentrations sanguines plus élevées en pesticides chez certaines femmes atteintes d'un cancer du sein (Falck *et al.* 1992).

2.6. Facteurs hormonaux

Les facteurs hormonaux apparaissent comme étant déterminants. Qu'ils soient endogènes ou exogènes, ils modifient le climat hormonal du tissu mammaire et d'éventuelles lésions bénignes préexistantes, certaines pouvant être améliorées et d'autres aggravées.

2.6.1. Facteurs exogènes

Il s'agit essentiellement de la contraception hormonale qui selon sa composition crée un climat à composante estrogénique ou progestative dominante. Globalement, les études ne montrent pas d'augmentation significative du risque de cancer du sein associée à l'utilisation d'un traitement estroprogestatif contraceptif (Romieu *et al.* 1989).

Par contre, le traitement hormonal de substitution, mis en place au moment de la ménopause, augmente le risque de cancer de sein de manière significative (risque relatif estimé à 1.5). Néanmoins, ce risque semble être largement compensé par les bénéfices de cette substitution hormonale vis à vis notamment des risques d'ostéoporose (Colditz *et al.* 1990).

2.6.2. Facteurs endogènes.

2.6.2.1. *Hyperestrogénie relative et insuffisance lutéale.*

Les sécrétions hormonales varient au cours des différentes phases du développement mammaire à partir de la puberté jusqu'à la première grossesse menée à terme. De même, ces sécrétions hormonales fluctuent selon la période du cycle menstruel et après la ménopause. Le développement normal et régulier des seins est sous la dépendance directe de cet équilibre hormonal.

Au moment de la puberté, on a d'abord une sécrétion isolée d'estrogènes jusqu'à ce que les cycles deviennent ovulatoires, on a alors une production de progestérone. Les effets de la progestérone vont d'ailleurs contrebalancer les effets des estrogènes.

Le phénomène inverse est observé au moment de la période qui précède la ménopause. Les cycles deviennent anovulatoires et il apparaît une hyperestrogénie relative.

Ces deux périodes sont semblables par le déséquilibre qu'il existe au niveau de l'imprégnation hormonale stéroïdienne (Mauvais-Jarvis *et al.* 1983). Ce déséquilibre hormonal se traduit d'ailleurs de différentes manières lors de ces épisodes de la vie génitale: mastodynie, irrégularité menstruelle, bouffées de chaleur. Au cours de ces périodes, l'insuffisance lutéale et l'hyperestrogénie relative pourraient jouer un rôle favorisant lors de l'initiation ou lors de la promotion de la cancérogenèse.

2.6.2.2. *Grossesse.*

La nulliparité ou une première grossesse tardive ont été identifiées comme étant des facteurs de risque de cancer du sein, en favorisant la promotion de cellules déjà transformées. En allant plus loin, il est même apparu qu'une première grossesse menée à terme à un âge précoce, est un élément protecteur en permettant une maturation complète de la glande mammaire qui bénéficie alors de l'influence protectrice de la progestérone et prévient une

possible initiation tumorale. Durant la grossesse, les seins semblent donc moins exposés à une éventuelle initiation cancéreuse.

2.6.2.3. *Allaitement.*

On associe à la suppression cyclique de la sécrétion estrogénique lors de la lactation une certaine protection vis à vis du risque d'initiation tumorale. Cette protection semble être d'autant plus grande que la lactation est prolongée.

2.6.2.4. *Influence des estrogènes.*

La majorité des cancers du sein sont initialement hormonoinduits, l'estradiol étant un facteur majeur de leur développement et de leur évolution (Pasqualini *et al.* 1994). L'action intracellulaire de l'estradiol se fait par l'intermédiaire d'un récepteur protéique au niveau des cellules cibles. On pense que l'estradiol traverse passivement la membrane cytoplasmique des cellules puis dans le cytoplasme, se lie à un récepteur spécifique. Il s'en suit une dimérisation de ce complexe estradiol-récepteur (ER) qui pénètre dans le noyau cellulaire et interagit avec l'ADN nucléaire au niveau d'un site spécifique appelé Élément de Réponse aux Estrogènes (ERE). Cet ERE est un activateur de gènes spécifiques, codant par exemple des facteurs de croissance comme le TGF α (Transforming Growth Factor α) qui est un effecteur peptidique à effet mitogène pour les cellules cancéreuses. Nous avons donc une prolifération cellulaire anarchique à la suite de la liaison de l'estradiol, par action directe du TGF α produit. Le TGF α n'est pas le seul facteur impliqué dans cette prolifération cellulaire, on trouve aussi le facteur EGF (Epidermal Growth Factor) et l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor).

2.6.2.5. *La ménopause.*

Avant la ménopause, estrogènes et androgènes sont produits respectivement par les ovaires et les glandes surrénales. Les ovaires sont la principale source d'estrogènes et répondent à la stimulation positive d'hormones hypophysaires: LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Folliculing Stimulating Hormone).

Au moment de la ménopause, les ovaires cessent progressivement de produire des estrogènes, mais la production d'hormones stéroïdiennes par les glandes surrénales demeure active. On a notamment production d'androgènes comme la DHA (Déhydroépiandrostérone) et son ester le sulfate de Déhydroépiandrostérone le SDHA.

Après la ménopause, la quasi-totalité des estrogènes produits sont issus de la conversion périphérique des androgènes surrénaliens par l'aromatase (Grodin *et al.* 1973). Nous avons déjà vu que cette aromatisation pouvait se produire dans des tissus très variés, mais les sites majeurs de formation périphérique des estrogènes sont le tissu adipeux et le tissu musculaire. Cependant, le tissu mammaire constitue un site très important de l'activité aromatasique. De plus si l'on mesure l'activité de l'aromatase dans des tissus mammaires on constate que les plus fortes activités sont toujours trouvées dans des quadrants qui renferment une tumeur. Cette activité accrue pourrait être expliquée par l'influence positive de facteurs comme la cytokine IL6 que l'on retrouve de manière quasi systématique dans les carcinomes mammaires (Reed *et al.* 1993).

De plus on a constaté que les tumeurs mammaires des femmes ménopausées possédaient de fortes concentrations d'estrogènes comparées à leurs taux plasmatiques à cette période de leur vie (Edery *et al.* 1981). Dès 1979, Abul-Hajj a donc montré qu'il existait une production d'estrogènes au sein de la tumeur, catalysée par l'aromatase et par la sulfatase. La sulfatase permettant une hydrolyse du sulfate d'estrone qui provient de la transformation de l'androstènedione par la sulfotransférase.

Ainsi le cancer du sein apparaît comme une pathologie multifactorielle, dont beaucoup de facteurs sont peu ou pas contrôlables. Parmi tous ces facteurs, le climat estrogénique, surtout au moment de la ménopause, et par voie de conséquence l'activité de l'aromatase sont apparus comme étant des éléments clés dans le développement de traitements et peut être même dans la mise au point de protocoles préventifs. De nombreuses molécules ont donc été testées et utilisées comme inhibiteurs de l'aromatase. Cette classe médicamenteuse commence d'ailleurs à s'imposer dans certains cas comme traitement de première ligne (voir Chapitre IV).

B. Autres pathologies.

1. L'endométriose.

Il s'agit d'un développement anarchique et hors de son emplacement habituel du tissu endométrial normal, c'est à dire de la muqueuse utérine avec son chorion, ses glandes et parfois même ses muscles lisses. L'endométriose siège le plus souvent au niveau du corps utérin ou près de la cavité utérine (endométriose interne). La muqueuse émet de petits diverticules qui vont s'enfoncer dans l'épaisseur du muscle utérin (endométriose diffuse) ou directement sous le péritoine (endométriose externe).

L'endométriose peut se développer aussi en dehors de l'utérus, que ce soit au niveau de la trompe utérine, du ligament large, de l'ovaire, du rectum et même dans les cas les plus compliqués en dehors du petit bassin (au niveau du tube digestif par exemple).

L'endométriose peut se présenter sous une forme circonscrite, nodulaire ou tumorale on parle alors d'endométriome (Delamare *et al.* 1992).

Cette muqueuse utérine ectopique réagit de manière directe aux différentes stimulations hormonales et notamment aux estrogènes. Les estrogènes sont d'autant plus importants dans le mécanisme de développement de l'endométriose que l'on a récemment découvert qu'il existait un système de "feedback" positif autocrine qui favorise la production permanente d'estrogènes et de prostaglandines PGE2 au niveau des cellules stromales de l'endométriome. On a ainsi découvert que l'aromatase est exprimée de manière aberrante dans ces cellules stromales, alors qu'elle ne possède aucune activité dans un endomètre non pathologique. On a donc une production accrue d'estrogènes qui vont ensuite stimuler la cyclooxygénase 2 et provoquer une augmentation des niveaux de PGE2. Pour compléter ce cycle, la PGE2 est un puissant inducteur de l'activité de l'aromatase dans les cellules stromales de l'endomètre pathologique.

L'activité de l'aromatase lors de l'endométriose est contrôlée par la liaison compétitive d'un facteur de stimulation de la transcription de l'aromatase, le facteur 1 "stéroïdogénique". L'inhibition de l'aromatase dans un contexte normal est faite par l'intermédiaire d'un facteur inhibiteur de la transcription de l'aromatase qui agit au niveau du promoteur du gène de l'enzyme.

L'aromatase n'est pas la seule enzyme à présenter une activité perturbée lors d'une endométriose, on a aussi relevé une déficience en 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2, enzyme qui est normalement largement exprimée dans un endomètre sain et permet une inactivation de l'estradiol en estrone. Cette déficience est une autre aberration qui provoque une augmentation anormale des concentrations d'estradiol dans les tissus de l'endomètre lors d'une endométriose.

On voit donc l'importance que peut avoir l'aromatase dans cette pathologie de l'endomètre. Ces observations ont donc naturellement mené à l'utilisation de molécules inhibitrices de l'aromatase comme possibles traitements de cette pathologie et les premières études rapportent des résultats plutôt positifs (Bulun *et al.* 1999, 2000).

2. Les pubertés précoces.

La puberté est un phénomène de maturation morphologique et physiologique qui se déroule progressivement à partir de 12-13 ans chez les jeunes filles. Il existe alors un développement des caractères sexuels secondaires, une augmentation de la croissance et l'apparition des premières menstruations. Au niveau hormonal, la puberté se traduit par un éveil progressif de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. Les estrogènes provoquent la maturation des glandes mammaires et le développement de la muqueuse utérine.

On parle de puberté précoce lorsque le développement des caractères sexuels secondaires survient avant 8 ans et il s'agit d'un syndrome inquiétant qui doit amener à rechercher une cause organique encéphalique, ovarienne ou surrénalienne. Très souvent il s'agit d'une sécrétion prématurée d'estrogènes due à une tumeur ou à un kyste au niveau des ovaires.

Un traitement permettant de diminuer cette sécrétion d'estrogènes pourrait atténuer ce processus de précocité. Des essais cliniques incluant des inhibiteurs de l'aromatase ont ainsi été menés sur des jeunes filles souffrant d'une puberté précoce avec des résultats relativement encourageants (Feuillan *et al.* 1999).

3. Les gynécomasties.

Il s'agit d'un développement anormal des glandes mammaires chez un homme ou un jeune garçon. Cette pathologie peut avoir différentes origines (Syndrome de Klinefelter, tumeur des testicules ou tumeur surrénalienne), mais on retrouve toujours un déséquilibre entre les composantes estrogéniques et androgéniques au niveau du tissu du sein. Dans certaines formes de gynécomastie familiale on a pu mettre en évidence un excès d'expression de l'aromatase dans les tissus mammaires. Dans ce processus pathologique aussi on peut donc logiquement penser que les inhibiteurs de l'aromatase ont sans doute un rôle à jouer, mais il n'existe cependant que très peu d'études menées sur ce sujet à l'heure actuelle (Braunstein, 1999).

4. Hyperplasie bénigne de la prostate.

Chez les hommes, les estrogènes produits par les testicules, ou secrétés au niveau périphérique possèderaient un rôle dans le processus d'hypertrophie bénigne de la prostate et peut être même dans l'initiation de certaines formes de cancer prostatique (Henderson *et al.* 1987). La prostate elle même étant, sans doute, aussi capable de synthétiser des estrogènes (Brodie *et al.* 1989). Dans ce cas aussi le contrôle de la production estrogénique via une inhibition de l'aromatase est une stratégie logique et envisageable lors d'un traitement de cette affection (Brodie, 1993).

Chez l'homme, lors du vieillissement, on assiste à un déclin progressif des taux plasmatiques de testostérone, alors que les taux d'estrone et d'estradiol restent inchangés et que les taux des protéines spécifiques du transport des hormones sexuelles (Sex Hormone Binding Globulin) augmentent. On a donc une diminution de la biodisponibilité de la testostérone au niveau du tissu prostatique. Les estrogènes intra prostatiques et leurs récepteurs sont eux proportionnellement augmentés et concentrés dans le stroma.

Les androgènes agissent sur la prostate de manière indirecte, grâce aux différents facteurs de croissance comme le Fibroblast Growth Factor ou le Tumour Growth Factor, mais on n'a pas encore pu démontrer qu'il existait un effet modulateur des estrogènes sur ces mêmes facteurs de croissance. On a cependant pu mettre en évidence que le mode d'alimentation occidental, caractérisé par une grande consommation de matières grasses saturées, prédispose les hommes aux hypertrophies bénignes de la prostate alors qu'un régime

riche en flavonoïdes et en lignanes, substances qui sont riches en phytoestrogènes, diminuerait plutôt ce risque. On peut donc interpréter ces données et imaginer que les antiestrogènes ou les inhibiteurs de l'aromatase auront un rôle à jouer dans le traitement médical de l'hypertrophie bénigne de la prostate (Sciarra *et al.* 2000). Il ne s'agit cependant, pour le moment, que d'hypothèses sur lesquelles travaillent certains laboratoires.

**CHAPITRE III: LES
INHIBITEURS DE
L'AROMATASE.**

L'aromatase est une réaction unique dans le processus de biosynthèse des stéroïdes. En effet, il s'agit de la dernière étape de la séquence de biosynthèse des estrogènes. Ainsi, le blocage sélectif de cette enzyme ne devrait pas affecter la production des autres stéroïdes. C'est pour cette raison essentielle que l'aromatase est une cible particulière pour le développement de molécules inhibitrices (Brodie 1993).

Les inhibiteurs de l'aromatase ou anti-aromatase sont des molécules qui inhibent la transformation de l'androstènedione et de la testostérone, respectivement en estradiol et en estrone. Ce sont donc des molécules qui neutralisent la fonction du complexe enzymatique, soit au niveau du site actif de l'enzyme, soit au niveau du mécanisme du cytochrome P450.

A. Méthodes d'étude des inhibiteurs de l'aromatase.

Il existe de nombreux protocoles et de nombreuses études qui montrent l'efficacité des inhibiteurs de l'aromatase sur les taux plasmatiques d'estrogènes de patientes traitées, mais on dispose de peu de moyen pour vérifier l'efficacité de ces traitements au niveau même du tissu tumoral.

Lors des évaluations cliniques, les études sont alors plus poussées et comprennent en premier lieu la détermination de l'affinité des inhibiteurs pour le complexe enzymatique. On étudie ensuite l'inhibition de la synthèse estrogénique *in vitro*, selon les méthodes déjà évoquées dans le chapitre I. Les études sont effectuées sur des microsomes placentaires, des lignées cellulaires cancéreuses du sein et des biopsies de tumeur du sein.

In vivo, il s'agit d'évaluer l'inhibition de la synthèse des estrogènes et l'éventuel effet antitumoral (Feutrie *et al.*, 1999).

Lors de ces évaluations, il est alors possible d'établir des comparaisons entre les différentes molécules testées. En général on compare les affinités relatives des inhibiteurs avec celle de l'aminoglutéthimide qui sert alors de référence. Cette affinité relative est comprise entre 0.5 et 3000, en fixant de manière arbitraire une affinité de 1 pour l'aminoglutéthimide (tableau III.I).

Comme pour n'importe quel autre inhibiteur enzymatique, les expériences *in vitro* permettent ensuite d'exprimer la concentration inhibitrice 50 % ou IC₅₀ ; c'est à dire la concentration de l'inhibiteur qui diminue de 50 % l'activité de l'aromatase (tableau III.II).

Tableau III.I: Affinité relative de différents inhibiteurs pour l'aromatase (d'après Feutrie *et al.*,1999).

Inhibiteurs.	Affinité relative pour l'aromatase (/ki AG).
Aminoglutéthimide	1
Pyridogluthétimide	0,5
Formestane	30
Fadrozole	3000
Létrozole	900
Vorozole	900
Exemestane	20
Anastrozole	40

Tableau III.II: Inhibition in vitro de l'aromatase par différentes molécules (d'après Feutrie *et al.*,1999).

Inhibiteurs.	IC ₅₀ (nM).
Aminoglutéthimide	1754
Roglétimide	500
Formestane	44
Fadrozole	5
Exemestane	4
Létrozole	3
Vorozole	1.4

Lorsque les IC_{50} des molécules inhibitrices sont déterminées dans les mêmes conditions expérimentales, il est alors tout à fait possible de réaliser une comparaison des efficacités des différents inhibiteurs. Cette valeur qui peut donc servir d'étalon de comparaison, ne prend cependant aucunement en compte le mode d'action des inhibiteurs et le caractère réversible ou irréversible de l'inhibition qui est pourtant un facteur capital de l'efficacité de la molécule.

B. Classifications.

Les anti-aromatase sont classés en fonction de leur structure chimique, de leur mécanisme d'action ou de leur différence de spectre de rayonnement quand ils sont exposés aux ultra-violets.

1. Structure chimique.

Les anti-aromatase comprennent des inhibiteurs de nature stéroïdienne et non stéroïdienne.

1.1. Les inhibiteurs stéroïdiens

Ce sont les premiers inhibiteurs sélectifs de l'aromatase à avoir été décrits. Ce sont des stéroïdes en C19 qui sont des analogues des substrats habituels de l'enzyme et qui le plus souvent ont une structure dérivée de l'androstènedione ou de l'androstènediol (figure 3.1). Ces premières molécules testées ont révélé des propriétés d'inhibiteur de type compétitif.

Il existe ainsi de nombreuses études portant sur les capacités inhibitrices de molécules stéroïdiennes de ce type, comme par exemple l'androsta-1,4,6-triène-3,17-dione, le 4-hydroxyandrostènedione (4-OHA) ou encore le 4-acétoxyandrostènedione.

Ces inhibiteurs de l'aromatase entrent en compétition avec les substrats naturels de l'enzyme pour la fixation sur le site actif de l'enzyme. Ils doivent donc être les plus sélectifs possible. La liaison sur le site actif de l'enzyme est souvent très forte voir même irréversible, ce qui provoque une réelle inactivation de l'enzyme qui voit son site d'activité occupé par une molécule autre que son substrat normal. Lorsque la liaison à l'enzyme est de nature irréversible, ces inhibiteurs présentent une action retardée *in-vivo*. Ainsi, pour avoir une

inhibition durable il n'est pas nécessaire de maintenir une concentration d'inhibiteur sur une longue durée, on diminue ainsi les risques d'effets secondaires toxiques.

Le 4-OHA s'est ainsi révélé être un puissant inhibiteur de l'aromatase, à la suite d'expériences *in-vitro* d'incubations de microsomes placentaires de rat en présence d'un système régénérateur de NADPH. Lors de ces expérimentations, il a été observé une perte d'activité de l'enzyme de type temps-dépendante, il s'agirait donc d'une cinétique dite de premier ordre. En effet, l'inactivation de l'enzyme peut être prévenue si le milieu d'incubation présente de grandes concentrations de substrat. On peut donc prévenir la liaison de l'inhibiteur à l'enzyme en effectuant une pré incubation avec de l'androstènedione.

On a montré que d'autres inhibiteurs stéroïdiens de l'aromatase provoquaient une inactivation de l'enzyme. Brueggemeir *et al.* (1990) ont ainsi étudié de nombreux dérivés de l'androstènedione substitués en 7α , dont plusieurs avaient une activité inhibitrice de l'aromatase. La nature covalente de la liaison du $7\alpha(4'$ -amino)phenylthio-4-androstènedione à l'aromatase a été démontrée par différentes méthodes, dont une dialyse poussée, du complexe formé par l'effecteur radiomarqué (^{125}I) $7\alpha(4'$ -amino)phenylthio-4-androstènedione et un extrait purifié de cytochrome P450 aromatase. La solution obtenue à la suite de la dialyse subit alors différentes manipulations : une chromatographie, une électrophorèse, une précipitation des protéines et enfin une digestion par la trypsine, du complexe formé par l'aromatase et son inhibiteur. On sait ainsi que l'inhibiteur se lie de manière covalente à la partie lipophile de l'enzyme.

Parmi les nombreuses molécules on peut aussi citer le 1-méthyl-androsta-1,4-diène-3,17-dione étudié par Henderson *et al.* (1987) qui possède une activité inhibitrice *in vitro* et qui a été pressentie comme un possible traitement de l'hypertrophie bénigne prostatique.

Parmi les analogues acétyléniques en C19 de l'androstènedione qui possèdent une activité inhibitrice de l'aromatase le 10-(2-propynyl)-estr-4-ène-3,17-dione est décrit comme étant l'inhibiteur le plus puissant.

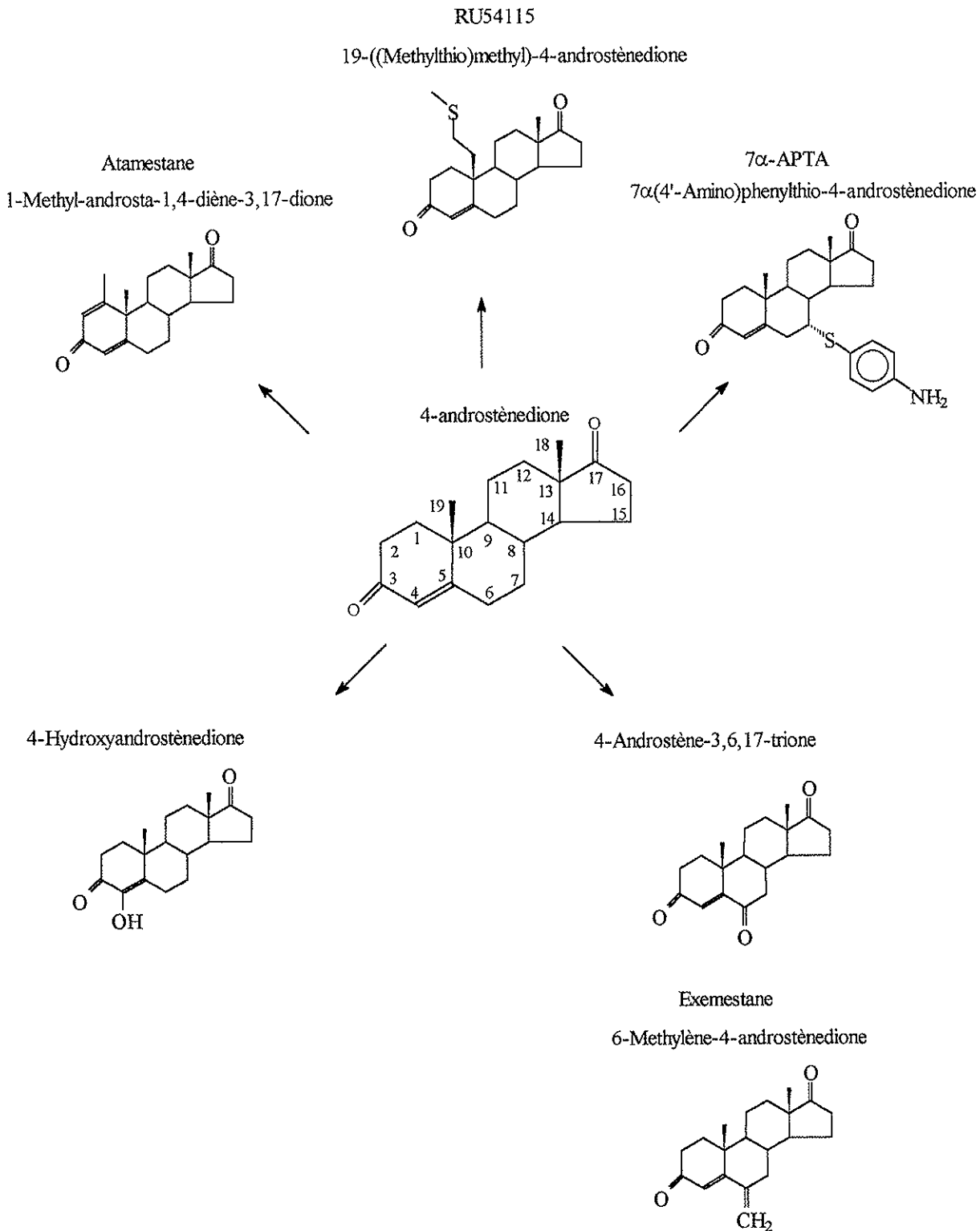


Figure 3.1: Inhibiteurs stéroïdiens de l'aromatase dérivant de la structure de l'androsténone.

1.2. Les inhibiteurs non stéroïdiens.

1.2.1. Synthétiques

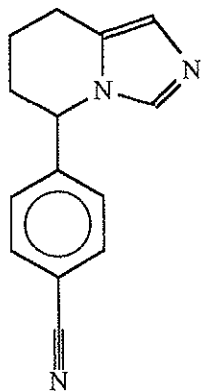
Le complexe aromatasique peut aussi être inhibé par de nombreux composés qui ne sont pas de nature stéroïdienne. Parmi ces inhibiteurs non stéroïdiens, on retrouve des inhibiteurs synthétiques et des inhibiteurs naturels.

Les inhibiteurs non stéroïdiens synthétiques sont surtout des composés organiques avec un ou plusieurs hétéroatomes (S,N,O) capables de pénétrer dans le site actif de l'enzyme et d'engager une liaison avec l'atome de fer de la molécule d'hème de l'aromatase. Ils peuvent ainsi inhiber d'autres enzymes cytochromes P450 comme celles impliquées dans la production adrénaie d'aldostérone (18-hydroxylase) ou de cortisol (11 β -hydroxylase). Ce sont tous des inhibiteurs réversibles.

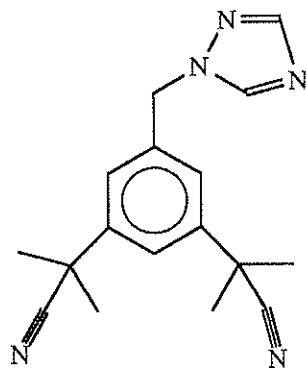
La première molécule à avoir été utilisée cliniquement dans le traitement du cancer du sein hormono dépendant en inhibant l'aromatase fait d'ailleurs partie de cette catégorie, il s'agit de l'aminoglutéthimide: **Orimétène**[®]. Cette molécule inhibe plusieurs étapes de la stéroïdogénèse et a donc d'abord été utilisé afin de réaliser de véritables adrénalectomies thérapeutiques. On a depuis réussi à développer des analogues de l'aminoglutéthimide comme par exemple le pyridoglutéthimide qui est aussi puissant que l'aminoglutéthimide mais qui est plus spécifique de l'aromatase et donc moins toxique.

Depuis, de nombreuses autres molécules plus actives ont été synthétisées à partir de molécules imidazolées comme le fradozole ou triazolées comme le vorozole (figure 3.2). Ces inhibiteurs sont beaucoup plus puissants que l'aminoglutéthimide et beaucoup plus spécifiques de l'aromatase, entraînant donc moins d'effets néfastes sur les autres enzymes cytochromes P450.

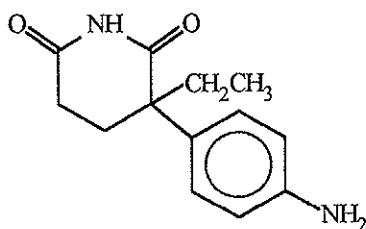
Certains de ces composés se lient à l'atome de fer de l'hème mais aussi avec des résidus acides aminés proches du site actif de l'enzyme. Ainsi, on trouve des dérivés triazolés qui évidemment mettent en jeu une liaison de coordination avec le fer hémique, mais établissent aussi des liaisons entre leur substituant azoté et une région lipophile de l'apoprotéine (Brodie 1993).



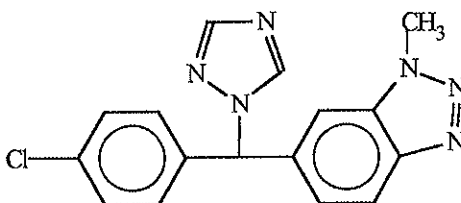
Fradozole



Anastrozole



Aminoglutéthimide



Vorozole

Figure 3.2: Inhibiteurs non stéroïdiens utilisés dans le traitement du cancer du sein hormono dépendant.

1.2.2. Naturels

Les inhibiteurs non stéroïdiens d'origine naturelle sont nombreux et sont surtout des molécules issues du règne végétal comme les phytoestrogènes (Blanco *et al.* 1997). La structure chimique de ces molécules est voisine de celle ces estrogènes endogènes. Parmi l'ensemble de ces molécules capables de posséder une activité inhibitrice de l'aromatase, on trouve les flavonoïdes (flavones, flavanes, flavanones, isoflavones), les coumestranes, les coumarines et les lignanes (figure 3.3).

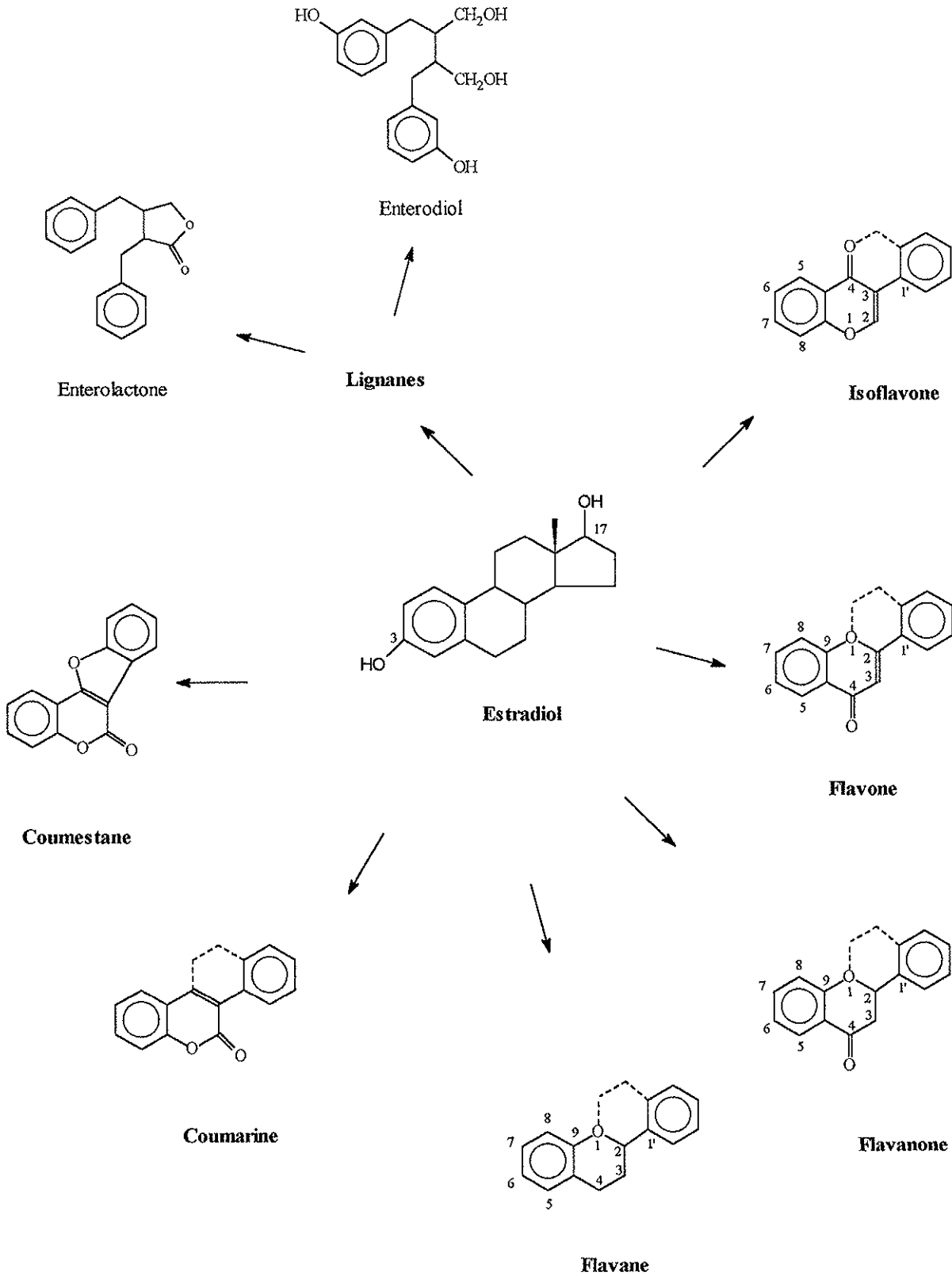


Figure 3.3 : Comparaison de la structure chimique de différents phytoestrogènes avec l'estradiol.

- - - : extrapolation de la structure chimique.

2. Mécanisme d'action.

On peut distinguer trois grands types de mécanismes impliqués lors de l'inhibition de l'aromatase:

- Les inhibiteurs de type I, stéroïdiens, dits inhibiteurs suicides, sont des analogues du substrat qui se lient d'une façon irréversible au site d'activité de l'enzyme. Ils sont transformés par l'enzyme en radicaux intermédiaires qui alkylent l'enzyme et inactivent ses fonctions. La réapparition de l'activité enzymatique normale est fonction de la resynthèse de novo de l'enzyme.
- Les inhibiteurs de type II, non stéroïdiens se lient de façon réversible à la fonction flavoprotéine du complexe enzymatique. A priori, ils seraient moins spécifiques que les inhibiteurs de type I car ils peuvent bloquer plusieurs hydroxylations médiées par les enzymes du cytochrome P450. Du fait de leur structure non stéroïdienne, ils sont moins susceptibles d'exprimer des effets agonistes/antagonistes par interférence avec d'autres récepteurs stéroïdiens.
- Les inhibiteurs de la synthèse de l'apoprotéine qui agissent en provoquant une diminution de la transcription du gène ou la traduction de l'ARNm. Mais du fait même de la complexité de la régulation du gène de l'aromatase, peu d'informations sont disponibles sur ce mode d'inhibition.

3. Réactivité aux ultraviolets.

La plupart des molécules stéroïdiennes, inhibitrices ou pas, qui se lient à l'aromatase produisent un spectre UV de type I caractéristique, avec une absorbance maximale à 420 nm et un minimum à 392 nm.

Les inhibiteurs de l'aromatase qui ne sont pas de type stéroïdien et qui sont capables de former des complexes avec certains atomes d'hémoprotéines ou avec des hétéroatomes (N,S,O) donnent des spectres de type II. Ces spectres UV de liaison à l'aromatase sont caractérisés par un maximum d'absorption à 429nm.

C. Activité biologique des inhibiteurs de l'aromatase.

Les inhibiteurs de l'aromatase provoquent une diminution de la production d'estrogènes qui peut être mise en évidence *in vivo*. L'inhibition de l'activité de l'aromatase ovarienne et donc de la sécrétion estrogénique est corrélée avec une régression marquée des tumeurs hormono dépendantes artificiellement induites chez des rats. L'activité biologique de nombreux inhibiteurs de l'aromatase, qu'ils soient stéroïdiens ou non a pu être mise en évidence grâce à ces modèles animaux.

Chez un animal sain, la réduction des taux plasmatiques d'estradiol provoque une augmentation réflexe de la sécrétion de LH, qui stimule alors l'activité de l'aromatase ovarienne. Il s'agit d'un cycle classique de régulation hormonale avec un phénomène de "feed back" ou rétrocontrôle.

Certains inhibiteurs stéroïdiens de l'aromatase, comme le 4-hydroxyandrostènedione, présentent une faible activité androgénique qui est cependant suffisante pour bloquer la libération de LH à certaines doses. Cette activité peut provoquer un maintien de la suppression des estrogènes ovariens et pourrait ainsi contribuer à la régression de tumeur du sein hormono dépendante.

Les inhibiteurs non stéroïdiens, comme par exemple l'aminoglutéthimide, n'interfèrent pas avec le "feed back" positif de la LH. Ainsi, l'activité inhibitrice de l'aminoglutéthimide ne provoque pas de suppression prolongée des taux d'estrogènes dont la sécrétion est stimulée par la LH au bout d'un certain temps de traitement.

Chez des femmes ménopausées souffrant de cancer du sein, l'aromatase périphérique est un phénomène très important. On a donc cherché à déterminer les effets de ces inhibiteurs sur la production d'estrogènes en dehors des ovaires. Reed *et al.* (1990) ont ainsi étudié les effets du 4-hydroxyandrostènedione sur des patientes ménopausées. Dans cette étude, on note une inhibition très marquée de l'aromatase périphérique et même une inhibition de l'activité aromatisante au sein même de la tumeur pour trois des patientes, alors que deux patientes ne semblent pas réagir du tout à l'inhibiteur. On peut aussi noter une diminution de l'ADN polymérase α dans les tumeurs réactives au 4-hydroxyandrostènedione. Cependant, on ne peut établir de corrélation significative entre l'activité de l'aromatase et ce marqueur de prolifération.

On sait que l'estrogène produit par l'aromatase intra tumorale exerce une influence négative sur la prolifération tumorale lorsque celle ci possède des récepteurs aux estrogènes. Mais on ne peut pas établir de corrélation entre la présence d'aromatase intra tumorale et la présence de récepteurs aux estrogènes, de même que la contribution directe de l'aromatase dans le processus de stimulation n'est pas encore totalement éclairée (Brodie 1993).

**CHAPITRE IV: ASPECTS
CLINIQUES DES INHIBITEURS
DE L'AROMATASE.**

Dans ce chapitre, nous allons étudier de manière plus complète et plus précise les différentes molécules qui ont été développées en tant qu'inhibiteurs de l'aromatase.

La première molécule étudiée est un peu particulière, il s'agit de l'aminoglutéthimide. En effet cette molécule a été la première à être utilisée en partie pour ses propriétés anti aromatase. L'aminoglutéthimide sert aujourd'hui encore de molécule de référence, ne serait ce que lors des protocoles de mesures d'inhibition de l'activité aromatasique. Nous traiterons donc l'aminoglutéthimide de manière indépendante.

Nous aborderons ensuite les molécules utilisées en thérapeutique et appartenant à la catégorie des inhibiteurs stéroïdiens ou inhibiteurs de type I.

Enfin nous étudierons la classe d'inhibiteurs la plus récente et qui se développe de façon importante, à savoir les inhibiteurs non stéroïdiens ou inhibiteurs de type II.

A. L'aminoglutéthimide.

Initialement introduite comme traitement anticonvulsivant aux Etats Unis en 1958, cette molécule est retirée du marché 5 ans plus tard à cause d'effets secondaires inattendus sur différents organes endocrines, en particulier au niveau des glandes surrénales. Au cours d'études complémentaires on s'aperçoit alors que ces effets secondaires sont dus à l'inhibition de différentes enzymes, notamment des enzymes du cortex surrénalien. On va ensuite utiliser cette propriété et transformer cet effet secondaire en un avantage thérapeutique exploité pour différentes indications. Ainsi l'aminoglutéthimide est alors utilisée à des doses plus faibles pour le traitement de différentes formes du syndrome de Cushing.

En 1967, on utilise l'aminoglutéthimide pour réaliser des surrénalectomies thérapeutiques chez des femmes souffrant de cancer du sein. L'aminoglutéthimide est donc le premier inhibiteur de l'aromatase non stéroïdien à être utilisé avec cette indication.

L'aminoglutéthimide est un inhibiteur compétitif non stéroïdien de l'aromatase, de formule chimique 2-(p-aminophényl)-2-éthylglutarimide (figure 4.1). L'aminoglutéthimide utilisé en clinique est en fait un racémique optique. Les deux stéréo-isomères diffèrent par leur action biologique, l'isomère L étant le plus actif au niveau de l'inhibition des enzymes surrénales et de l'aromatase.

L'aminoglutéthimide est commercialisé en France sous le nom de spécialité d'**Orimétène**[®] 250 mg sous la forme de comprimés sécables, et à l'étranger sous les dénominations d'**Orimeten**[®] et de **Cytadren**[®].

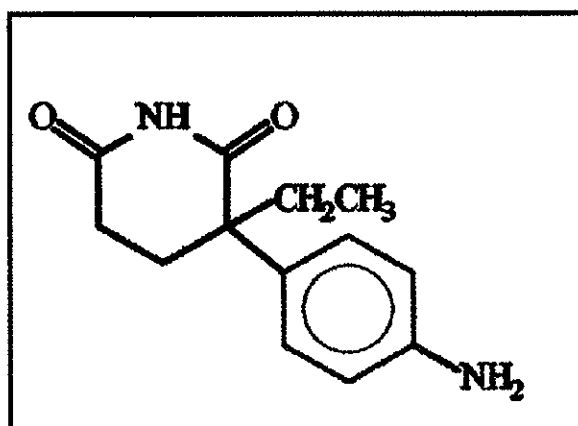


Figure 4.1: L'aminoglutéthimide.

On a aussi cherché à développer une molécule très proche de l'aminoglutéthimide, le roglétimide ou pyridoglutéthimide (figure 4.2) qui n'a cependant pas abouti à la commercialisation d'une spécialité, par manque d'efficacité en comparaison de l'aminoglutéthimide.

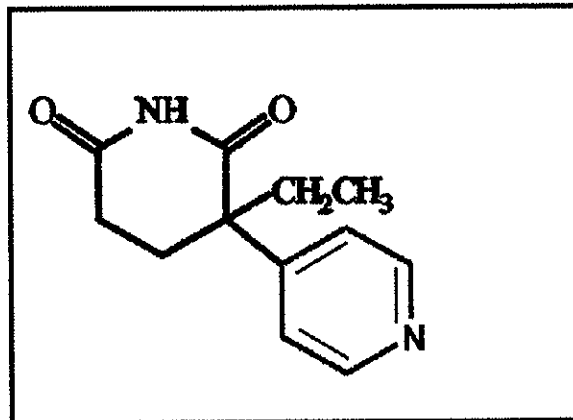


Figure 4.2: Le roglétimide.

Aujourd'hui l'aminoglutéthimide est utilisé comme traitement endocrine à part entière des cancers du sein à un stade avancé, même si ses effets indésirables restent nombreux et importants. Ces effets négatifs sont d'ailleurs à l'origine du développement de nouveaux inhibiteurs, dits de seconde génération, présentant une meilleure tolérance.

Il est indéniable que l'aminoglutéthimide est un inhibiteur très puissant de l'aromatase, cependant on s'interroge toujours à savoir si ses propriétés anti tumorales sont uniquement dues à cet effet inhibiteur. En effet, on a rapporté que l'aminoglutéthimide serait responsable d'une augmentation de 100% du métabolisme du sulfate d'estrone, et ce sulfate d'estrone est certainement le principal substrat estrogénique à la disposition des cellules cancéreuses chez les femmes ménopausées. Une augmentation de la clairance plasmatique du sulfate d'estrone serait donc un possible mécanisme d'action de l'aminoglutéthimide (Lønning *et al.* 1988).

1. Activités biochimiques de l'aminoglutéthimide.

1.1. Au niveau des glandes surrénales.

L'action inhibitrice de l'aminoglutéthimide sur les différentes étapes de la stéroïdogénèse au niveau des glandes surrénales a été le premier effet endocrine décrit pour cette molécule.

Les différentes étapes de synthèse des stéroïdes au niveau du cortex des glandes surrénales et les influences de l'aminoglutéthimide sont décrits dans la figure 4.3. L'inhibition de la production des hormones stéroïdiennes est due à l'inhibition par l'aminoglutéthimide de différentes enzymes. La détermination exacte des enzymes inhibées par cette molécule a été déterminée *in vitro*. On sait désormais que l'aminoglutéthimide agit essentiellement sur trois enzymes capitales de cette biosynthèse des stéroïdes:

- La 20.22 desmolase qui est le complexe de conversion du cholestérol en prégnénolone.
- La 11 hydroxylase qui participe à la deuxième étape de transformation de la progestérone en aldostérone. Cependant l'inhibition de cette enzyme nécessite des concentrations intracellulaires d'aminoglutéthimide très supérieures aux concentrations plasmatiques que l'on peut trouver *in vivo*.
- La 18 hydroxylase qui est une des enzymes responsable de la transformation de la 17 hydroxyprogestérone en hydrocortisone.

On pense que l'aminoglutéthimide possède aussi une activité inhibitrice de la 21 hydroxylase, mais cette activité n'a pas pu être mise en évidence *in vitro*.

Il est difficile de déterminer les concentrations effectives en aminoglutéthimide au niveau des cellules surrénales et les résultats divergent selon les auteurs. On sait cependant grâce à l'utilisation d'aminoglutéthimide radiomarqué, qu'il y a une accumulation de la molécule au niveau des cellules du cortex surrénal.

Cette molécule exerce donc une grande influence sur la synthèse des stéroïdes au niveau des surrénales, mais il est difficile d'interpréter son action sur les différentes concentrations plasmatiques hormonales, et ce pour différentes raisons. Tout d'abord, le fait que les inhibitions soient multiples complique considérablement la compréhension des mécanismes mis en jeu. De plus, lorsque l'on administre de l'aminoglutéthimide sans

substitution de glucocorticoïde ou avec une substitution inadaptée, on peut observer une augmentation compensatrice de la sécrétion d'ACTH qui agit au niveau des différentes étapes enzymatiques de la stéroïdogénèse.

On peut cependant considérer de manière schématique que l'aminoglutéthimide réalise une véritable surrenalectomie chimique.

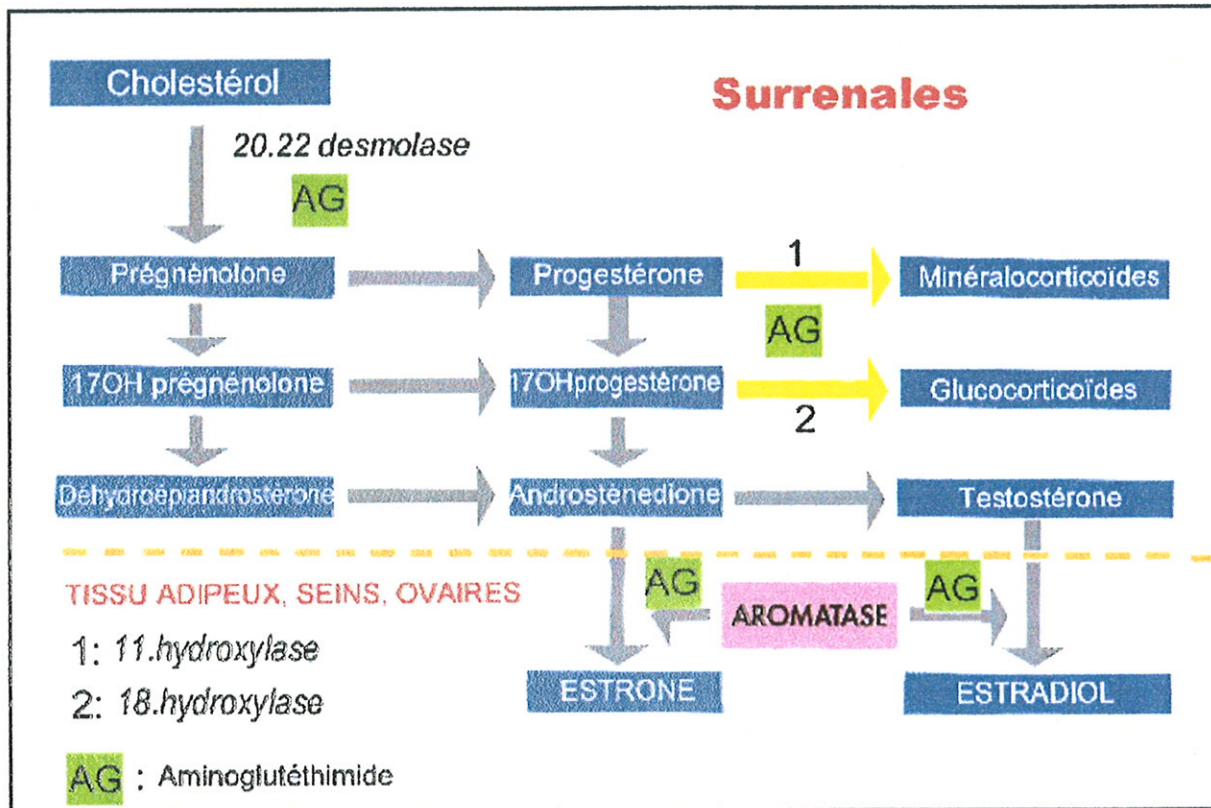


Figure 4.3: Niveaux d'action de l'aminoglutéthimide sur la biosynthèse des stéroïdes.

1.2. Au niveau des complexes aromatasiques périphériques.

Dès 1974, Thompson et Siterii ont mis en évidence *in vitro*, l'activité inhibitrice de l'aminoglutéthimide sur l'aromatase. Les premières expérimentations ont utilisé des microsomes placentaires comme support de l'activité aromatasique, puis des tissus de tumeurs mammaires. Il a donc été établi que l'aminoglutéthimide inhibe l'activité de l'aromatase de manière compétitive. Cette inhibition se faisant par la liaison compétitive de l'aminoglutéthimide au niveau du cytochrome P450.

Lors des études *in vivo*, il a été montré que l'administration de 250 mg d'aminoglutéthimide quatre fois par jour, accompagnée d'une substitution par des glucocorticoïdes, provoquait une inhibition de près de 90 % de la conversion plasmatique de l'androstènedione en estrone (Lønning *et al.* 1988).

Lors de l'administration quotidienne de 250 à 1000 mg d'aminoglutéthimide, on a pu observer une diminution de près de 50 % des concentrations plasmatiques d'estrogènes. Cette diminution des concentrations d'estrogènes semble d'ailleurs être dose indépendante.

En faisant une synthèse des différentes études réalisées on s'aperçoit que les diminutions des concentrations plasmatiques d'estrogènes sont en général décrites comme étant de l'ordre de 50 % (les valeurs allant de 25 à 85 %), alors que les inhibitions de l'activité de l'aromatase *in vivo* sont toujours de l'ordre de 90 % (les valeurs allant de 88 à 98 %). On doit donc considérer la possibilité d'une autre voie de synthèse des estrogènes chez les femmes ménopausées souffrant d'un cancer du sein.

En ce qui concerne l'évaluation des effets de l'aminoglutéthimide sur les activités des différentes aromatasés, il subsiste toujours le problème de l'administration concomitante de glucocorticoïdes de substitution. En effet, nous avons déjà vu que les glucocorticoïdes sont de puissants activateurs de l'activité aromatasique. On ne sait cependant pas exactement quels sont les processus qui prédominent lors de l'administration simultanée de glucocorticoïdes et d'aminoglutéthimide. De nombreuses études ont été menées afin d'établir le plus précisément possible l'influence des substitutions en glucocorticoïdes sur les concentrations plasmatiques d'estrogènes lors de l'administration d'aminoglutéthimide, mais aucune ne permet d'affirmer que les glucocorticoïdes aillent à l'encontre de l'action inhibitrice de l'aromatase.

1.3. Au niveau des autres glandes endocrines.

1.3.1. Effets sur les ovaires.

Les effets de l'aminoglutéthimide sur l'aromatase ovarienne humaine n'ont pas à ce jour été réellement étudiés.

Chez des femmes préménopausées recevant de l'aminoglutéthimide en traitement d'une tumeur mammaire, les taux plasmatiques d'estrone et d'estradiol ne sont pas modifiés de manière significative en période préovulatoire, mais on peut avoir des taux d'estradiol qui

sont diminués durant la phase lutéale, ce phénomène étant le plus souvent associé à une irrégularité du cycle menstruel (Lønning *et al.* 1988).

A priori rien n'indique donc que l'aminoglutéthimide puisse avoir une action inhibitrice sur le système aromatasique des ovaires, ce qui explique l'inefficacité de l'aminoglutéthimide sur des cancers du sein de femmes non ménopausées.

1.3.2. Effets sur la thyroïde.

Lorsque l'aminoglutéthimide était utilisé comme antiépileptique on a rapporté des cas d'enfants présentant des hypothyroïdies accompagnées de goitre, mais ces cas sont restés très isolés. Cet effet indésirable n'a d'ailleurs jamais été observé chez des sujets adultes.

L'aminoglutéthimide présenterait cependant une activité inhibitrice de la synthèse de thyroxine qui est compensée par une augmentation réflexe de sécrétion de Thyroxine Stimulating Hormone.

2. Autres activités biochimiques.

2.1. Effets sur le foie.

Au niveau hépatique l'aminoglutéthimide est un inducteur de certaines enzymes, comme des hydroxylases, et peut donc stimuler le métabolisme de substances aussi variées que les corticoïdes, la warfarine, la théophylline ou la digitoxine. L'aminoglutéthimide est même responsable d'une auto induction de son propre métabolisme hépatique.

2.2. Effets sur les prostaglandines.

Lors d'un traitement par de l'aminoglutéthimide, on observe une suppression de certains métabolites des prostaglandines. Ceci pourrait peut être expliquer le fait que des patientes traitées pour des tumeurs mammaires, aient ressenti un soulagement au niveau de métastases osseuses, sans que l'on puisse observer de régression objective des tumeurs (Lønning *et al.* 1988).

3. Possibles mécanismes d'action.

Différents mécanismes d'action pour l'aminoglutéthimide ont été proposés pour expliquer son activité anti tumorale. On évoque ainsi l'action inhibitrice forte sur les enzymes surrénaliennes, l'action plus précise sur les complexes de l'aromatase ou même une altération générale du métabolisme des estrogènes.

3.1. Une adrénalectomie médicale.

L'aminoglutéthimide a été utilisé comme traitement anti cancéreux parce que l'on pensait qu'il permettait de réaliser une véritable surrénalectomie thérapeutique.

On ne peut cependant pas considérer que cette explication soit suffisante. En effet, lors de traitement par l'aminoglutéthimide, les concentrations plasmatiques d'androstènedione restent inchangées ou sont même plutôt augmentées, à la suite d'une accumulation du substrat des enzymes inhibées au niveau surrénalien. Ainsi l'aminoglutéthimide ne diminue pas les estrogènes plasmatiques par élimination du substrat nécessaire à l'aromatation. Et ce d'autant plus que le sulfate de DHEA qui est une autre réserve de substrat disponible pour l'aromatation est lui aussi augmenté par une administration d'aminoglutéthimide sans adjonction de glucocorticoïde.

3.2. Une inhibition de l'aromatase.

L'inhibition de l'aromatase était considérée comme le principal mécanisme de l'activité thérapeutique de l'aminoglutéthimide. En effet, les concentrations plasmatiques d'estrogènes sont bien diminuées par l'administration de cette molécule, mais pas dans les proportions qui pourraient être attendues au vu du pouvoir inhibiteur de l'aminoglutéthimide sur l'aromatase. On peut ainsi donner à titre d'exemple le cas d'une autre molécule, la testolactone qui est aussi un puissant inhibiteur *in vitro* de l'aromatase mais qui ne provoque aucune diminution des concentrations plasmatiques d'estrogènes.

De manière générale, les patientes réagissent de façon moins positive à de faibles posologies d'aminoglutéthimide (125mg deux fois par jour) comparée au traitement normal (250mg quatre fois par jour). L'effet inhibiteur ne peut pas être le seul impliqué, car l'inhibition de l'aromatase n'est pas augmentée de manière significative avec l'augmentation de la dose administrée. On ne peut donc pas affirmer que l'efficacité de l'aminoglutéthimide n'est due qu'à son pouvoir inhibiteur de l'aromatase.

3.3. Altérations du métabolisme des estrogènes.

L'aminoglutéthimide ne modifie pas réellement la clairance des estrogènes, mais l'induction des enzymes hépatiques provoque une augmentation de 100 % de la clairance du sulfate d'estrone. On a donc une nette diminution des concentrations plasmatiques de sulfate d'estrone. Or, le sulfate d'estrone représente la principale source d'estrogènes circulants.

Contrairement à son action inhibitrice de l'aromatase, l'induction des enzymes hépatiques par l'aminoglutéthimide est dose dépendante. La différence d'efficacité entre les différentes posologies de l'aminoglutéthimide peut donc être attribuée en partie à cette propriété inductrice du métabolisme des estrogènes.

On peut cependant penser que l'activité anti tumorale de l'aminoglutéthimide est due à une combinaison de ces différents mécanismes.

4. Propriétés pharmacocinétiques.

4.1. Absorption.

L'aminoglutéthimide est bien absorbé au niveau intestinal et très peu au niveau de l'estomac. A la suite d'une ingestion d'aminoglutéthimide radiomarqué, on retrouve dans les urines collectées lors des trois jours suivants, près de 90 % de la radioactivité.

4.2. Distribution.

Les concentrations maximales plasmatiques de substances actives s'élèvent aux environs de 6µg/ml, 1 à 2 heures après la prise orale de 500 mg d'aminoglutéthimide.

La fixation aux protéines plasmatiques est de 21 à 25 % et le volume de distribution de l'ordre de 66 à 76 litres, suggèrent une liaison périphérique de la molécule (Feutrie *et al.* 1999).

4.3. Métabolisme et élimination.

Le métabolisme de l'aminoglutéthimide est essentiellement hépatique et donne deux métabolites principaux: le N-acétylaminoglutéthimide et l'hydroxylaminoglutéthimide. En fait seul le premier métabolite est réellement détectable au niveau plasmatique, l'hydroxylaminoglutéthimide n'étant retrouvé dans l'urine qu'après un traitement avec des

doses répétées, sans doute à cause de l'auto induction de son propre métabolisme par l'aminoglutéthimide.

L'élimination se fait à 90 % par voie urinaire, et près de 35 à 54 % de la dose sont éliminés sous forme inchangée.

4.4. Données pharmacocinétiques.

La demi-vie de l'aminoglutéthimide est d'environ 13 heures en début de traitement et diminue progressivement pour arriver à 7 heures au bout de 6 semaines de traitement. De même, à l'initiation du traitement on observe une clairance plasmatique de l'ordre de 3 litres par heure qui s'élève au cours du traitement pour atteindre près de 5 litres par heure au moment de l'état d'équilibre ("steady-state"). Ces changements aussi peuvent être attribués à l'induction des enzymes de son propre métabolisme par l'aminoglutéthimide.

5. Usage thérapeutique

5.1. Indications.

L'aminoglutéthimide présente deux indications principales:

- Dans les cancers du sein hormono dépendants métastasés post ménopausiques, surtout en présence de Récepteurs aux Estrogènes (RE).
- Dans les hypercorticismes, avec deux grands cas de figures: la maladie de Cushing et les adénomes surrenaliens.

5.1.1. Les cancers du sein hormono dépendants.

Le taux de réponse a un traitement standard par de l'aminoglutéthimide associé à de l'hydrocortisone est de 30 % dans une population non sélectionnée et de presque 50% dans une population présentant des RE positifs.

L'aminoglutéthimide reste un traitement de deuxième ligne. Il est en général utilisé lors d'une récurrence, à la suite d'un traitement initial par un antiestrogène, comme le tamoxifène par exemple.

5.1.2. Les hypercorticismes.

L'aminoglutéthimide est utilisé pour son action anticortisolique. On utilise ici sa capacité à réaliser une "surrénalectomie" médicale par l'inhibition des enzymes surrénaliennes.

Il s'agit essentiellement de traitement de la maladie de Cushing, pour la préparation à une intervention chirurgicale, lors d'une rechute ou lorsqu'une maladie associée interdit toute autre thérapeutique.

L'autre cause d' hypercorticisme est la présence d'adénomes surrénaliens sécrétants. On utilise donc l'aminoglutéthimide dans cette indication à titre pré ou post opératoire, dans des cas inopérables, lorsqu'il s'agit d'un carcinome surrénalien ou d'un syndrome de Cushing para néoplasique.

5.2. Administration.

La dose thérapeutique classique d'aminoglutéthimide est de 500 mg à 2 g par jour associée avec 20 à 40 mg d'hydrocortisone. Dans tous les cas on évite de dépasser 1 g par jour dans les traitements anti cancéreux et 2 g par jour pour les traitements d'hypercorticismes.

Ce traitement doit être initié en milieu hospitalier et la posologie adaptée au cas par cas. En effet l'action anti cortisolique est très rapide et les signes d'insuffisance surrénale peuvent apparaître en 24 ou 48 heures, d'où la nécessité d'une surveillance clinique et biologique. L'association à l'hydrocortisone évite la suppression de la réponse de l'ACTH qui permet de compenser l'insuffisance surrénalienne et ceci particulièrement en cas de stress. On conseille de plus d'établir un traitement avec des doses progressives, de manière à atteindre la dose efficace en 1 à 2 semaines. On recommande enfin de fractionner les prises journalières en trois ou quatre fois, avec une dose plus forte le soir.

5.3. Effets secondaires.

Les effets secondaires les plus importants observés à la suite d'un traitement par aminoglutéthimide concernent le système nerveux central (léthargie, vertiges, ataxie, dépression, insomnie, nystagmus), la peau (rash, prurit) et certaines lignées cellulaires (leucopénie, agranulocytose). De la fièvre et des symptômes dus à la déficience en minéralocorticoïdes peuvent aussi être décrits.

La plupart des effets secondaires apparaissent à l'initiation du traitement et disparaissent après. Ainsi près de 50 % des patientes souffrent d'épisodes de léthargie au début de leur traitement, mais moins de 10 % ressentent cet effet par la suite. C'est d'ailleurs pour lutter contre ce phénomène que l'on recommande de prendre la plus forte dose le soir. De même les vertiges et autres effets secondaires du système nerveux central sont ressentis par près de 20 % des patientes en début de traitement, mais ces troubles deviennent très rares durant la poursuite du traitement. Il est d'ailleurs extrêmement rare d'arrêter le traitement à cause de ces désagréments initiaux.

La nature transitoire de ces effets secondaires est sans doute imputable aux fortes concentrations plasmatiques d'aminoglutéthimide en début de traitement. Nous avons déjà vu que ces concentrations plasmatiques vont ensuite diminuer par auto induction du métabolisme de la molécule.

Des rashes cutanés morbilliformes souvent accompagnés de fièvre sont parfois décrits durant les deux premières semaines, mais disparaissent spontanément sans arrêt du traitement. On observe aussi fréquemment une augmentation de l'activité des enzymes hépatiques (gamma-glutamyl-transférase) qui peut être associée à l'action inductrice enzymatique de l'aminoglutéthimide.

On a aussi décrit des épisodes d'hypothyroïdie, parfois accompagnés de goitre, imputables à l'action inhibitrice de l'aminoglutéthimide sur la thyroxine.

Lorsque l'aminoglutéthimide était utilisé à de plus fortes doses, il a été décrit des cas de thrombocytopénies, de leucopénies ou de pancytopenies. Ces effets secondaires, bien que rarissimes, doivent toujours être pris en compte et une surveillance biologique doit être mise en place de manière systématique lors des premiers mois de traitement.

5.4. Surveillance médicale.

Durant un traitement par de l'aminoglutéthimide, il convient de surveiller régulièrement :

- la pression artérielle: lorsqu'il y a une hypotension due à un déficit en minéralocorticoïdes, on peut être amené à prescrire un minéralocorticoïde de substitution.

- une numération de la formule sanguine toutes les 2 semaines au cours des 2 à 3 premiers mois du traitement ; en cas d'anomalie, le traitement sera interrompu.

- la fonction thyroïdienne : au cours des traitements chroniques, on peut exceptionnellement observer une hypothyroïdie qui sera équilibrée par l'administration de thyroxine.

5.5. Interactions médicamenteuses.

L'aminoglutéthimide est un puissant inducteur des enzymes hépatiques P450 dépendantes, et de nombreuses molécules au métabolisme hépatique ont une clairance plasmatique accélérée par la prise concomitante d'aminoglutéthimide.

Lors de traitements de longue durée par de l'aminoglutéthimide, il est donc nécessaire de surveiller les concentrations plasmatiques des médicaments associés, surtout ci ceux ci possèdent une faible marge thérapeutique (digitoxine, théophylline).

B. Les inhibiteurs stéroïdiens ou inhibiteurs de type I.

1. Le Formestane.

Le formestane ou 4 hydroxyandrostènedione (4 OH-androstènedione) est le premier inhibiteur spécifique de l'aromatase à avoir été développé pour le traitement des cancers du sein hormono dépendants à un stade avancé, chez les femmes ménopausées. Contrairement à l'aminoglutéthimide il n'a pas d'effet sur les enzymes surrénaliennes et ne nécessite donc pas l'addition de corticoïdes.

Il s'agit en fait d'un analogue du substrat naturel de l'aromatase, l'androstènedione, hydroxylé en position 4 (Figure 4.3), de formule: 4-hydroxyandrost-4-ène-3,17-dione aussi dénommé 4-OHA.

Il semblerait que cette molécule agisse en fait de manière indirecte, grâce à un intermédiaire de réaction. Cet intermédiaire serait formé par l'oxygénation du formestane lors de sa liaison à l'aromatase et cet intermédiaire oxygéné se lierait ensuite de manière covalente au site actif de l'enzyme (Wiseman *et al.* 1993).

En France le Formestane est commercialisé depuis 1994 sous le nom de spécialité de **Lentaron®** 250 mg poudre et solution pour usage parentérale.

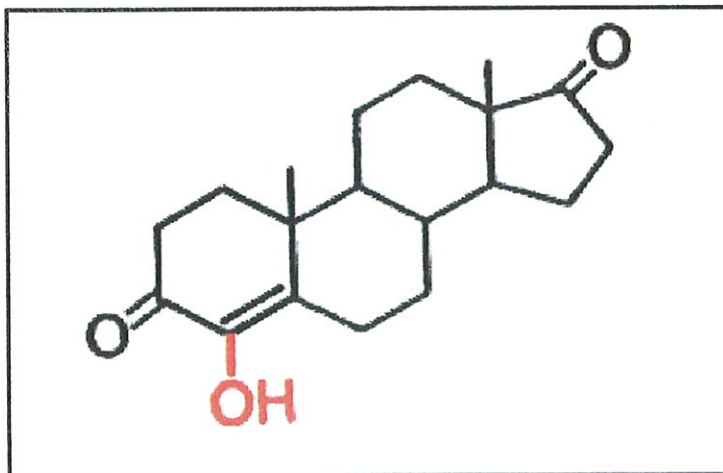


Figure 4.3: Le Formestane.

1.1. Activités biochimiques du formestane

1.1.1. Activité anti aromatase.

Le formestane a depuis longtemps démontré son activité anti aromatase *in vitro* et présente de fait une activité inhibitrice 60 fois plus puissante que l'aminoglutéthimide et 300 fois plus que la testolactone.

Les différentes études de cette molécule décrivent en général une activité inhibitrice *in vitro* de près de 50 % pour des concentrations de l'ordre de 1 nmol/L. Mais on arrive à une inhibition de près de 90 % de l'activité aromatasique de cellules mammaires cancéreuses pour des concentrations de 0.1 μ mol/L (Brueggemeier *et al.* 1990). Cependant, on trouve en général une proportion de près de 30 % des tumeurs, qui restent insensibles à l'activité inhibitrice du formestane, par une sorte de "résistance" à cette molécule (Reed *et al.* 1990).

Lors des études *in vivo*, l'administration intra musculaire de 150 à 500 mg de formestane provoque une diminution des concentrations d'estradiol circulant de 50 à 70 %. On observe une diminution de 80 % de l'estradiol circulant dans les 24 heures qui suivent l'injection, et une diminution de 60 % sept jours après. Le formestane présente une activité anti aromatase qui persiste plus de 14 jours.

De manière générale, on n'observe pas de différence significative entre les suppressions estrogéniques provoquées par des injections de 250 ou 500 mg chez des femmes ménopausées. Ainsi, en effectuant une injection de 250 mg une fois toutes les deux semaines, on arrive à maintenir une inhibition de près de 60 % des taux d'estradiol circulant.

L'administration de 500 mg de formestane chez des femmes non ménopausées ne provoque pas de diminution significative des taux d'estradiol. En effet, chez ces patientes, la principale source d'estrogène est ovarienne, sous le contrôle positif de la LH et de la FSH. L'activité inhibitrice du formestane n'est donc pas suffisante pour diminuer les taux d'estrogènes circulants chez des femmes avant la ménopause. On peut cependant réussir à diminuer de manière très significative la synthèse estrogénique en associant le formestane et la goséréline (agoniste de la LH-RH).

Le formestane présente donc une activité anti aromatase suffisamment puissante pour un usage thérapeutique, mais le principal intérêt de cette molécule est sa grande spécificité vis à vis de l'aromatase. En effet, lors d'un traitement par du formestane on n'observe aucune altération de la stéroïdogénèse surrénalienne et aucune modification notable des taux plasmatiques de cortisol, de désoxy-11 cortisol, d'hydroxy-17 progestérone ou de sulfate de

déhydroépiandrostérone. Une supplémentation en glucocorticoïdes n'est donc absolument pas nécessaire.

1.1.2. Autres activités endocrines.

L'inhibition de la biosynthèse des estrogènes par le formestane chez les femmes ménopausées, n'affecte pas de manière significative les concentrations des précurseurs androgéniques. On n'a donc pas d'accumulation néfaste de ces stéroïdes.

De même, les concentrations plasmatiques des protéines de transport des hormones sexuelles (SHBG) ne sont pas altérées de manière marquée, même si l'on relève parfois une légère diminution des concentrations plasmatiques de cette classe de globulines lors de l'administration de formestane.

Au niveau de la glande thyroïde, contrairement à l'aminoglutéthimide qui inhibe la synthèse de thyroxine, on ne relève lors des traitements par le formestane, aucune modification de synthèse des hormones thyroïdiennes.

1.2. Activité anti tumorale.

L'injection de 50 mg/kg de formestane de manière hebdomadaire, provoque une régression des tumeurs mammaires induites par du DMBA chez des rats (Wiseman *et al.* 1993). Après 4 semaines de ce traitement, près de 90 % des tumeurs ont diminué d'au moins la moitié de leur volume initial, et 43 % des tumeurs ont complètement régressé. Ces taux de réponse des tumeurs sont toujours positifs lorsque l'on passe à une administration de 50 mg/kg une semaine sur deux.

De nombreuses études de phase II ont été réalisées pour évaluer l'efficacité du formestane en seconde ligne chez des malades qui ont récidivé à la suite d'un premier traitement. De manière générale, le taux de rémission objective (RO) avec le formestane est de 25 % (avec des valeurs allant de 7 à 39 %), ces valeurs variant suivant la localisation métastatique (tableau IV.I). Le délai sans progression pour les répondeurs est de 27 mois. On n'observe pas de différence significative de résultats entre les posologies de 250 et 500 mg.

Le formestane a aussi été utilisé en traitement de première ligne par Bajetta *et al.* (1993), avec des doses de 250 à 500 mg. Les taux de réponse trouvés sont de 36 % chez les patientes hormonosensibles.

Une étude en première ligne de traitement hormonal compare le formestane (250 mg toutes les deux semaines), au tamoxifène (30 mg par jour). Les taux de réponse sont respectivement de 33 et 37 %, les durées de réponse de 458 et 604 jours et les durées de survie de 1042 et 1059 jours. On ne peut donc pas parler de différence significative entre ces deux traitements (Feutrie *et. al* 1999).

Tableau IV.I: Taux de Réponse Objective (RO) obtenus suivant les localisations métastatiques à la suite d'un traitement par du formestane (D'après Wiseman *et al.*1993).

	Effectif	RO %
Rechute sur le sein.	16	50
Peau.	24	25
Poumons.	13	30
Ganglions.	24	25
Squelette.	21	25
Foie.	8	12

1.3. Propriétés pharmacocinétiques.

1.3.1. Absorption et distribution.

Le formestane est détruit par voie orale et doit donc être utilisé par voie injectable intramusculaire. Après des doses uniques de 250 et 500 mg en intramusculaire, à des patientes ménopausées souffrant d'un cancer du sein, les concentrations plasmatiques maximales moyennes de formestane sont de 10 à 18 ng/ ml et sont atteintes en 30 à 48 heures.

Après une administration orale, la décroissance plasmatique du formestane est mono exponentielle, avec une demie vie de 2 ou 3 heures. Le formestane est rapidement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal, le pic plasmatique apparaît une heure après une dose de 250 mg et une heure et demi après une administration de 500mg. La voie orale n'est donc jamais utilisée.

Après une injection intramusculaire, le formestane est libéré lentement à partir du dépôt réalisé par l'injection. La courbe d'évolution de la concentration du formestane est biphasique avec une diminution très rapide entre 2 et 4 jours. Le demie vie d'élimination plasmatique apparente est de 5 à 6 jours et le pic plasmatique apparaît 1 à 2 jours après l'injection. Les taux plasmatiques de formestane, sont encore mesurables 3 semaines après une injection, et la substance est totalement éliminée au bout de 2 mois.

Lorsque l'on administre le formestane à raison d'une injection toutes les deux semaines, on atteint un état d'équilibre des concentrations plasmatiques à partir de la quatrième injection. La dose recommandée de 250 mg intramusculaire une semaine sur deux, permet un traitement continu sans phénomène d'accumulation excessif.

La biodisponibilité absolue du formestane n'a pas pu être évaluée du fait de la très mauvaise solubilité de la molécule en milieu aqueux. En admettant que sa biodisponibilité ne dépende que du plasma, on peut estimer que l'absorption systémique à partir de la clairance hépatique correspond à environ 20-25 % de la dose intramusculaire sur deux semaines. La liaison aux protéines sériques est de l'ordre de 82 à 86 %.

1.3.2. Métabolisme et élimination.

Il existe peu d'informations sur le métabolisme du formestane à la suite d'une injection intra musculaire. Les informations disponibles concernent surtout le métabolisme de la molécule à la suite d'une administration orale.

Le formestane subit un métabolisme hépatique rapide et complet. La substance mère et les métabolites identifiés sont retrouvés dans les urines presque exclusivement sous forme glycuconjuguée. Le principale métabolite circulant et urinaire du formestane est son glucuronide qui est pharmacologiquement inactif. Ce métabolite est retrouvé à hauteur de 20 à 45 % de la dose administrée. On a, de plus, identifié sept autres métabolites qui sont eux aussi glycuconjugués. Parmi ceux ci, on peut citer la 4-hydroxytestostérone, le 3 α -hydroxy-5 β -androstane-4,17-dione et le 4-hydroxyandrost-4,6-diène-3,17-dione.

L'élimination du formestane et de ses métabolites semble donc se faire principalement à la suite d'une conjugaison et moins de 1 % de la dose administrée est excrété inchangé dans les urines.

1.4. Usages thérapeutiques.

1.4.1. Indications.

L'indication principale du formestane est une utilisation en seconde ligne thérapeutique après un échec ou une intolérance au tamoxifène, chez la femme ménopausée en cas de cancer du sein à un stade avancé. Le formestane ne possède pas d'indication en première intention, même si certaines études ont pu montrer son efficacité (Bajetta *et.al* 1993).

1.4.2. Administration.

La dose recommandée de formestane est une injection de 250 mg toutes les deux semaines. La dose est injectée par voie intramusculaire profonde dans la partie haute du quadrant supéro externe de la fesse. On veillera, comme pour tout traitement à long terme par voie intramusculaire, à changer de côté à chaque injection.

Il faut absolument éviter toute injection intra vasculaire accidentelle, car le passage rapide dans la circulation à partir du point d'injection peut entraîner immédiatement après l'injection des symptômes divers: goût amer, bouffées de chaleur, tachycardie, dyspnée ou vertiges.

1.4.3. Effets secondaires.

Au cours des différentes études cliniques, le formestane est généralement bien toléré et les effets indésirables observés sont discrets et réversibles. Pour 79 % des patientes traitées par formestane, à raison de 250 mg toutes les deux semaines par voie intramusculaire, on n'observe aucune manifestation de type effet secondaire. Seules 5 % des patientes sont obligées d'arrêter le traitement à cause d'effets indésirables.

L'effet secondaire le plus commun à la suite de l'injection est une réaction locale se traduisant par un prurit, une douleur avec ou sans irritation, une sensation de brûlure et une tuméfaction. Dans les cas les plus sérieux, on peut avoir un hématome accompagné parfois d'un abcès stérile ou d'un granulome. Ce sont surtout ces effets locaux au niveau du point d'injection, qui sont responsables de l'arrêt du traitement, et ce pour près de 3 % des patientes.

Des effets secondaires systémiques apparaissent chez 19 % des patientes traitées par le formestane. Il s'agit essentiellement d'effets secondaires découlant de la suppression estrogénique opérée par le formestane, qui sont aussi variés que des bouffées de chaleur, des vaginites ou une certaine instabilité émotionnelle. On a aussi décrit de manière plus rare des nausées, des rashes cutanés, une somnolence, des crampes musculaires et d'autres types d'effets secondaires qui ne sont décrits que de manière rarissime.

On a aussi décrit des cas de réactions anaphylactoïdes, dans moins de 2 % des traitements, qui suivent immédiatement l'injection ou apparaissent dans les toutes premières minutes.

Le formestane est donc un traitement qui est bien toléré et qui présente beaucoup moins d'effets secondaires que l'aminoglutéthimide par exemple.

2. L'exemestane.

L'exemestane ou 6-méthylène-4-androstènedione est aussi un inhibiteur stéroïdien de l'aromatase, comme le formestane, mais il possède l'avantage d'être actif par voie orale et ne nécessite donc pas d'injection. Il s'agit d'un dérivé de l'androstènedione, avec un substitut méthylène en position 6 (Figure 4.4), qui se lie de manière irréversible au complexe enzymatique de l'aromatase.

L'exemestane est commercialisé en France depuis décembre 2000 sous le nom de spécialité d'**Aromasine®** 25 mg en comprimés enrobés.

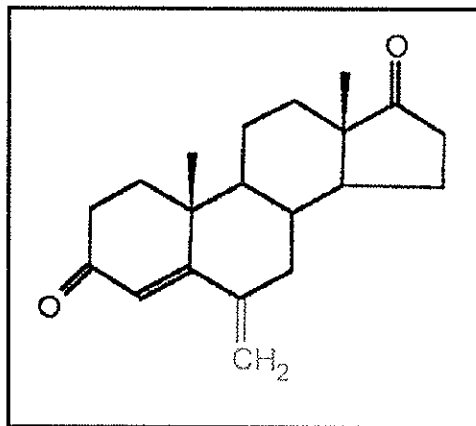


Figure 4.4: L'exémestane.

2.1. Activités biochimiques de l'exemestane

Chez les femmes ménopausées, l'exemestane par voie orale diminue significativement les concentrations sériques des estrogènes, de manière dose dépendante et ceci à partir d'une dose de 5 mg, atteignant une suppression maximale (> 90 %) pour une dose comprise entre 10 et 25 mg.

Chez des patientes ménopausées présentant un cancer du sein, traitées avec une dose journalière de 25 mg, l'aromatase dans l'ensemble de l'organisme peut être réduite de 98 % (Feutrie *et. al.* 1998). L'activité anti aromatase de l'exemestane serait donc supérieure à celle du formestane et provoquerait une diminution des taux circulants d'estrone et d'estradiol respectivement de l'ordre de 94 et 92 %. Cette diminution des taux circulants d'estrogènes est maximale 3 jours après l'administration et persiste près de 5 jours.

L'exemestane ne possède aucune activité progestative ou estrogénique. Cependant une légère activité androgénique peut être détectée lorsque l'on administre des doses supérieures à 100 mg par jour. Cette activité androgénique devant probablement être attribuée au dérivé hydroxylé en position 17 issu du métabolisme de la molécule.

Au cours des études portant sur l'administration de doses quotidiennes multiples, l'exemestane n'a pas présenté d'effet décelable sur la biosynthèse surrénalienne du cortisol ou de l'aldostérone, mesurée avant et après épreuve à l'ACTH ; ce qui démontre sa sélectivité vis-à-vis des autres enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse. La substitution en glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes n'est donc pas nécessaire.

Une légère augmentation, non dose dépendante, des taux sériques de LH et de FSH est observée, et ce même à de faibles doses : cet effet peut toutefois être attendu pour une molécule de cette classe pharmacologique et résulte probablement d'un rétrocontrôle au niveau hypophysaire, suite à une réduction des taux d'estrogènes, qui stimule la sécrétion pituitaire des gonadotrophines, même chez les femmes ménopausées.

2.2. Activités anti tumorales.

Dans une étude clinique randomisée, contrôlée et soumise à un panel indépendant de relecture des dossiers, l'exemestane à la dose quotidienne de 25 mg par jour a démontré un allongement statistiquement significatif de la survie, du délai jusqu'à progression et du temps jusqu'à échec du traitement par rapport au traitement hormonal de référence, l'acétate de mégésterol. Le tableau IV.II montre d'ailleurs que ces résultats sont clairement dose

dépendants. L'étude a été conduite chez des patientes ménopausées présentant un cancer du sein à un stade avancé progressant après ou pendant un traitement par du tamoxifène.

Lors d'une étude de phase II portant sur un effectif de 80 femmes ménopausées, on a cherché à évaluer l'efficacité de l'exemestane pour des patientes ayant progressé sous aminoglutéthimide. Le taux de réponse objective est de 26 % (12 % chez les malades résistantes à l'aminoglutéthimide et 33 % chez celles qui ont répondu). Une stabilisation est obtenue chez 13 % des malades. La durée médiane de réponse est de 59 semaines et le délai moyen sans progression de 21 semaines. Cette étude est intéressante dans la mesure où elle démontre que l'on peut obtenir des réponses positives avec un anti aromatase stéroïdien comme l'exemestane, après un échec par l'aminoglutéthimide qui est un inhibiteur non stéroïdien de l'aromatase (Thurliman *et. al.*1997).

Tableau IV.II: Efficacité de l'exemestane en 2° et 3° ligne thérapeutique (d'après Namer *et.al.* 1998).

RC: rémission complète; RP: rémission partielle; St: stabilisation; DMAP: durée médiane avant progression.

Posologie	2.5-5 mg	10-25 mg	50-60 mg
Effectif	N= 52	N= 34	N= 80
RC + RP (%)	11.5	20.5	27.5
RC + RP + St (%)	32.7	55.9	42.5
DMAP (mois)	4.0	6.2	6.9

2.3. Propriétés pharmacocinétiques.

2.3.1. Absorption et distribution.

Après une administration orale, l'exemestane est rapidement absorbé, la fraction de la dose absorbée par le tractus gastro-intestinal étant importante. La biodisponibilité absolue chez l'homme n'est pas connue, mais on s'attend à ce qu'elle soit limitée par un important effet de premier passage hépatique. Chez le rat et le chien, un effet similaire est apparu donnant une biodisponibilité absolue de 5 %.

Après administration d'une dose unique de 25 mg, les taux plasmatiques maxima de l'ordre de 18 ng/ml sont atteints en deux heures. L'ingestion concomitante d'aliments augmentant la biodisponibilité de près de 40 %.

Le volume de distribution de l'exemestane, sans tenir compte du facteur de correction de la biodisponibilité orale, est d'environ 20 litres. La cinétique est linéaire et la demi-vie terminale d'élimination est d'environ 24 heures. La fixation aux protéines plasmatiques est d'environ 90 % et reste indépendante de la concentration plasmatique de l'exemestane.

2.3.2. Métabolisme et élimination.

L'exemestane est métabolisé avec une oxydation de la fonction méthylène en position 6 par l'isoenzyme CYP 3A4 et par réduction de la fonction cétonique en 17 par l'aldocétoréductase après conjugaison.

La clairance de l'exemestane est d'environ 500 litres par heure, sans tenir compte du facteur de correction de la biodisponibilité orale.

Les métabolites sont soit inactifs, soit moins actifs que le composé parent en ce qui concerne l'inhibition de l'aromatase.

La quantité de substance éliminée sous forme inchangée dans les urines représente moins de 1 % de la dose administrée. Après une semaine, des quantités égales (40%) d'exemestane radiomarqué au ^{14}C ont été retrouvées dans les urines et les fèces.

2.4. Usages thérapeutiques.

2.4.1. Indications.

La spécialité française de l'exemestane, l'**Aromasine®**, est indiquée dans le traitement du cancer du sein à un stade avancé chez la femme ménopausée naturellement ou artificiellement, après échec du traitement par des antiestrogènes. Il s'agit donc d'un traitement en deuxième ligne thérapeutique.

L'efficacité de l'exemestane n'a pas été démontrée chez des patientes dont les cellules tumorales ne possèdent pas de récepteurs aux estrogènes.

2.4.2. Administration.

La dose usuelle d'Aromasine® est de 1 comprimé à 25 mg d'exemestane par jour. Le traitement par l'exemestane doit être maintenu jusqu'à l'apparition de signes de progression de la tumeur. On recommande d'effectuer la prise quotidienne du comprimé à la suite d'un repas, ce qui en augmente notablement la biodisponibilité.

Aucun ajustement posologique n'est nécessaire chez les patientes présentant une insuffisance hépatique ou rénale.

2.4.3. Effets secondaires.

Dans les études cliniques conduites avec l'Aromasine®, les effets indésirables étaient en général bénins à modérés. Le taux d'arrêt de traitement dû à des effets indésirables était de 2.8 % pour l'ensemble de la population recevant une dose standard de 25 mg.

On rapporte essentiellement des problèmes à type de bouffées de chaleur, des vertiges et des nausées qui sont présentes dans près de 10 % des cas. On a aussi décrit des effets secondaires à type de lymphopénie chez près de 20 % des patientes, mais ces diminutions sont discrètes et n'ont jamais de répercussion sérieuse.

On observe de même des augmentations des transaminases et des phosphatases alcalines, mais ces altérations sont le plus souvent associées à des métastases osseuses ou hépatiques préexistantes. On ne peut donc pas dire dans quelle mesure il s'agit réellement d'un effet secondaire de l'exemestane.

L'exemestane et sa spécialité Aromasine® sont donc très bien tolérés et ne présentent pas d'effet secondaire majeur conduisant à un arrêt du traitement.

C. Les inhibiteurs non stéroïdiens ou inhibiteurs de type II.

Il s'agit de la classe qui comporte le plus de molécules commercialisées sous forme de spécialités. Leurs caractéristiques communes sont un mode d'administration possible par voie orale et une réduction très marquée des estrogènes circulants chez les femmes ménopausées. De plus, de manière générale cette classe de molécules ne présente pas d'effet annexe sur le système endocrinien et possède une très bonne tolérance (Nammer *et. al.* 1998).

On distinguera dans cette classe le fadrozole d'une part, qui est considéré comme un inhibiteur de seconde génération, le létrozole, l'anastrozole et vorozole d'autre part qui sont eux considérés comme des inhibiteurs de troisième génération.

1. Le fadrozole.

Après l'aminoglutéthimide, c'est l'inhibiteur de l'aromatase non stéroïdien le plus ancien. Il s'agit d'un dérivé à noyau imidazole actif par voie orale, de formule chimique: [4-(5, 6, 7, 8-tetrahydroimidazo [1, 5 a] pyridine-5-yl) benzonitrile monohydrochloride (figure.4.5).

Lors d'études *in vitro* le fadrozole apparaît comme l'un des meilleurs inhibiteurs de l'aromatase, mais son manque de spécificité, vis à vis de l'aromatase, lors de son administration orale a limité son intérêt clinique et explique qu'il n'y ait pas eu de spécialité développée .

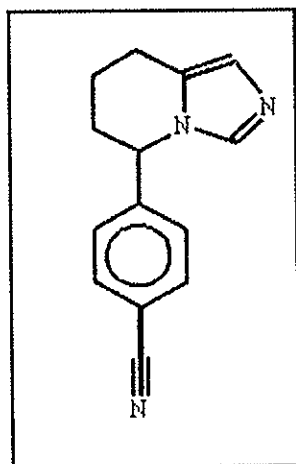


Figure 4.5: Le fadrozole.

Le fadrozole entraîne une diminution très significative des concentrations plasmatiques d'estrone et d'estradiol. Comme le montrent les tableaux III.I et III.II le fadrozole présente une excellente affinité pour le complexe enzymatique de l'aromatase et une très bonne inhibition *in vitro* de l'aromatase.

Sa demi vie après administration orale, est de 10.5 heures. Cependant le fadrozole manque de spécificité et inhibe aussi le clivage de la chaîne latérale du cholestérol de même que les 11 et 18 hydroxylases.

Lors des nombreuses études menées sur le fadrozole, on peut noter que cette molécule est active dans les traitements du cancer du sein, chez des femmes ménopausées, avec des taux de réponse de 23 % pour des doses de 1 ou 4 mg (étude sur 78 patientes de Falkson *et al.* 1992). Le délai sans progression est de 4 mois et la durée médiane de survie se situe aux alentours de 23.7 mois.

Une autre étude randomisée en double aveugle, comparant le fadrozole aux doses de 1, 2 et 4 mg chez 423 patientes recevant cette molécule comme seconde ligne d'hormonothérapie, montre des taux de réponse respectivement de 17.5 %, 18.2 % et 13.1 %. Les durées médianes de réponse étant de 15.4, 18 et 15.4 mois (Feutrie *et al.* 1999).

Lors des différentes études, les effets secondaires observés sont des bouffées vasomotrices, une asthénie, des anorexies et des nausées.

Comme le fadrozole n'a pas été développé en tant que spécialité à cause de son manque de spécificité, on ne trouve que très peu de données cliniques concernant la pharmacocinétique de cette molécule.

2. Le létrozole.

Le létrozole ou 4,4'-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)méthylène] dibenzonitrile est un dérivé triazolé (figure 4.6) développé comme inhibiteur réversible non stéroïdien de l'aromatase, efficace par voie orale.

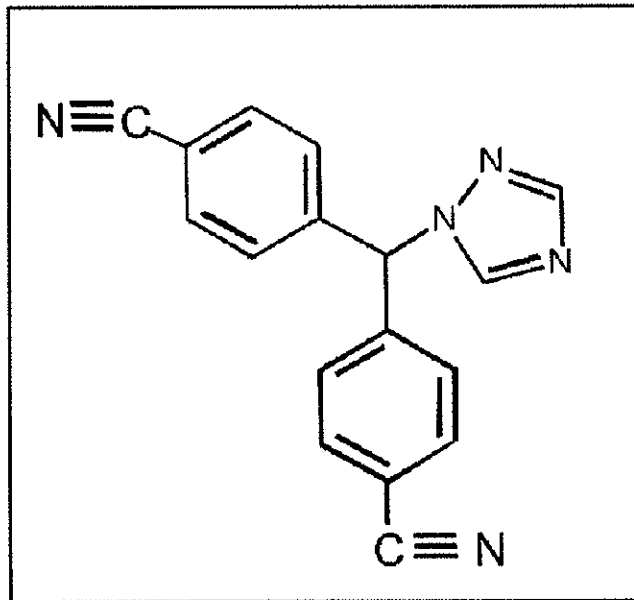


Figure 4.6: Molécule de létrozole.

Le létrozole est commercialisé en France depuis 1996 sous le nom de spécialité **Femara[®]** 2.5 mg comprimé.

2.1. Activité biochimiques du létrozole.

2.1.1. Activité anti aromatase.

Le létrozole possède une très bonne affinité pour le complexe aromatasique, près de 900 fois celle de l'aminoglutéthimide, et présente *in vitro* une activité anti aromatase 170 fois plus puissante que celle de l'aminoglutéthimide (Lamb *et. al.* 1998).

Le létrozole inhibe ainsi de manière rapide et très complète l'activité de l'aromatase, provoquant une quasi suppression des estrogènes plasmatiques. Lors d'une étude portant sur

l'administration de doses uniques de 0.1, 0.5 et 2.5 mg de létrozole chez des femmes saines ménopausées, on a observé une diminution des taux sériques d'estrone et d'estradiol respectivement de 75, 78 et 78 % par rapport aux valeurs initiales (Lamb *et. al.* 1998).

Dans une autre étude portant sur 42 patientes ménopausées souffrant d'un cancer du sein, on a observé des diminutions allant de 75 à 95 % des concentrations plasmatiques d'estrone, d'estradiol, de sulfate d'estrone et des estrogènes urinaires, après deux semaines d'administration quotidienne de 0.1 à 5 mg de létrozole. A des doses supérieures ou égales à 0.5 mg, la plupart des concentrations plasmatiques d'estrone et de sulfate d'estrone se situent en dessous de la limite de détection des méthodes de dosages, ce qui indique qu'une suppression estrogénique encore plus marquée est obtenue avec ces doses (Lamb *et. al.* 1998).

Les données *in vitro* indiquent donc que le létrozole possède une grande spécificité pour le complexe enzymatique de l'aromatase. De plus, les concentrations de létrozole nécessaires pour inhiber *in vivo* les productions de progestérone, de corticostéroïde et d'aldostérone sont près de 10 000 fois supérieures à celles que l'on utilise pour inhiber l'activité de l'aromatase, il n'y a donc pas, à priori, de risque d'effet indésirable majeur comme avec l'aminoglutéthimide.

Selon les données *in vitro* et *in vivo*, le létrozole semble être capable d'inhiber l'aromatase intra tumorale. Lors d'une étude portant sur l'administration de 2.5 mg de létrozole pendant trois mois chez des femmes ménopausées souffrant d'un cancer du sein à un stade avancé, on a noté une régression significative de l'activité aromatasique intra tumorale dans près de 90 % des cas (Lamb *et. al.* 1998).

2.1.2. Autres activités endocrines.

Lors de l'administration de létrozole, on retrouve une grande sélectivité de cette molécule vis à vis de l'aromatase. Avec des posologies de létrozole de 0.1 à 2.5 mg, on ne détecte pas d'effet significatif sur les concentrations de cortisol, d'aldostérone, de 17 α -hydroxyprogestérone, d'androstènedione ou de testostérone.

Cependant les données cliniques indiquent que les traitements au létrozole provoqueraient à long terme une augmentation de la résorption osseuse qui peut être suivie par l'évolution de marqueurs comme la pyridinoline et la deoxypyridinoline.

2.2. Activité anti tumorale.

Le létrozole a montré une réelle activité anti tumorale sur les modèles animaux. Ainsi chez des rats traités au DMBA, les doses de létrozole nécessaires pour réduire de 50 % le volume de la plupart des tumeurs sont de 10 à 30 mg/kg (Lamb *et. al.* 1998).

Des essais de phase II ont déterminé que les taux de rémission objective se situaient entre 33 et 48 % avec une posologie optimale de 2.5 mg de létrozole par jour. De même, un essai thérapeutique prospectif en double aveugle a comparé le létrozole 0.5 et 2.5 mg/j avec l'acétate de mégésterol (AM) à 160 mg/j. Les patientes, ménopausées, présentaient toutes des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone positifs et devaient avoir progressé sous tamoxifène, prescrit en phase métastatique ou en phase adjuvante. Les résultats de cette étude portant sur 551 patientes sont reportés dans le tableau IV.III. Les taux circulants d'estrone et d'estradiol chutent beaucoup plus intensément avec le létrozole qu'avec l'acétate de mégésterol. Tous les résultats sont en faveur d'une plus grande efficacité du groupe du létrozole à 2.5 mg.

Tableau IV.III: Comparaison des réponses au létrozole et à l'acétate de mégésterol (d'après Namer *et.al.* 1998).

AM: acétate de mégésterol; RC: rémission complète; RP: rémission partielle; St: stabilisation; DMR: durée médiane de rémission; DMAP: durée médiane avant progression; DMS: durée médiane de survie.

Produit	Létrozole		AM
	0.5 mg	2.5 mg	160 mg
Effectif	N= 188	N= 174	N= 189
RC (%)	3.2	6.9	4.2
RP (%)	9.6	16.7	12.2
St (%)	12.8	9.8	15.3
DMR (mois)	3.2	5.1	3.9
DMAP (mois)	5.1	5.6	5.5
DMS (mois)	21.5	25.3	21.5

Dans une autre étude comparant le létrozole 2.5 mg et 0.5 mg à l'aminoglutéthimide, chez des femmes ménopausées présentant un cancer du sein à un stade avancé, les taux de réponse observés sont respectivement de 19.5, 16.7 et 12.4 %. La durée médiane de réponse et la stabilité de la maladie sont plus longues avec le létrozole 2.5 mg (21 mois), comparé au létrozole 0.5 mg (18 mois) et à l'aminoglutéthimide (14 mois)(Bajetta *et. al.*1999). Le létrozole à la dose de 2.5 mg par jour a donc fait la preuve de son efficacité clinique.

2.3. Propriétés pharmacocinétiques.

2.3.1. Absorption et distribution.

Le létrozole est rapidement et complètement absorbé par le tube digestif et présente une biodisponibilité proche de 100 %. L'ingestion d'aliments concomitante avec la prise de létrozole diminue légèrement la vitesse d'absorption du létrozole mais ne modifie pas de manière gênante son degré d'absorption. Le temps d'absorption maximale est donc de 1 heure à jeun contre 2 heures en post prandial. La concentration maximale est de 129 ± 20.3 nmol/l à jeun contre 98.7 ± 18.6 nmol/l en post prandial. Cet effet mineur sur la vitesse d'absorption est considéré comme sans importance sur le plan clinique, le létrozole peut donc être pris sans tenir compte de l'heure des repas (Lamb *et. al.* 1998).

La liaison du létrozole aux protéines plasmatiques est d'environ 60 % et concerne principalement l'albumine à près de 55 %. Après administration de 2.5 mg de létrozole radiomarqué, près de 82 % de la radioactivité plasmatique correspond au produit inchangé. L'exposition systémique aux métabolites issus de la dégradation du létrozole est donc faible. La distribution tissulaire du létrozole est rapide et importante, le volume apparent de distribution à l'état d'équilibre étant d'environ 1.87 l/kg. Lors de l'administration quotidienne de 2.5 mg de létrozole, on obtient une concentration plasmatique stable entre 2 et 6 semaines, et les concentrations plasmatiques obtenues à l'équilibre sont près de 7 fois supérieures à celles obtenues après une dose unique de 2.5 mg.

2.3.2. Métabolisme et élimination.

La clairance métabolique (clairance métabolique: 2.1 litre/heure) en un métabolite carbinol dépourvu d'action pharmacologique est la principale voie d'élimination du létrozole.

Cependant, cette voie d'élimination est relativement lente comparée au flux sanguin hépatique (environ 90 l/ heure).

Les isoenzymes 3A4 et 2A6 du cytochrome P 450 se sont avérées toutes deux capables de transformer le létrozole en son métabolite. Le létrozole possède une plus grande affinité pour l'isoenzyme 2A6 que pour la forme 3A4, mais cette dernière forme représente près du tiers des enzymes hépatiques P450, on ne peut donc pas déterminer quelles sont les contributions exactes des deux formes enzymatiques dans le métabolisme du létrozole.

La formation de métabolites mineurs non identifiés, ainsi que l'excrétion rénale ou fécale directe ne jouent qu'un rôle mineur dans l'élimination globale du létrozole. Dans les deux semaines qui ont suivi l'administration de 2.5 mg de létrozole radiomarqué à des volontaires ménopausées saines, 88.2 % de la radioactivité ont été retrouvés dans les urines et 3.8 % dans les fèces. Au moins 75 % de la radioactivité retrouvée dans les urines, dans un laps de temps de 216 heures, ont été attribués à la forme glucuroconjuguée du métabolite carbinol, environ 9 % représentent deux métabolites non identifiés et 6 % sont du létrozole inchangé (Lamb *et. al.* 1998).

2.4. Usage thérapeutique.

2.4.1. Indications.

Le Femara[®] qui est la spécialité française du létrozole est indiqué pour le traitement du cancer du sein, à un stade avancé chez la femme ménopausée (que ce soit une ménopause naturelle ou artificielle), après échec du traitement par anti estrogènes. L'efficacité du létrozole n'a pas encore été démontrée chez des patientes négatives pour les récepteurs aux estrogènes.

Le létrozole ne possède donc pas pour le moment d'indication en première intention dans le traitement du cancer du sein, mais des essais prospectifs en double aveugle comparant le létrozole 2.5 mg/j et le tamoxifène 20 mg/j en première ligne de traitement sont actuellement en cours de réalisation (Lamb *et. al.* 1998).

2.4.2. Administration.

La dose recommandée de létrozole est de 2.5 mg en une prise quotidienne. Le traitement par Femara® doit être poursuivi jusqu'à progression documentée de la tumeur. Aucun ajustement de la dose n'est nécessaire chez la patiente âgée.

2.4.3. Effets secondaires.

Lors des essais cliniques, les effets indésirables ont généralement été discrets à modérés et rarement assez sévères pour imposer l'arrêt du traitement. En fait, lors des études, ces divers effets sont ressentis par près de 76 % des patientes, mais seulement 33 % de ces événements peuvent être attribués à la prise quotidienne de létrozole 2.5 mg. Ces effets secondaires ne semblent d'ailleurs pas être dose dépendants.

Les effets indésirables les plus couramment décrits sont : des maux de tête (7% des patientes), des nausées (6%), de la fatigue (5%), des bouffées de chaleur (5%), des œdèmes périphériques (6%) et de manière encore moins fréquente des éruptions cutanées, des vomissements et des hypercholestérolémies.

Les seuls effets indésirables plus sérieux décrits dans quelques cas, sont des troubles cardiovasculaires à type de thromboembolies. Ceci peut être pris en compte et encourager l'instauration d'une surveillance particulière chez des personnes présentant un terrain propice aux pathologies cardiovasculaires.

3. L'anastrozole.

L'anastrozole est un inhibiteur de l'aromatase non stéroïdien, très sélectif, actif par voie orale et adapté au traitement du cancer du sein hormonodépendant à un stade avancé chez la femme ménopausée. Il s'agit d'un dérivé triazolé, proche du létrozole, de formule chimique 2,2'-diméthyl-2,2'-[5-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl)méthyl]benzène-1,3-diyl]dipropanenitrile (figure 4.7), qui est commercialisé en France sous le nom de spécialité d'**Arimidex®** 1mg. Depuis février 2000, l'**Arimidex®** est devenu une alternative au traitement par le tamoxifène. L'anastrozole est ainsi le premier inhibiteur sélectif de l'aromatase à pouvoir être utilisé dans le cancer du sein avancé hormonodépendant de la femme ménopausée en première ligne de traitement.

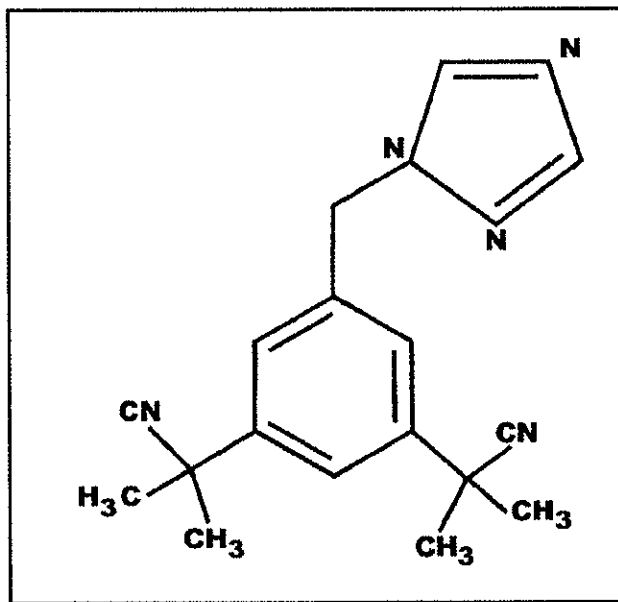


Figure 4.7: L'anastrozole.

3.1. Activités biochimiques de l'anastrozole.

3.1.1. Activités anti aromatase.

L'anastrozole possède *in vitro* une puissante activité inhibitrice de l'aromatase et présente une IC₅₀ de 15 nM vis à vis de l'aromatase placentaire.

Avec la dose optimale de 1 mg par jour, on obtient une diminution de 85 % des taux circulants d'estradiol et de 90 % des taux circulants d'estrone (Feutrie *et al.* 1999).

La réduction des taux d'estrogènes circulants est relativement rapide et se produit en moins de 12 heures, ce qui dispense de l'administration d'une dose de charge.

De plus, aucune diminution de l'effet de l'anastrozole sur les taux sériques d'estrogènes n'a été mise en évidence lors de traitement de longue durée.

Une étude randomisée, en double aveugle, multicentrique et croisée, a été menée chez douze femmes ménopausées ayant un cancer du sein à un stade avancé, afin de comparer les effets de doses journalières de 1 et de 10 mg d'anastrozole, administrées par voie orale (Geisler *et al.* 1996). L'anastrozole est bien toléré aux deux doses sans différence significative. Après 28 jours de traitement, l'activité aromatasique est diminuée de près de 96.7 % avec la dose de 1 mg et à près de 98.1 % avec la dose de 10 mg. Les concentrations plasmatiques d'estradiol, d'estrone et de sulfate d'estrone sont toutes trois diminuées comme le montre le tableau IV.IV.

Tableau IV.IV: Réduction des concentrations plasmatiques moyennes d'estrogènes après traitement par anastrozole pendant 28 jours (d'après Geisler *et al.* 1996).

Concentrations plasmatiques moyennes (et % de réduction).	Avant traitement.	Anastrozole 1mg.	Anastrozole 10 mg.
Estradiol (pmol/ l).	17.7	2.8 (84.0)	2.9 (83.5)
Estrone (pmol/ l).	73.0	9.7 (86.8)	9.8 (86.5)
Sulfate d'estrone (pmol/ l).	387.2	25.3 (93.5)	16.9 (95.7)

3.1.2. Autres activités endocriniennes.

L'anastrozole a été étudié à des doses comprises entre 1 et 10 mg/ kg sur divers modèles animaux, afin de déceler toute activité pharmacologique sortant du cadre des indications thérapeutiques recherchées. A la dose de 1 mg/ kg (dose étant au moins égale à 10 fois la dose recommandée en clinique), l'anastrozole n'a pas d'autre activité pharmacologique que l'inhibition de l'aromatase.

Chez des femmes ménopausées traitées par l'anastrozole aux doses journalières de 5 mg et 10 mg, on a mesuré les concentrations de cortisol et d'aldostérone avant le traitement puis 14 jours après et enfin après stimulation par de l'ACTH. Les synthèses de cortisol et d'aldostérone n'ont pas été modifiées au cours de ces études par la prise d'anastrozole.

L'anastrozole est donc un inhibiteur de l'aromatase hautement sélectif, qui permet d'effectuer des traitements au long cours sans nécessiter de corticothérapie compensatrice.

3.2. Activités anti tumorale.

Il faut distinguer l'efficacité anti tumorale de l'anastrozole en première ligne ou en deuxième ligne de traitement. Le traitement de première ligne faisant toujours référence est le Tamoxifène 20mg. La deuxième ligne de traitement correspond en général à une récurrence après un traitement initial par un anti estrogène qui, le plus souvent est le Tamoxifène. Le traitement de référence pour la deuxième ligne est actuellement l'Acétate de mégestrol 40 mg quatre fois par jour.

3.2.1. Efficacité en première ligne de traitement.

Une analyse combinée de deux vastes études a été réalisée, avec un effectif total de 1021 patientes pour comparer l'anastrozole 1 mg au tamoxifène 20 mg (Nabholtz *et al.* 1999). Le tableau IV.V montre qu'il existe une réelle équivalence entre l'efficacité de l'Arimidex[®] 1 mg et le tamoxifène 20 mg dans le traitement de patientes ménopausées avec un cancer du sein hormonodépendant à un stade avancé.

Au travers de cette étude combinée, il apparaît qu'Arimidex[®] 1 mg est au moins aussi efficace que le Tamoxifène 20 mg en première ligne dans le traitement du cancer du sein hormonodépendant de la femme ménopausée. L'Arimidex[®] 1 mg peut donc être proposé comme une alternative efficace au tamoxifène 20 mg dans un protocole de première ligne de traitement. L'Arimidex[®] 1 mg et de manière plus générale l'anastrozole, est donc le premier inhibiteur sélectif de l'aromatase à posséder une indication en première ligne de traitement.

Tableau IV.V: Comparaison entre les résultats obtenus lors d'un traitement en première ligne par Arimidex® 1 mg et lors un traitement par du Tamoxifène 20 mg (d'après Nabholtz *et. al.* 1999).

	Arimidex® 1mg Effectif = 511	Tamoxifène 20mg Effectif = 510
Réponse objective (RC + RP)	29.0	27.1
Réponse complète (RC)	4.7	4.1
Réponse partielle (RP)	24.3	22.9
Stabilisation au delà de 24 semaines	28.2	24.9
Progression (%)	39.7	45.7
Durée médiane de la réponse (mois)	16.4 (n =148)	17.2 (n = 138)
Durée médiane de réponse objective et stabilisation au delà de 24 semaines (mois)	15.9 (n =292)	14.6 (n =265)

3.2.2. Efficacité en deuxième ligne de traitement.

L'anastrozole a fait l'objet de plusieurs études randomisées de phase III chez des femmes ménopausées présentant un cancer du sein hormonodépendant. Lors de ces études on a comparé l'efficacité de l'anastrozole avec celle de l'acétate de mégéstron, chez des patientes dont le cancer du sein avait progressé lors d'un précédent traitement par du tamoxifène (Jonat *et. al.* 1996).

Lors de ces études, l'évaluation initiale de l'efficacité a été effectuée après une médiane de suivi de 6 mois. Au moment de cette évaluation, l'efficacité de l'anastrozole 1mg et 10 mg étaient comparables à celle de l'acétate de mégéstron en termes de survie sans progression, de délai avant échec au traitement et de réponse objective. Après une médiane de survie de 6 mois, seulement 15 % des patientes incluses dans l'étude étaient décédées.

Après un suivi médian de 31 mois, l'analyse des résultats en terme de survie montre un léger bénéfice pour le traitement par l'anastrozole 1 mg (tableau IV.VI).

Tableau IV.VI: Comparaison des survies à 31 mois pour des traitements par l'anastrozole 1 mg, 10 mg et pour l'acétate de mégésterol (d'après Jonat *et. al.* 1996).

Résultats après 31 mois.	Anastrozole 1 mg n =263	Anastrozole 10 mg n =248	Acétate de mégésterol n =253
Nombre de décès.	151 (57.4)	151 (60.9)	171 (67.6)
Survie à 24 mois.	56.1 %	54.6 %	46.3 %
Médiane de survie (mois)	26.7	25.5	22.5

Si l'on étudie de manière plus détaillée les résultats et les taux de réponse aux différents traitements; que ce soient les réponses partielles ou les réponses complètes; on s'aperçoit que l'anastrozole 1 mg est un traitement au moins aussi efficace que l'acétate de mégésterol pour les femmes ménopausées avec un cancer du sein hormonodépendant, à un stade avancé, ayant déjà progressé sous tamoxifène 20 mg ou lors d'un précédent traitement par d'autres antiestrogènes.

3.3. Propriétés pharmacocinétiques.

3.3.1. Absorption et distribution.

De manière générale lors d'une administration unique, l'absorption de l'anastrozole est rapide, les concentrations plasmatiques maximales étant atteintes 2 heures après la prise chez des patients à jeun. Les concentrations plasmatiques d'anastrozole augmentent de manière quasi linéaire avec l'augmentation des doses.

La demie vie de l'anastrozole à la suite d'une prise unique est supérieure à 30 heures.

Lors d'administrations répétées d'anastrozole, l'état d'équilibre des concentrations est obtenu en 7 jours dans 90 à 95 % des cas et les concentrations obtenues sont trois fois plus élevées que lors d'une administration unique. La demie vie d'élimination plasmatique de l'anastrozole est alors de 40 à 50 heures.

L'ingestion d'aliments concomitante avec la prise d'anastrozole entraîne une légère diminution de la vitesse d'absorption, sans influencer cependant l'ampleur de celle-ci. Il est peu vraisemblable que la légère variation de la vitesse d'absorption constatée se traduise par un effet cliniquement significatif sur concentrations plasmatiques à l'équilibre dans le cadre d'une administration quotidienne d'anastrozole.

La liaison de l'anastrozole aux protéines plasmatiques est de l'ordre de 40 %.

3.3.2. Métabolisme et élimination.

L'anastrozole subit chez la femme ménopausée un métabolisme intense, moins de 10 % de la dose étant excrétés par voie urinaire sous forme inchangée dans les 72 heures suivant l'administration.

L'anastrozole est métabolisé au niveau hépatique en subissant une N-désalkylation, une hydroxylation et enfin une glucuronoconjugaison. Le composé triazolé produit à la suite de ces étapes, qui est le principal métabolite plasmatique et urinaire, n'inhibe pas le complexe enzymatique de l'aromatase. Les métabolites sont excrétés principalement au niveau urinaire, l'élimination fécale étant très faible.

Malgré son important métabolisme hépatique et son élimination rénale, la clairance orale de l'anastrozole n'est pas modifiée de manière significative chez des patientes souffrant de cirrhose du foie ou d'une insuffisance rénale stabilisée. De plus, la pharmacocinétique de l'anastrozole ne semble pas être modifiée chez les personnes âgées et ne nécessite donc pas d'adaptation posologique.

3.4. Usage thérapeutique.

3.4.1. Indications.

La spécialité française de l'anastrozole, l'Arimidex®, possède donc une indication dans les formes évoluées des cancers du sein hormonodépendants chez les femmes

ménopausées. On trouve alors deux situations bien distinctes pour lesquelles l'Arimidex® peut être utilisé:

- On utilise l'Arimidex® comme alternative au tamoxifène 20 mg en première ligne de traitement.
- On utilise l'Arimidex® en deuxième ligne de traitement chez des patientes ayant progressé sous un traitement par des antiestrogènes.

3.4.2. Effets secondaires.

Les effets indésirables observés à la suite de la prise d'anastrozole se sont avérés en général très modérément sévères, et n'ont que rarement donné lieu à l'arrêt du traitement.

On observe des effets qui sont plus ou moins attendus, compte tenu de la classe pharmacologique de l'anastrozole, comme des bouffées de chaleur, une sécheresse des muqueuses et une certaine tendance à l'alopécie. Mais on a aussi décrit des effets indésirables plus variés à type de troubles digestifs, de céphalées ou d'éruptions cutanées.

On a aussi pu observer des augmentations des taux de cholestérol total qui sont donc à surveiller. Il a aussi été décrit des saignements vaginaux, qui surviennent lors des premières semaines qui ont suivi le relais du traitement hormonal existant par l'anastrozole. Ces saignements sont sans gravité mais doivent nécessiter un examen gynécologique s'ils persistent.

Le principal avantage de l'anastrozole 1 mg en terme de tolérance est d'entraîner moins de prise de poids que l'acétate de mégestrol. Cette prise de poids est en effet ressentie par les patientes comme un véritable effet indésirable.

La tolérance clinique de l'anastrozole a été évaluée après un suivi de 6 et 12 mois dans deux études pivots de phase III; au cours desquelles l'anastrozole 1 mg et 10 mg ont été comparés à l'acétate de mégestrol chez 508 femmes ménopausées avec un cancer du sein avancé ayant évolué sous tamoxifène (Buzdar *et. al.*, 1998). L'incidence des événements indésirables graves est reportée dans le tableau IV.VII. Les arrêts de traitement en raison d'événements indésirables ont été très peu fréquents et ne représentent que 1.9 % des cas pour les traitements par l'anastrozole.

Tableau IV.VII : Incidence des événements indésirables graves liés au traitement par l'anastrozole (d'après Buzdar *et. al.*, 1998).

	Anastrozole 1 mg N = 262	Acétate de mégésterol N = 253
Evènements indésirables graves (menace vitale, hospitalisation, incapacité).	16 (6.1)	23 (9.1)
Arrêts du traitement à la suite des événements indésirables.	5 (1.9)	10 (4)
Décès liés aux événements indésirables.	0 (0)	2 (0.8)

4. Le vorozole.

Le vorozole est un inhibiteur non stéroïdien de la troisième génération des inhibiteurs de l'aromatase, de structure triazolée de formule: 6-[(4-chlorophenyl)(1H-1,2,4-triazol-1-yl)méthyl]1-méthyl-1H-benzotriazole (figure 4.8). L'énantiomère dextrogyre est deux fois plus actif que le racémique. La molécule de vorozole est très proche de celle du létrozole et de l'anastrozole, que ce soit au niveau de la spécificité vis à vis de l'aromatase ou de sa puissance inhibitrice.

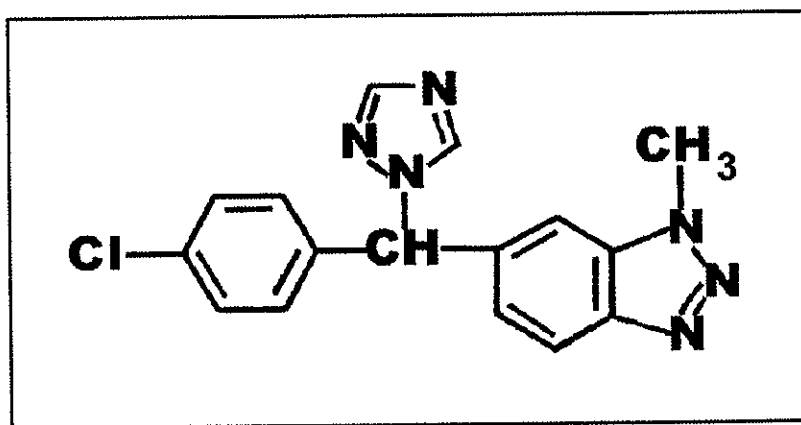


Figure 4.8: Le vorozole.

Le vorozole a été développé par le laboratoire Janssen sous le nom de spécialité **Rivizor**[®], mais n'a pu être commercialisé en France, n'apportant pas assez de nouveauté par rapport aux spécialités déjà développées à partir de l'anastrozole et du létrozole.

4.1. Activités biochimiques du vorozole.

4.1.1. Activités anti-aromatase.

Le vorozole possède une activité inhibitrice vis à vis du complexe enzymatique de l'aromatase qui a pu être mise en évidence *in vitro* sur des microsomes placentaires humains. Lors de ces études, on a pu déterminer son IC₅₀ qui se situe dans une fourchette de 0.33 à 1.4 nmol/l selon les auteurs (Bajetta *et al.* 1999, Feutrie *et al.* 1999).

Au dosage de 2.5 mg par jour, le vorozole a été le premier des inhibiteurs de troisième génération à montrer une activité inhibitrice de l'aromatase intra tumorale, chez des patientes présentant un cancer du sein à un stade avancé et ce dès la première semaine de traitement. Cette activité aromatasique intra tumorale pouvant être diminuée de près de 90 % (Bajetta *et al.* 1999).

Après administration orale de 1 mg de vorozole, on observe une diminution moyenne de 93 % de la conversion de l'androstènedione en œstrone et de près de 94 % après administration de 5 mg. Les taux plasmatiques d'estrogènes sont à la limite de la détection en moins d'un mois de traitement.

4.1.2. Autres activités endocrines.

Lors de l'administration de vorozole, on n'observe aucune modification des concentrations plasmatiques de cortisol, d'aldostérone, de testostérone, de FSH ou de LH. Un éventuel traitement par du vorozole ne nécessite donc aucune supplémentation.

4.2. Activités anti tumorale.

L'administration de 2.5 mg de vorozole à des rats, sur lesquels on a induit des tumeurs par du DMBA, inhibe la croissance de la tumeur à près de 90 % et provoque une régression pratiquement complète tout en évitant la formation de nouvelles tumeurs.

Les principaux résultats disponibles sont issus d'un essai de phase III, portant sur 452 femmes ménopausées d'âge moyen 65.3 ans, et qui présentaient un cancer du sein avancé ayant progressé sous tamoxifène (Goss *et al.*, 1997). Parmi ces patientes 225, ont reçu un traitement avec 2.5 mg de vorozole quotidiennement et 227 ont reçu 40 mg d'acétate de mégestrol quatre fois par jour. En plus des simples résultats quantitatifs, on a aussi cherché à évaluer le bénéfice en terme de changement de la qualité de vie ressenti par les patientes. A la fin de cette étude seules 41 patientes avaient interrompu leur traitement.

Les taux de réponse observés lors de cette étude sont sensiblement les mêmes, 10.5 % pour le vorozole contre 7.5 % pour l'acétate de mégestrol et si l'on inclus les patientes dont la stabilisation a été supérieure à 6 mois, on obtient des taux de réponse de 21 % pour le vorozole et 24 % pour l'acétate de mégestrol. La durée moyenne de réponse est plus longue pour les patientes recevant le vorozole mais cette différence ne semble pas significative: 18.2

mois contre 12.5 mois. Les délais sans progression sont respectivement de 2.6 mois et 3.6 mois pour le vorozole et l'acétate de mégestrol et les temps de survie de 26.3 mois et 28.8 mois.

Les réponses en matière de qualité de vie sont sensiblement les mêmes pour les deux traitements, avec cependant un léger avantage au niveau du bénéfice psychologique obtenu dans le groupe traité par le vorozole. Ce genre de résultat reste toutefois extrêmement difficile à analyser.

De telles études de phase III ont aussi été menées pour comparer les résultats obtenus lors d'un traitement par du vorozole avec ceux obtenus lors d'un traitement par de l'aminoglutéthimide. Les résultats constatés lors de ces deux traitements ne diffèrent guère l'un de l'autre.

Nous voyons donc que le vorozole possède une activité et une efficacité qui sont tout à fait comparables à celles des molécules de référence que sont l'acétate de mégestrol et l'aminoglutéthimide.

CHAPITRE V: CONCLUSIONS.

Nous avons donc vu qu'il était possible de distinguer trois générations d'inhibiteurs de l'aromatase ou anti- aromatases (classification selon Reddy *et.al.* 1998):

- La première génération représentée essentiellement par l'aminoglutéthimide et le formestane.
- La seconde génération qui comprend l'exemestane et le fadrozole.
- La troisième génération avec le vorozole, l'anastrozole et le létrozole.

D'une manière générale, on peut dire que cette classe médicamenteuse est de plus en plus spécifique et de mieux en mieux tolérée. Il s'agit sans doute d'un des aspects de l'hormonothérapie qui s'est le plus étoffé. Les résultats obtenus par la troisième génération en terme de réponse thérapeutique sont de plus en plus avantageux, et certaines molécules comme l'exemestane possèdent aujourd'hui une indication en première ligne de traitement au même titre que le tamoxifène. Petit à petit, ces molécules prennent de l'importance dans les différents protocoles thérapeutiques qui existent pour lutter contre les cancers du sein chez les femmes ménopausées. Cependant la relation qui existe entre la diminution des niveaux d'estrogènes et l'efficacité clinique n'est pas aussi marquée que l'on pouvait l'espérer. En effet le bénéfice clinique n'est pas à la hauteur de ce que l'on attendait, par rapport au gain observé dans l'inhibition de la synthèse des estrogènes lorsque l'on passe de l'aminoglutéthimide aux nouveaux anti-aromatases.

Les anti-aromatases ont jusqu'à présent étaient utilisés comme traitement de cancers évolués, il est judicieux de penser que leur usage peut être étendu à des traitements adjuvants, voire même à des traitements préventifs chez des patientes identifiées comme étant à risque. Mais dans cette optique, leur efficacité dans la suppression de la synthèse des estrogènes, peut être un facteur limitant, puisque l'effet des estrogènes sur le métabolisme des os et des lipides est favorable.

Un autre phénomène qui risque de limiter l'utilisation de cette classe de molécule est l'apparition d'une certaine résistance aux anti-aromatases. Les mécanismes de ces résistances ne sont pas encore bien déterminés et regroupent différentes anomalies au niveau des facteurs d'hormonosensibilité : perte de certains récepteurs hormonaux, récepteurs défectifs, sélection clonale de cellules hormonoinsensibles, activité sur ces récepteurs d'autres mutagènes. Mais on peut aussi observer une résistance liée à une suppression insuffisante de la sécrétion estrogénique en raison d'une activité aromatase anormalement élevée, de formes mutées

d'aromatase, d'expositions à des estrogènes d'autre origine ($\Delta 5$ -androgènes, estrogènes exogènes, polluants industriels et phytoestrogènes).

Il est cependant très encourageant de constater qu'il n'y a pas de résistance croisée entre les anti-aromatases stéroïdiens et les non stéroïdiens.

Enfin, il pourrait être intéressant d'étudier l'activité de ces molécules sur des patientes en activité génitale. En effet, les derniers anti-aromatases semblent assez puissants pour induire une sérieuse réduction des estrogènes, au moins au niveau tumoral.

Malgré les différentes interrogations qui persistent et les restrictions inhérentes au statut des patientes vis à vis des récepteurs hormonaux; la classe des anti-aromatases constitue indéniablement un progrès important dans l'hormonothérapie anti-cancéreuse. Cette avancée est sans doute la plus évidente au niveau de la tolérance des traitements, surtout si l'on considère que l'aminoglutéthimide reste la molécule de référence de cette classe thérapeutique. Les anti-aromatases ont maintenant remplacé les progestatifs en seconde ligne de traitement et deviennent même pour certains, des traitements de première intention, cas de l'anastrozole par exemple.

L'avenir de cette classe thérapeutique passe tout d'abord par une connaissance accrue de la structure moléculaire du complexe enzymatique de l'aromatase et de son fonctionnement. En effet, nous avons vu dans le chapitre I que ces éléments ne sont pas encore totalement maîtrisés. Cette meilleure connaissance de l'aromatase devrait permettre de mieux comprendre les phénomènes de résistance, et d'envisager de nouvelles lignes thérapeutiques associant par exemple des inhibiteurs stéroïdiens et non stéroïdiens pour contrer tout phénomène de résistance. On peut aussi imaginer des associations avec des anti-aromatases et des analogues de la LH-RH ou des anti-aromatases et de nouveaux anti-estrogènes. Ainsi, on peut penser que l'efficacité accrue de cette classe thérapeutique ne passera sans doute pas par une augmentation de leur puissance inhibitrice, mais par l'élaboration de protocoles les associant pour le mieux avec des classes thérapeutiques complémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- **Ahmed S, Davis PJ:** Molecular modelling of inhibitors of aromatase- A novel approach.
Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995, 5, 1673-8.
- **Ahmed S, Davis PJ:** The mechanism of aromatase- a molecular modelling perspective.
Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995,5, 2789-94.
- **Akhtar M, Calder MR, Corina DL, Wright JN:** Mechanistics studies on C-19-demethylation in estrogen biosynthesis.
Biochem. J., 1982, 201, 569-80.
- **Akkani A, Paterlini G:** 6b-Propynyl-Substitued Steroids: Mechanism-Base Enzyme-Activated Irreversible Inhibitors of Aromatase.
J. Med. Chem., 1997, 40, 3263-70.
- **Aleem FA, Valdivia E, Colas AE:** The aromatizing activity of placental mitochondrial microsomal fractions.
Gynecol. Invest., 1970, 1, 277-287.
- **Amarneh BA, Simpson ER:** Detection of aromatase cytochrome P450, 17 α -hydroxylase cytochrome P450 and NADPH: P450 reductase on the surfaces of cells in which they are expressed.
Mol. Cell. Endocrinol., 1996, 119, 69-74.
- **Auvray P, Moslemi S, Sourdain P:** Evidence for a new non-steroidal aromatase inhibition and comparison with equine aromatase inhibition for an understanding of the mammalian active site.
Eur. J. Med. Chem., 1998, 33, 451-62.
- **Bajetta E, Zilembo N, Buzzoni R, Noberasco C, Celio L, Bisachiaso E:** Efficacy and tolerability of 4-hydroxy-androstenedione (4-OHA) as first line treatment in postmenopausal patients with breast cancer after adjuvant therapy.
Cancer. Treat. Rev., 1993, 19, 31-6.

- **Bajetta E, Zilembo N, Bisachiaso E.:** Aromatase inhibitors in the treatment of post menopausal breast cancer.
Drugs. Aging., 1999, 15, 271-83.

- **Beatson GT.:** On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment with illustrative cases.
Lancet., 1896, 2, 104-7.

- **Berkovitz GD, Carter KM, Migeon CJ, Brown TR.:** Down-regulation of the glucocorticoid receptor by dexamethasone in cultured human skinfibroblasts: implications for the regulation of aromatase activity.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1988, 66, 1029-1036.

- **Bershtein LM, Larionov AA, Kriukova OG, Kochnev VA, Semiglazov VF.:** Aromatase activity in human muscle tissue .
Vopr. Med. Khim., 1996, 42, 76-82.

- **Blanco JG, Gil RR, Alvarez CI, Patrino LC, Genti-Raimondi S, Flury A.:** A novel activity for group of sesquiterpenes lactones : inhibition of aromatase.
FEBS. Letters, 1997, 409, 396-400.

- **Braunstein GD.:** Aromatase and gynecomastia.
Endocr. Relat. Cancer., 1999, 6, 315-24.

- **Brodie AM, Son C, King DA, Meyer KM, Inkster SE.:** Lack of aromatase in human prostatic tissue: effects of 4-OHA and other inhibitors on androgen metabolism.
Cancer. Res., 1989, 49, 6551-5.

- **Brodie AM.:** Aromatase , its inhibitors and their use in breast cancer treatment.
Pharmac. Ther., 1993, 60, 501-15.

- **Brodie AM, Inkster SE.:** Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1993, 44, 549-55.
- **Brueggemeir RW, Li PK, Chen HH, Moh PP, Katlic NE.:** Steroidal inhibitors as chemical probes of the active site of aromatase.
J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1990, 44, 357-365.
- **Brueggemeir RW, Katlic NE.:** aromatase inhibition by an enzyme-activated irreversible inhibitor in human carcinoma cell cultures.
Cancer. Res., 1990, 50, 3652-6.
- **Bulun SE, Noble L, Takayama K, Michael MD, Agarwal V, Fischer C, Zhao Y, Hinshelwood MM, Ito Y, Simpson E.:** Endocrine disorders associated with inappropriately high aromatase expression.
J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1997, 61, 133-9.
- **Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H, Noble L, Michael D, Simpson E, Johns A, Putman M.:** Estrogen production in endometriosis and use of aromatase inhibitors to treat endometriosis.
Endocr. Relat. Cancer., 1999, 6, 293-301.
- **Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H.:** Estrogens biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance.
J. Mol. Endocrinol., 2000, 25, 35-42.
- **Buzdar AU, Jonat W, Howell A.:** Anastrozole versus megestrol acetate in the treatment of postmenopausal women with advanced breast carcinoma.
Cancer., 1998, 83, 1142-52.
- **Cannon-Albright LA, Skolnick MH.:** The genetics of familial breast cancer.
Semin. Oncol., 1996, 23, 1-5.

- **Chen S, Besman MJ, Sparkes RS, Zollman S, Klisak I, Mohandas T, Hall PF, Shively JE.:** Human aromatase : cDNA cloning, southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15.
DNA, 1988, 7, 27-38.
- **Claus EB, Risch NJ, Thompson WD.:** Age at onset as an indicator of familial risk of breast cancer.
Am. J. Epidemiol., 1990, 131, 961-72.
- **Colditz GA, Strampfer MJ, Willett WC, Hennekens CH.:** Prospective study of oral contraceptive use and the risk of breast cancer women.
J. A. M. A., 1990, 260, 652-6.
- **Cole PA, Robinson CH.:** Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 Aromatase.
J. Med. Chem., 1990, 33, 2933-42.
- **Cole PA, Robinson CH.:** Mechanistic studies on a placental aromatase model reaction.
J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 8130-7.
- **Delamare J, Delamare F, Gélis-Malville E, Delamare L.:** Dictionnaire des termes de médecine (23^o édition).
Paris : *Les éditions Maloine*, 1992-1058.
- **Dikkeschei LD, Wolthers BG, Bos-Zuur I, Brutel de la Rivière G, Nagel GT, Van der Kolk DA, Willemse PHB.:** Optimization of a classical aromatase activity assay and application in normal, adenomatous and malignant breast parenchyma.
J. Steroid. Biochem. Molec. Biol., 1996, 59, 305-13.
- **Edery M, Goussard J, Dehennin L, Scholler R, Reiffsteck J and Drosdowsky MA.:** Endogenous estradiol-17 β concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and by radiomimmunoassay : relationship to receptor content.
Eur. J. Cancer., 1981, 17, 115-120.

- **Etienne J.:** Biochimie génétique. Biochimie moléculaire- 3^eédition.
Paris, *Masson*, 1996, 493.
- **Falck F, Ricci A, Wolff MS.:** Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer.
Arch. Environ. Health., 1992, 47, 143-6.
- **Falkson G, Raats JI, Falkson MC.:** Fadrozole hydrochloride, a new non toxic aromatase inhibitor for the treatment of patients with metastatic breast cancer.
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., 1992, 43, 161-5.
- **Feuillan P, Merke D, Leschek EW, Cutler GB.:** Use of aromatase inhibitors in precocious puberty.
Endocr. Relat. Cancer., 1999, 6, 303-6.
- **Feutrie ML, Bonnetterre J.:** Les anti-aromatases.
Bull. Cancer., 1999, 86, 821-7.
- **Gail MH, Brinton LA, Byar DP.:** Projecting individualized probability of developing breast cancer for white females who are being examined annually.
J. Natl. Cancer. Inst., 1989, 81, 1879-89.
- **Geisler J, King N, Dowsett M.:** Influence of anastrozole (Arimidex®), a selective, non steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in post menopausal female volunteers.
Br. J. Cancer., 1996, 74, 1286-91.
- **Goss P, Winer E, Tannock I, Schwartz I.:** Randomized phase III trial comparing the new potent and selective third generation aromatase inhibitor vorozole with megestrol acetate in postmenopausal advanced breast patients.
J. Clin. Oncol., 1997, 17, 52-63.

- **Graham-Lorence S, Khalil MW, Lorence MC, Mendelson CR, Simpson ER.:** Structure-function relationships of human aromatase cytochrome P450 using molecular modeling and site-directed.
J. Biol. Chem., 1991, 266, 11939-46.
- **Graham-Lorence S, Amarneh B, White RE, Peterson JA, Simpson ER.:** A three-dimensional model of aromatase cytochrome P450.
Protein Science., 1995, 4, 1065-80.
- **Grodin JM, Siterii PK, Mac Donald PC.:** Source of estrogen production in postmenopausal women.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 1973, 36, 207.
- **Grumbach Y.:** Imagerie du sein.
Journées françaises de radiologie., Paris, 1996, 8.
- **Harada N, Yamada K, Saito K, Kibe N, Dohmae S, Tagaki Y.:** Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990, 166, 365-372.
- **Haseman CA, Ravichandran KG, Peterson JA, Deisendorfer J.:** Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2-3 Å resolution.
J. Mol. Biol., 1994, 236, 1169-85.
- **Henderson D, Habenicht UF, Nishino Y, El Etreby MF.:** Estrogens and benign prostatic hypertrophy: the basis for aromatase inhibitor therapy.
Steroids., 1987, 50, 219-33.
- **Hiramatsu M, Maehara I, Ozaki M, Harada N, Orikasa S, Sasano H.:** Aromatase in hyperplasia and carcinoma of human prostate.
Prostate, 1997, 31, 118-124.

- **Inkster SE, Brodie AMH.:** Immunocytochemical studies of aromatase in early and full term human placental tissues: comparison with biochemical assays.
Biol. Reprod., 1989, 41, 889-98.
- **Inkster SE, Brodie AMH.:** Expression of aromatase cytochrome P450 in premenopausal and postmenopausal human ovaries: an immunocytochemical study.
J. Clin. Endocr. Metab., 1991, 73, 717-26.
- **Jensen OM, Esteve J.:** Cancer in the European Community and its members States.
Eur. J. Cancer., 1990, 26, 1167-256.
- **Jonat W, Howell A, Blomquist C, Eiermann W, Winblad G, Tyrrel C.:** A randomized trial of the new specific aromatase inhibitor Arimdex® *versus* megestrol acetate (MA) in the treatment of post menopausal women with advanced breast cancer.
Eur. J. Cancer., 1996, 32, 404-12.
- **Kirschner MA, Schneider G, Ertel NH.:** Obesity, androgens, estrogens and cancer risk.
Cancer Res., 1982, 42, 3281.
- **Kwon JY, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, Mc Andrew BJ, Penman DJ.:** Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation.
J. Exp. Zool., 2000, 287, 46-53.
- **Lamb HM, Adkins JC.:** Letrozole. A review of its use in postmenopausal women with advanced breast cancer.
Drugs., 1998, 56, 1125-40.
- **Le Bail JC, Laroche T, Marre-Fournier F, Habrioux G.:** Aromatase and 17 β -hydroxysteroid deshydrogenase inhibition by flavonoids.
Cancers Letters, 1998, 133, 101-6.

- **Lephart ED.:** A review of brain aromatase cytochrome P450.
Brain. Res. Rev., 1996, 22,1-26.
- **Lipton A, Santen RJ, Santner SJ, Harvey HA, Sanders SI, Matthews YL.:**
Prognostic value of breast cancer aromatase.
Cancer., 1992, 70, 1951-5.
- **Lønning PE, Kvinnsland S.:** Mechanisms of action of aminoglutethimide as endocrine therapy of breast cancer.
Drugs., 1988, 35, 685-710.
- **Lønning PE.:** Aromatase inhibition for breast cancer treatment.
Acta oncologia., 1996, 35, 38-43.
- **Mac Diermid F, Wang D, Duncan LJ, Purohit A, Ghilchick MW, Reed MJ.:**
Stimulation of aromatase activity in breast fibroblasts by tumor necrosis factor alpha.
Mol. Cell. Endocrinol., 1994, 106, 17-21.
- **Mauvais Jarvis P, Sitruk-Ware R, Labrie F.:** Médecine de la reproduction , gynécologie endocrinienne.
Flammarion, Médecines/ Sciences, Presses de l'Université de Montréal., 1983, 89-101.
- **Means GD, Mahendroo MS, Corbin J, Mathris JM, Powell FE, Mendelson CR, Simpson ER.:** Structural analysis of the gene encoding human aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis.
J. Biol. Chem., 1989, 264, 19385-91.
- **Mendelson CR, Cleland WH, Smith ME, Simpson ER.:** Regulation of aromatase activity of stromal cells derived from human adipose tissue.
Endocrinology, 1982, 111, 1077-1085.

- **Miller WR.:** Aromatase activity in breast tissue.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1991, 39, 783-790.
- **Nabholtz JM, Bonneterre J, Buzdar AU, Thuerlimann BJK, Robertson JFR, Webster A, Steinberg M.:** Preliminary results of two multicenter trials comparing the efficacy and tolerability of Arimidex® (anastrozole) and tamoxifen (TAM) in postmenopausal (PM) women with advanced breast cancer (BC).
Breast. Cancer. Res. Treat., 1997, 57, 31 (abstr. 27).
- **Naftolin F, Ryan KJ, Davis IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M.:** The formation of estrogen by central neuroendocrine tissues.
Recent. Prog. Horm. Res., 1975, 31, 295-319.
- **Namer M, Ramaioli A.:** Les nouveaux inhibiteurs de l'aromatase dans le traitement du cancer du sein métastatique.
Méd. Et Hyg., 1998, 56, 1527-31.
- **Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ et al.:** The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature.
DNA. Cell. Bio., 1993, 12, 1-51.
- **Numazawa M, Tachinabe M.:** Aromatase inactivation by a Suicide Substrat, Androst-5-ene-4,7,17-trione: The 5 β , 6 β -Epoxy-19-oxo Derivative, as a Possible Reactive Electrophile Irreversible Binding to the Active Site.
Biol. Pharm. Bull., 1997, 20, 490-5.
- **Numazawa M, Yamaguchi S.:** 6-Phenylaliphatic-substitued Androst-4-ene-3,17-dione as Aromatase inhibitors: Structure-activity Relationships.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1998, 67, 41-8.

- **Oh SS, Robinson CH.:** Mechanism of human placental aromatase: A new active site model.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1993, 44, 389-97.
- **Ortiz de Montellano PR.:** Cytochrome P450: Structure, mechanism and biochemistry.
New-York : *Plenum*, 1986- 552.
- **Osawa Y, Higashiyama T, Shimizu Y, Yarborough C.:** Multiple fonctions of aromatase and the active site structure ; aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1993, 44, 469-480.
- **Osawa Y, Higashiyama T, Toma Y and Yarborough C.:** Diverse fonction of aromatase and N-terminal sequence deleted form.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1997, 61, 117-126.
- **Pasqualini JR.:** Breast cancer, present and future.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1994, 51, 5-6.
- **Payne AH.:** Intratesticulaire site of aromatase activity and possible function of testicular aromatase.
Steroids., 1987, 50, 435-48.
- **Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ.:** High resolution crystal structure of cytochrome P450cam.
J. Mol. Biol., 1987, 195, 687-700.
- **Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasemann CA, Peterson JA, Deisenhofer J.:** Atomic structure of the hemoprotein domain of cytochrome P450BM3: a prototype for eukaryotic microsomal P450s.
Science, 1993, 261, 731-6.

- **Reddy P.:** A review of the newer aromatase inhibitors in the management of metastatic breast cancer.
Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 1998, 23, 81-90.

- **Reed MJ, Lai LC, Owen AM, Coldham NG, James VHT, Purohit A, Ghilchik MW.:** The effects of treatment with 4-hydroxyandrostenedione on the peripheral conversion of androstenedione to oestrone and *in vitro* tumor aromatase activity in postmenopausal women with breast cancer.
Cancer. Res., 1990, 50, 193-6.

- **Reed MJ, Topping L, Coldham NG, Purohit A, Ghilchik MW, James VHT.:** Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1993, 44, 589-596.

- **Romieu L, Willett WC, Colditz GA.:** Prospective study of estrogen replacement therapy and risk of breast cancer in postmenopausal women.
J. Natl. Cancer. Inst., 1989, 81, 1313-21.

- **Ryde CM, Nicholls JE, Dowsett M.:** Steroid and growth factor modulation of aromatase activity in MCF7 and T47D breast carcinoma cell lines.
Cancer Res., 1992, 52, 1411-1415.

- **Sasano H, Ozaki M.:** Aromatase expression and its localization in human breast cancer.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1997, 61, 293-8.

- **Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, Harada N.:** Aromatase in human bone tissue.
J. Bone Miner. Res., 1997, 12, 1416-1423.

- **Sasano H, Sato H, Ito K, Yajima A, Nakamura J, Yoshihama M, Ariga K, Anderson TJ, Miller WR.:** Effects of aromatase inhibitors on the pathobiologie of the human breast, endometrial and ovarian carcinoma.
Endocr. Relat. Cancer., 1999, 6, 197-204.

- **Sciarra F, Toscano V.:** Role of estrogens in human benign prostatic hyperplasia.
Arch. Androl., 2000, 44, 213-20.
- **Simpson ER, Merrill JC, Hollub AJ, Graham-Lorence S, Mendelson CR.:** Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells.
Endocrine Rev., 1989, 10, 136-48.
- **Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Corbin CJ, Mendelson C.:** Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1993, 44, 321-330.
- **Simpson ER, Bulun SE, Nichols JE, Zhao Z.:** Estrogen biosynthesis in adipose tissue: regulation by paracrine and autocrine mechanisms.
J. Endocrinol., 1996, 150, 51s-57s.
- **Sondik EJ.:** Breast cancer trends: incidence, mortality and survival.
Cancer., 1994, 74, 995-9.
- **Tchoudakova A, Callard GV.:** Identification of multiple CYP 19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary.
Endocrinology., 1998, 139, 2179-89.
- **Thijssen JHH, Daroszewski J, Milewicz A, Blankenstein MA.:** Local aromatase activity in human breast tissues.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1993, 44, 577-82.
- **Thompson EA and Siiteri PK.:** The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 5373-5378.

- **Thurliman B, Paridaens R, Serin D, Roche H, Murray R, Di Salle E.:** Third hormonal treatment with exemestane post menopausal patients with advanced breast cancer progressing on aminoglutéthimide: phase two multicenter multinational study.
Eur. J. Cancer., 1997, 33, 1767-73.
- **Toda K, Terashima M, Kawamoto M, Sumimoto H, Yokoyama Y, Kuribayashi I, Mitsuuchi Y, Maeda T, Yamamoto Y, Sagara Y, Ikeda H, Shizuta Y.:** Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene.
Eur. J. Biochem., 1990, 193, 559-565.
- **Toda K, Sasaki H, Nakamura J, Yoshihama M, Terashima Y.:** Aromatase activity and the effect of estradiol and testosterone on DNA synthesis in endometrial carcinoma cell lines.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1993, 44, 661-666.
- **Toda K, Nomoto S, Shizuta Y.:** Identification and characterization of transcriptional regulatory elements of the human aromatase cytochrome P450 gene (CYP19).
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1996, 56, 151-9.
- **Tretli S.:** Height and weight in relation to morbidity and mortality : a prospective study in 570000 women in Norway.
Int. J. Cancer., 1989, 44, 23-30.
- **Tudor I, Garcia O, Garcia AE.:** Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of steroid aromatase inhibitors.
J. Comput. Aided. Mol. Des., 1996, 10, 186-200.
- **Wiseman LR, Mc Tavish D.:** Formestane. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the management of breast cancer and prostatic cancer.
Drugs., 1993, 45, 66-84.

- **Zhao Y, Nichols JE, Bulun SE, Mendelson CR, Simpson ER.:** Aromatase P450 gene expression in human adipose tissue . Role of a Jak/STAT pathway in regulation of the adipose -specific promoter.
J. Biol. Chem., 1995, 270, 16449-16457.
- **Zhou C, Zhou D, Esteban J, Siterii PK, Wilczynski S, Chen S.:** Aromatase gene expression and its exon I usage in human breast tumors. Detection of aromatase messenger RNA by reverse transcription -polymerase chain reaction.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 1996, 59, 163-71.

ANNEXES.



Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids

J.C. Le Bail, T. Laroche, F. Marre-Fournier, G. Habrioux*

UPRES EA 1085, Biomolécules et cibles cellulaires tumorales – Prolifération cellulaire et inhibition enzymatique, Laboratoire de Biochimie, Faculté de Pharmacie, 2 Rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, Cedex, France.

Received 20 April 1998; accepted 1 July 1998

Abstract

A method for estimating in the same assay both aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities in human placental microsomes using radiolabelled [1,2,6,7-³H]4-androstene-3,17-dione was proposed. In this assay, estrone (E₁) and estradiol (E₂) produced were separated by HPLC and estimated using a radioactive flow detector. Using this method, the inhibitory effect of various flavonoids, including flavone, flavanone and isoflavone, on the human placental aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase was studied. Flavonoids were shown to be potent inhibitors of both aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. We found that 7-hydroxyflavone and apigenin are the most effective aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors, respectively. Experiments showed that a hydroxyl group in position 7 was essential for anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. However, flavonoids with 7-methoxy or 8-hydroxyl groups on the A ring showed only anti-aromatase activity. Structure–activity relationships were discussed. © 1998 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Flavonoids; Aromatase; 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase

1. Introduction

Flavonoids are natural components which are present in many plants known to be constituents of animal and human food. These compounds have been shown to have different biological properties, such as anti-viral, anti-inflammatory, anti-mutagenic and anti-carcinogenic activities [2,3,6,14,17]. Flavonoids, which are structurally similar to estrogens, are able to bind to the estrogen receptor and possess estrogenic or anti-estrogenic activities [3,12,14]. Other studies have shown that some flavones, isoflavones and flavanones alter hormone production and inhibit aromatase activ-

ity in human and ovarian microsomes [1,5,7]. Aromatase, a cytochrome P450 (CYP19), converts C19 androgens such as androstenedione or testosterone to aromatic C18 estrogenic steroids, estrone and estradiol, respectively, through three consecutive hydroxylation reactions [4,9,15]. These estrogens have an important effect on the development of breast cancer cells. Studies have shown that flavonoids such as genistein were found to reduce the conversion of estrone to estradiol catalyzed by estrogen-specific 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity [11] and could play a protective role in human breast cancer. The classical aromatase activity assay measures the rate of ³H incorporation into water from [1 β ,2 β -³H]-4-androstene-3,17-dione (Δ_4) or [1 β ,2 β -³H]-testosterone as described by Thompson and Siiteri [16]. It

* Corresponding author. Fax: +33-5-55435839; e-mail: habrioux@unilim.fr.

has been shown that the tritiated water assay weakly underestimates activity and does not definitively identify the estrogens produced. We propose an assay for estimating both aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities in human placental microsomes using radiolabelled [1,2,6,7-³H] Δ_4 . In this assay we measure radiolabelled estrone (E₁) and estradiol (E₂) produced after separation by HPLC with detection of the radioactivity. Using this methodology we can determine both anti-aromatase and anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase properties of various flavonoids, i.e. apigenin, chrysin, 7,8-dihydroxyflavone, genistein, 7-hydroxyflavone, 7-methoxyflavone, 7-methoxyflavanone and naringenin.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

17 β -Estradiol (E₂), estrone (E₁), 4-androstene-3,17-dione (Δ_4), aminoglutethimide (AG), 7-hydroxyflavone, 5,7-dihydroxyflavone (chrysin), 4',5,7-trihydroxyflavone (apigenin), 4',5,7-trihydroxyflavanone (naringenin), 4',5,7-trihydroxyisoflavone (genistein), 7-hydroxyflavone, 7-methoxyflavone, 7-methoxyflavanone, 7,8-dihydroxyflavone, coumestrol, NADP, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase and dithiothreitol (DTT) were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). [2,4,6,7-³H]estradiol (102 Ci/mmol), [2,4,6,7-³H]estrone (95 Ci/mmol) and [1,2,6,7-³H]4-androstene-3,17-dione (87 Ci/mmol) were obtained from NEN products (France).

2.2. Preparation of human placental microsomes

Microsomes were obtained from human placenta after normal full-term delivery, prepared as previously described [13] and stored at -80°C until they were used.

2.3. Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase assays

All enzymatic studies were performed in 0.1 M phosphate buffer (0.1 M KH₂PO₄ and 1 mM DTT (pH 7.4)). The final incubation volume was 1 ml. The incubation mixture contained 3 mM glucose-6-

phosphate, 0.5 mM NADP, 0.1 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase, 40 nM [1,2,6,7-³H] Δ_4 and 0.05 mg microsomal protein in the presence or absence of inhibitor diluted in ethanol. The percentage of ethanol was always less than 0.5%. Incubations were carried out for 7 min at 37°C in air and were stopped by the addition of 500 μ l of methanol/HCl 1 M (50/50, v/v) followed by vortexing for 60 s. Control samples without inhibitor and blank samples without microsomes were run simultaneously. After centrifugation at 1500 \times g for 10 min, the steroids were extracted twice from the incubation mixture with 2.5 vol. ethyl acetate/cyclohexane (50/50, v/v). The organic phase was dried under N₂ flow and the residue was dissolved in ethanol. This ethanol solution was dried under N₂ flow and the residue was dissolved in HPLC phase. In parallel, an aliquot of aqueous phase (200 μ l) was removed and added to scintillation mixture (4 ml) for determination of ³H₂O production as a control.

2.4. HPLC identification and quantification of metabolites

Steroids were dissolved in 50 μ l HPLC phase (isooctane/ethyl acetate, 64/36, v/v). HPLC was used to analyze 20 μ l. Separations were performed on a 250 \times 4.6 mm, 5 μ m silica column (SPHERISORB). Elution was carried out at 1 ml/min with the HPLC phase. The effluent was monitored with radioactive flow detector (Flow One beta, Packard). The produced steroids were identified by comparison with authentic unradiolabelled reference standards.

2.5. Percentage of inhibition measurement

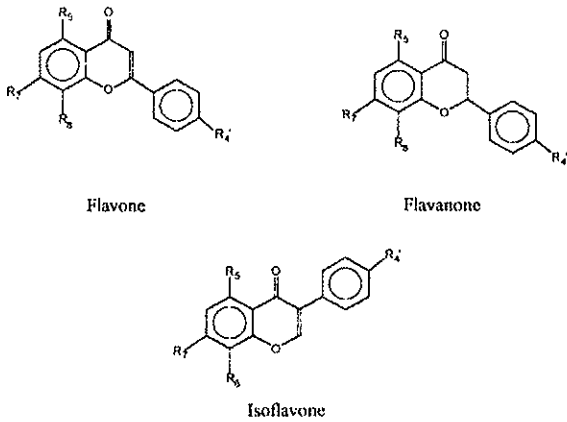
2.5.1. Anti-aromatase activity

Aromatase inhibition was calculated from the unchanged radiolabelled Δ_4 . The aromatase inhibition percentage corresponded to the percentage of unchanged radiolabelled Δ_4 .

2.5.2. Anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity

17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase inhibition was calculated from the produced radiolabelled estrogens, i.e. % inhibition = 100 - ((E₂/E_{1sample})/(E₂/E_{1control})) \times 100).

Table 1
Structures of the flavonoids used in this study



Compound	R ₁	R ₅	R ₇	R ₈
<i>Flavone</i>				
Flavone	H	H	H	H
7-Hydroxyflavone	H	H	OH	H
Apigenin	OH	OH	OH	H
Chrysin	H	OH	OH	H
7-Methoxyflavone	H	H	OCH ₃	H
7,8-Dihydroxyflavone	H	H	OH	OH
<i>Flavanone</i>				
Naringenin	OH	OH	OH	H
7-Methoxyflavanone	H	H	OCH ₃	H
<i>Isoflavone</i>				
Genistein	OH	OH	OH	H

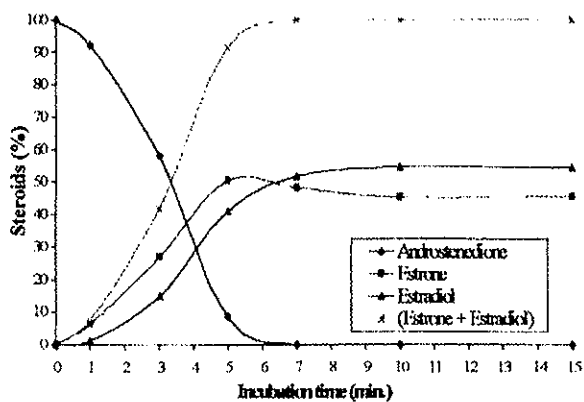
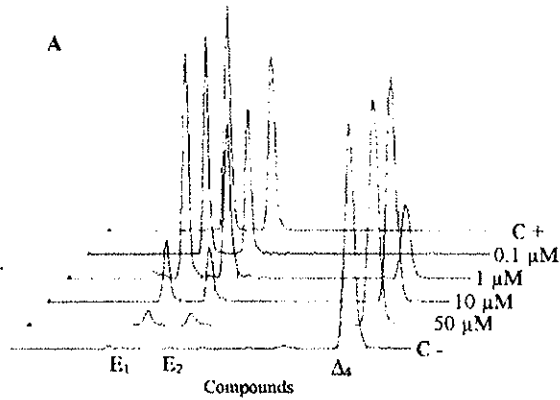
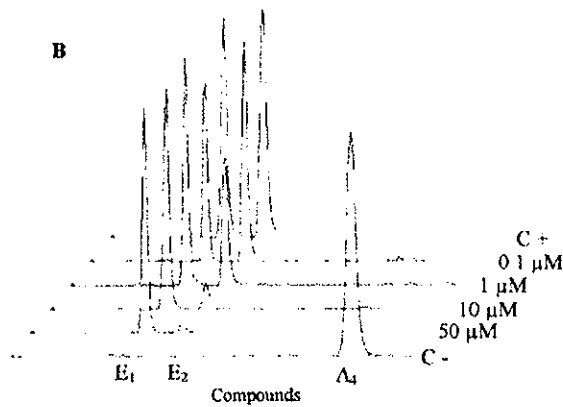


Fig. 1. Δ_4 metabolism by human placental microsomes. Kinetics of Δ_4 disappearance and estrogen formation.

Anti-aromatase activity by 7-methoxyflavone



Anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity by genistein



Anti-aromatase and anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities by apigenin

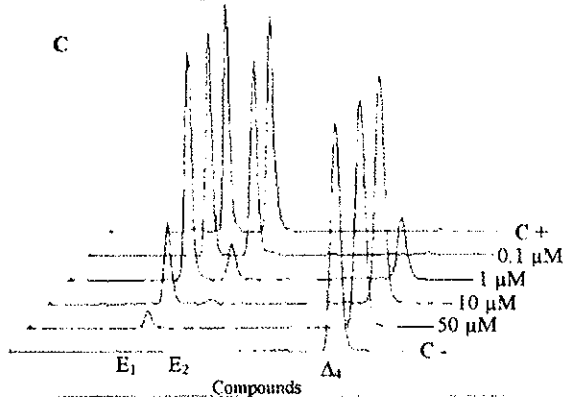


Fig. 2. Extended scale of radioactive profiles of human placental microsomes incubated with 40 nM [1,2,6,7-³H] Δ_4 in the presence of 7-methoxyflavone (A), genistein (B) and apigenin (C) at different concentrations. The metabolites identified were estrone (E₁), estradiol (E₂) and 4-androstene-3,17-dione (Δ_4). C-, blank sample; C+, control sample without inhibitor.

2.5.3. IC_{50} values

IC_{50} values were obtained by graphical determination.

3. Results and discussion

In the present study several flavonoids (Table 1) were tested for their ability to inhibit the human placental aromatase and/or 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. We used aminoglutethimide, which is an inhibitor of aromatase [8], and coumestrol, which is a remarkably good competitive inhibitor of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase [10], as controls. Firstly, we investigated the kinetics of Δ_4 disappearance and estrogens formation in human placental microsomes. In our conditions we noted that Δ_4 disappearance was completely effective only after 7 min (Fig. 1) and the percentage of estrone and estradiol formation was similar and stable up to 2 h (data not shown). We found that some flavonoids used in this study possessed anti-aromatase or anti- 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity or both, such as 7-methoxyflavone, genistein and apigenin, respectively (Fig. 2). Then we determined the dose-dependent inhibition of aromatase and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase by various flavonoids (Table 2). We found that 7-hydroxyflavone and apigenin were the

most effective aromatase and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors, respectively. In contrast, only four flavonoids (apigenin, chrysin, genistein and naringenin) exhibited anti- 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. This methodology allowed us to establish a structure-activity relationship among these flavonoids. Structural comparison between the tested flavonoids showed that a phenolic hydroxyl group in position 7 is essential for anti-aromatase activity. This result is comparable to the results previously described [5]. The methoxy in position 7 on the A ring is also responsible for the anti-aromatase activity. However, flavonoids with the 7-methoxy group on the A ring were less potent against the aromatase activity than the flavonoids with a hydroxyl group in position 7 (i.e. 7-hydroxyflavone \rightarrow 7-methoxyflavone). Besides, anti-aromatase activity decreased when spatial conformation in position 7 was altered by the addition of the 8-position hydroxyl group (i.e. 7-hydroxyflavone \rightarrow 7,8-dihydroxyflavone). In the same order anti-aromatase activity decreased in the presence of 5- and/or 4'-hydroxyl groups (i.e. 7-hydroxyflavone \rightarrow chrysin \rightarrow apigenin). In the same pattern of hydroxylation (4',5,7-hydroxyl substituents), apigenin presented higher aromatase inhibitory activity than naringenin and genistein. These results suggested that flavones have higher anti-aromatase activity than flavanones and isofla-

Table 2
Inhibition of human placental aromatase and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase by various flavonoids^a

Inhibitor	Aromatase/ 17β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition (% of inhibition) at concentration (μ M)						
	0.01	0.1	1	10	25	50	IC_{50}
Aminoglutethimide ^b	2.8/* ^c	34.2/*	48.9/*	70.8/*	ND ^d	77.5/*	1.2/*
Coumestrol ^b	*/*	*/30.5	5.6/82.3	42.1/87.2	49.6/94.8	50.6/97.9	35.0/0.2
Flavone	*/*	*/*	*/*	*/*	27.6/*	50.8/*	48.0/*
7-Hydroxyflavone	3.6/0.1	42.4/36.9	67.8/50.2	78.6/67.6	92.7/80.8	93.5/81.3	0.21/0.9
Apigenin	0.1/0.1	0.7/14.3	23.7/84.5	78.3/95.1	90.0/97.5	95.7/100	2.9/0.3
Chrysin	4.4/0.2	43.5/9.0	50.6/22.4	84.1/70.8	85.4/75.9	86.4/80.0	0.7/3.6
Genistein	*/0	*/0.2	*/50.2	*/89.8	*/95.8	*/97.6	*/1.0
Naringenin	0/0	0.5/0.1	4.2/4.9	51.3/38.2	82.0/65.2	90.9/76.5	9.2/15.0
7-Methoxyflavone	0.1/*	0.5/*	21.2/*	73.2/*	78.3/*	88.8/*	3.2/*
7-Methoxyflavanone	0/*	0.2/*	0.4/*	43.0/*	47.0/*	80.3/*	2.6/*
7,8-Dihydroxyflavanone	0/*	0.1/*	0.5/*	50.5/*	77.4/*	82.9/*	8.0/*

^a Values reported represent the average of duplicate determinations in two separate experiments.

^b Used as control.

^c An asterisk indicates that no inhibition was detectable.

^d ND, not determined.

ones. This can be explained by the spatial conformation study of these compounds. Apigenin and naringenin exhibited similar spatial conformations, which were very different from those of genistein.

In the same order a hydroxyl group in position 7 is essential for anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. This result was supported by the evidence that when its spatial conformation was altered by the addition of an 8-hydroxyl group or if this substituent was methylated the anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity disappeared. In contrast 4' hydroxylation did not seem to play an important role in this enzymatic activity.

Thus, it seems likely that the hydroxyl group in position 7 is essential to increase anti-aromatase and anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. Inhibition of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase enzymes could lead to a decrease in the availability of the highly active endogenous estrogen. However, these compounds can possess estrogenic activity and they may thus replace endogenous estrogens. However, in our laboratory we have shown that several flavonoids at high concentrations presented anti-estrogenic and anti-proliferative activities (unpublished data). It is possible that the best anti-human breast cancer compound could be an E₂-intracellular-production inhibitor (anti-aromatase and/or anti-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase) or another intracellular pathways inhibitor and possess anti-estrogenic and anti-proliferative activities. From these results, we can conceive a molecular structure which will exhibit all these properties.

In conclusion, these studies show that by using this methodology we can quickly show the inhibition of two enzymatic activities in the same assay and provide evidence of the potential biological interest of flavonoids or derived compounds in the treatment of human breast cancer.

Acknowledgements

J.C.L.B. receives a grant from the Conseil Régional du Limousin. The expenses of this work were defrayed in part by the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie and by the Conseil Régional du Limousin (France).

References

- [1] H. Adlercreutz, C. Bannwart, K. Wähälä, T. Mäkelä, G. Brunow, T. Hase, P.J. Arosemena, J.T. Kellis, L.E. Vickery, Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44 (1993) 147–153.
- [2] J.M. Cassady, T.M. Zennie, Y.H. Chae, M.A. Ferrin, N.E. Portundo, W.M. Baird, Use of a mammalian cell culture benzo(a)pyrene metabolism assay for the detection of potential anticarcinogens from natural products: inhibition of metabolism by biochanin A, an isoflavone from *Trifolium pratense* L., *Cancer Res.* 48 (1988) 6257–6261.
- [3] B.M. Collins, J.A. McLachlan, S.F. Arnold, The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast, *Steroids* 62 (1997) 365–372.
- [4] M. Dowsett, V. Macaulay, J. Oledhill, C. Ryde, J. Nicholls, A. Asworth, M.C. Kinna, I.E. Smith, Control of aromatase in breast cancer cells and its importance for tumor growth, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44 (1993) 605–609.
- [5] A.R. Ibrahim, Y. Abul-Hajj, Aromatase inhibition by flavonoids, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37 (1990) 257–260.
- [6] M. Ito, S. Ishimoto, Y. Nishida, T. Shiramizu, H. Yumoki, Effects of baicalein, a flavonoid and other anti-inflammatory agents on glyoxalase-I activity, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 1073–1074.
- [7] J.T. Kellis, L.E. Vickery, Inhibition of human estrogen synthetase (aromatase) by flavones, *Science* 225 (1984) 1032–1034.
- [8] J.O. Kitawaki, T. Kim, T. Kanno, T. Noguchi, T. Yamamoto, H. Okada, Growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells by aromatase inhibitors: a new system for aromatase inhibitor screening, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44 (1993) 667–690.
- [9] J.H. MacIndoe, L.A. Etre, Androgens inhibit estrogen action in MCF-7 human breast cancer cells, *Life Sci.* 27 (1980) 1643–1648.
- [10] S. Mäkelä, V.L. Davis, W.C. Tally, J. Korkman, L. Salo, R. Vihko, R. Santti, K.S. Korach, Dietary estrogens act through estrogen receptor-mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells, *Environ. Health Perspect.* 102 (1994) 572–578.
- [11] S. Mäkelä, M. Poutanen, J. Lehtimäki, M.L. Kostian, Estrogen-specific 17(-hydroxysteroid oxidoreductase type I as a possible target for the action of phytoestrogens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208 (1995) 51–59.
- [12] L. Markiewicz, J. Garey, H. Adlercreutz, E. Gurbide, In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 45 (1993) 399–405.
- [13] F. Marre, G.J. Sanderink, G. De Sousa, C. Gaillard, M. Martinet, R. Rahmani, Hepatic biotransformation of Docetaxel (Taxotere) in vitro: involvement of CYP3A subfamily in humans, *Cancer Res.* 53 (1996) 1296–1302.
- [14] P.M. Martin, K.B. Horowitz, D.S. Ryan, W.L. McGuire, Phytoestrogen interaction with estrogen receptor in human breast cancer cells, *Endocrinology* 103 (1978) 1860–1867.

- [15] E. Perel, D. Daniilescu, L. Kharpil, M. Blaschstein, D.W. Killinger, Steroid modulation of aromatase activity in human cultured breast carcinoma cells, *J. Steroid Biochem.* 29 (1988) 393-399.
- [16] E.A. Thompson, P.K. Siiteri, The involvement of human placental microsomal cytochrome P-450 in aromatization, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 5373-5378.
- [17] R. Vrijssen, L. Everaert, A. Boeye, Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate, *J. Gen. Virol.* 69 (1988) 1749-1751.

REPERTOIRE DES TABLEAUX

TABLEAU III.I: AFFINITÉ RELATIVE DE DIFFÉRENTS INHIBITEURS POUR L'AROMATASE (D'APRÈS FEUTRIE ET AL.,1999).	46
TABLEAU III.II: INHIBITION IN VITRO DE L'AROMATASE PAR DIFFÉRENTES MOLÉCULES (D'APRÈS FEUTRIE ET AL.,1999).	46
TABLEAU IV.I: TAUX DE RÉPONSE OBJECTIVE (RO) OBTENUS SUIVANT LES LOCALISATIONS MÉTASTASIQUES À LA SUITE D'UN TRAITEMENT PAR DU FORMESTANE (D'APRÈS WISEMAN ET AL.1993).	73
TABLEAU IV.II: EFFICACITÉ DE L'EXEMESTANE EN 2° ET 3° LIGNE THÉRAPEUTIQUE (D'APRÈS NAMER ET.AL. 1998).	78
TABLEAU IV.III: COMPARAISON DES RÉPONSES AU LÉTROZOLE ET À L'ACÉTATE DE MÉGESTROL (D'APRÈS NAMER ET.AL. 1998).	85
TABLEAU IV.IV: RÉDUCTION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES MOYENNES D'ESTROGÈNES APRÈS TRAITEMENT PAR ANASTROZOLE PENDANT 28 JOURS (D'APRÈS GEISLER ET. AL. 1996).	90
TABLEAU IV.V: COMPARAISON ENTRE LES RÉSULTATS OBTENUS LORS D'UN TRAITEMENT EN PREMIÈRE LIGNE PAR ARIMIDEX® 1 MG ET LORS UN TRAITEMENT PAR DU TAMOXIFÈNE 20 MG (D'APRÈS NABHOLTZ ET. AL. 1999).	92
TABLEAU IV.VI: COMPARAISON DES SURVIES À 31 MOIS POUR DES TRAITEMENTS PAR L'ANASTROZOLE 1 MG, 10 MG ET POUR L'ACÉTATE DE MÉGESTROL (D'APRÈS JONAT ET. AL. 1996).	93
TABLEAU IV.VII : INCIDENCE DES ÉVÉNEMENTS INDÉSIRABLES GRAVES LIÉS AU TRAITEMENT PAR L'ANASTROZOLE (D'APRÈS BUZDAR ET. AL., 1998).	96

TABLE DES FIGURES.

FIGURE 1.1: STRUCTURES SUPERPOSÉES AUTOUR DE LA RÉGION DE L'HÈME DE DIFFÉRENTS P450 (D'APRÈS GRAHAM-LORENCE <i>ET AL.</i> 1995).	11
FIGURE 1.2: ALIGNEMENT DES SÉQUENCES PROTÉIQUES DE L'AROMATASE HUMAINE, DE RAT, DE LA SOURIS, DES BOVINS ET DU POULET.	12
FIGURE 1.3: MODÈLE STRUCTURAL DE P450AROM, VUE DU COTÉ DISTAL PAR RAPPORT À LA RÉGION DE L'HÈME (D'APRÈS GRAHAM-LORENCE <i>ET AL.</i> 1995).	13
FIGURE 1.4: MODÈLE DU SITE ACTIF DE L'AROMATASE, AVEC L'HÈME REPRÉSENTÉ EN ROUGE ET L'ANDROSTÈNEDIONE COMME SUBSTITUANT EN VERT (D'APRÈS GRAHAM-LORENCE <i>ET AL.</i> 1995).	14
FIGURE 1.5: ALIGNEMENT DE GÈNES DE DIFFÉRENTS CYTOCHROMES P-450 AVEC CELUI DE L'AROMATASE (D'APRÈS SIMPSON <i>ET AL.</i> 1993).	17
FIGURE 1.6: CONVERSION DES ANDROGÈNES EN ESTROGÈNES PAR L'AROMATASE (D'APRÈS OH.S. S. <i>ET AL.</i> 1993).	19
FIGURE 1.7 : ÉTAPES DE L'AROMATISATION DES ANDROGÈNES EN ŒSTROGÈNES DANS LE PLACENTA HUMAIN.	22
FIGURE 1.8: PREMIÈRE ET DEUXIÈME ÉTAPES OXYDATIVES DU MÉCANISME D'ACTION DE L'AROMATASE (D'APRÈS OH.S. S. <i>ET AL.</i> 1993).	24
FIGURE 1.9: TROISIÈME ÉTAPE DU MÉCANISME D'ACTION DE L'AROMATASE (D'APRÈS OH.S. S. <i>ET AL.</i> 1993).	25
FIGURE 1.10 : PRINCIPE D'ÉTUDE DES DIFFÉRENTES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES ET SON SYSTÈME RÉGÉNÉRATEUR DE NADPH.	27
FIGURE 1.11: RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE L'AROMATASE AU NIVEAU DES OVAIRES.	30
FIGURE 3.1: INHIBITEURS STÉROÏDIENS DE L'AROMATASE DÉRIVANT DE LA STRUCTURE DE L'ANDROSTÈNEDIONE.	49
FIGURE 3.2: INHIBITEURS NON STÉROÏDIENS UTILISÉS DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DU SEIN HORMONO DÉPENDANT.	51
FIGURE 3.3 : COMPARAISON DE LA STRUCTURE CHIMIQUE DE DIFFÉRENTS PHYTOESTROGÈNES AVEC L'ESTRADIOL.	52
FIGURE 4.1: L'AMINOGLUTÉTHIMIDE.	58
FIGURE 4.2: LE ROGLÉTIMIDE.	59
FIGURE 4.3: NIVEAUX D'ACTION DE L'AMINOGLUTÉTHIMIDE SUR LA BIOSYNTÈSE DES STÉROÏDES.	61
FIGURE 4.3: LE FORMESTANE.	70
FIGURE 4.4: L'EXÉMESTANE.	76
FIGURE 4.5: LE FADROZOLE.	81
FIGURE 4.6: MOLÉCULE DE LÉTROZOLE.	83
FIGURE 4.7: L'ANASTROZOLE.	89
FIGURE 4.8: LE VOROZOLE.	97

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE I: L'AROMATASE.....	9
A. NATURE DE L'AROMATASE.....	10
B. DISTRIBUTION ET LOCALISATION DE L'AROMATASE.....	15
C. LES GÈNES DE L'AROMATASE.....	17
D. MÉCANISME DE L'AROMATASE.....	19
E. RÔLES DE L'AROMATASE.....	26
1. <i>Rôle principal de l'aromatase</i>	26
2. <i>Autres activités catalytiques de l'aromatase</i>	26
3. <i>Substrats de l'aromatase</i>	27
F. MÉTHODES D'ÉTUDES DE L'ACTIVITÉ DE L'AROMATASE.....	27
G. RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ DE L'AROMATASE.....	28
1. <i>Stéroïdes</i>	28
2. <i>AMPc</i>	29
3. <i>Cytokines</i>	29
4. <i>FSH</i>	30
CHAPITRE II: LES IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES DE L'AROMATASE.	31
A. LE CANCER DU SEIN.....	33
1. <i>Epidémiologie</i>	33
2. <i>Facteurs de risque</i>	34
2.1. <i>Facteurs de risques liés aux mastopathies bénignes</i>	34
2.2. <i>Facteurs génétiques</i>	34
2.3. <i>Facteurs nutritionnels</i>	35
2.4. <i>Radiations ionisantes</i>	35
2.5. <i>Facteurs environnementaux</i>	36
2.6. <i>Facteurs hormonaux</i>	36
2.6.1. <i>Facteurs exogènes</i>	36
2.6.2. <i>Facteurs endogènes</i>	37
2.6.2.1. <i>Hyperestrogénie relative et insuffisance lutéale</i>	37
2.6.2.2. <i>Grossesse</i>	37
2.6.2.3. <i>Allaitement</i>	38
2.6.2.4. <i>Influence des estrogènes</i>	38
2.6.2.5. <i>La ménopause</i>	38
B. AUTRES PATHOLOGIES.....	40
1. <i>L'endométriose</i>	40
2. <i>Les pubertés précoces</i>	41
3. <i>Les gynécomasties</i>	42
4. <i>Hyperplasie bénigne de la prostate</i>	42

CHAPITRE III: LES INHIBITEURS DE L'AROMATASE.....	44
A. MÉTHODES D'ÉTUDE DES INHIBITEURS DE L'AROMATASE.....	45
B. CLASSIFICATIONS.....	47
1. <i>Structure chimique</i>	47
1.1. Les inhibiteurs stéroïdiens	47
1.2. Les inhibiteurs non stéroïdiens.....	50
1.2.1. Synthétiques	50
1.2.2. Naturels	51
2. <i>Mécanisme d'action</i>	53
3. <i>Réactivité aux ultraviolets</i>	53
C. ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES INHIBITEURS DE L'AROMATASE.....	54
CHAPITRE IV: ASPECTS CLINIQUES DES INHIBITEURS DE L'AROMATASE..	57
A. L'AMINOGLUTÉTHIMIDE.....	58
1. <i>Activités biochimiques de l'aminoglutéthimide</i>	60
1.1. Au niveau des glandes surrénales.....	60
1.2. Au niveau des complexes aromatasiques périphériques.....	61
1.3. Au niveau des autres glandes endocrines.....	62
1.3.1. Effets sur les ovaires.....	62
1.3.2. Effets sur la thyroïde.....	63
2. <i>Autres activités biochimiques</i>	63
2.1. Effets sur le foie.....	63
2.2. Effets sur les prostaglandines.....	63
3. <i>Possibles mécanismes d'action</i>	64
3.1. Une adrénalectomie médicale.....	64
3.2. Une inhibition de l'aromatase.....	64
3.3. Altérations du métabolisme des estrogènes.....	65
4. <i>Propriétés pharmacocinétiques</i>	65
4.1. Absorption.....	65
4.2. Distribution.....	65
4.3. Métabolisme et élimination.....	65
4.4. Données pharmacocinétiques.....	66
5. <i>Usage thérapeutique</i>	66
5.1. Indications.....	66
5.1.1. Les cancers du sein hormono dépendants.....	66
5.1.2. Les hypercorticismes.....	67
5.2. Administration.....	67
5.3. Effets secondaires.....	67
5.4. Surveillance médicale.....	68
5.5. Interactions médicamenteuses.....	69
B. LES INHIBITEURS STÉROÏDIENS OU INHIBITEURS DE TYPE I.....	70
1. <i>Le Formestane</i>	70
1.1. Activités biochimiques du formestane.....	71
1.1.1. Activité anti aromatase.....	71
1.1.2. Autres activités endocrines.....	72
1.2. Activité anti tumorale.....	72
1.3. Propriétés pharmacocinétiques.....	73
1.3.1. Absorption et distribution.....	73
1.3.2. Métabolisme et élimination.....	74
1.4. Usages thérapeutiques.....	75

1.4.1. Indications.....	75
1.4.2. Administration.....	75
1.4.3. Effets secondaires.....	75
2. <i>L'exemestane</i>	76
2.1. Activités biochimiques de l'exemestane.....	77
2.2. Activités anti tumorales.....	77
2.3. Propriétés pharmacocinétiques.....	78
2.3.1. Absorption et distribution.....	78
2.3.2. Métabolisme et élimination.....	79
2.4. Usages thérapeutiques.....	79
2.4.1. Indications.....	79
2.4.2. Administration.....	80
2.4.3. Effets secondaires.....	80
C. LES INHIBITEURS NON STÉROÏDIENS OU INHIBITEURS DE TYPE II.....	81
1. <i>Le fadrozole</i>	81
2. <i>Le létrozole</i>	83
2.1. Activité biochimiques du létrozole.....	83
2.1.1. Activité anti aromatasase.....	83
2.1.2. Autres activités endocrines.....	84
2.2. Activité anti tumorale.....	85
2.3. Propriétés pharmacocinétiques.....	86
2.3.1. Absorption et distribution.....	86
2.3.2. Métabolisme et élimination.....	86
2.4. Usage thérapeutique.....	87
2.4.1. Indications.....	87
2.4.2. Administration.....	88
2.4.3. Effets secondaires.....	88
3. <i>L'anastrozole</i>	89
3.1. Activités biochimiques de l'anastrozole.....	89
3.1.1. Activités anti aromatasase.....	89
3.1.2. Autres activités endocriniennes.....	90
3.2. Activités anti tumorale.....	91
3.2.1. Efficacité en première ligne de traitement.....	91
3.2.2. Efficacité en deuxième ligne de traitement.....	92
3.3. Propriétés pharmacocinétiques.....	93
3.3.1. Absorption et distribution.....	93
3.3.2. Métabolisme et élimination.....	94
3.4. Usage thérapeutique.....	94
3.4.1. Indications.....	94
3.4.2. Effets secondaires.....	95
4. <i>Le vorozole</i>	97
4.1. Activités biochimiques du vorozole.....	97
4.1.1. Activités anti-aromatasase.....	97
4.1.2. Autres activités endocrines.....	98
4.2. Activités anti tumorale.....	98
CHAPITRE V: CONCLUSIONS.....	100
BIBLIOGRAPHIE.....	103
ANNEXES.....	118

REPertoire DES TABLEAUX	125
TABLE DES FIGURES.....	126
TABLE DES MATIERES.	127

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° 312.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

Résumé : L'aromatation est la transformation des androgènes en estrogènes, cette conversion métabolique étant réalisée par le complexe enzymatique de l' **aromatase** qui est organisé autour d'un cytochrome P450. Cette aromatation se déroule essentiellement au niveau des ovaires chez les femmes en activité génitale, mais se poursuit, à un degré moindre, au niveau périphérique chez les femmes ménopausées. Lors de certaines pathologies, pour lesquelles les estrogènes ont une influence néfaste, il peut être très intéressant d'agir au niveau de cette aromatation afin de limiter la synthèse des estrogènes. C'est ainsi le cas des cancers du sein hormonaux dépendants qui peuvent être induits par les estrogènes. Il a de plus été montré que certaines tumeurs mammaires de femmes ménopausées sont le siège d'une aromatation. On a donc développé une classe de molécules **anti-aromatase** qui inhibent ce complexe aromatasique. On distingue les anti-aromatase stéroïdiens à action compétitive ou irréversible et les non stéroïdiens qui bloquent le cytochrome P450. L'aminoglutéthimide a été la première molécule utilisée en tant qu'inhibiteur de l'aromatase, mais manque cependant de spécificité et présente donc de nombreux effets indésirables. On a ensuite développé d'autres inhibiteurs stéroïdiens comme le formestane et l'exemestane qui sont aussi efficaces que l'aminoglutéthimide mais beaucoup plus sélectifs. Les derniers anti-aromatase commercialisés sont non stéroïdiens et présentent en plus d'une grande puissance, une très bonne tolérance. Cette classe médicamenteuse a donc beaucoup évolué et une molécule comme l'anastrozole possède désormais l'indication pour une hormonothérapie en première intention.

Title: Aromatase and aromatase inhibitors. Uses as treatment for breast cancer.

Abstract: The aromatization that changes androgens into estrogens is mediated by aromatase which is a cytochrome P450 enzyme. This conversion takes place mainly in the ovaries in women of child-bearing but peripheral aromatization . Estrogens have a role in a number of disease states, therefore controlling estrogen production by inhibition of aromatase can be a logical treatment strategy. The contribution of estrogens to the growth of breast hormone-dependent cancers has been recognized for a long time. In addition, there is also aromatase activity in some breast cancers. Thus, a new class of drug was improved to inhibit the aromatization: **aromatase inhibitors**. Two classes have been described : steroidal inhibitors which act competitively and irreversibly, and non steroidal inhibitors which block the P450 cytochrome. The first one is aminoglutethimide which is not specific enough and has lot of adverse effects. Later, new steroidal inhibitors have been found as formestane or exemestane, which are as powerful aminoglutethimide but more specific. The last aromatase inhibitors, which are non steroidal inhibitors, are very powerful and very well tolerated. This class of drug is today firmly established in the treatment of breast cancer, and a new inhibitor as anastrozol is now established as first line agent in the treatment of postmenopausal women with advanced breast cancer.

Mots-clés: Aromatase
Cancer du sein
Inhibiteurs d'aromatase

Keywords: Aromatase
Breast cancer
Aromatase inhibitors

Discipline: Biochimie

Intitulé et adresse du laboratoire: Laboratoire de Biochimie
Faculté de Pharmacie de Limoges
2, rue du Docteur Marcland
87025 LIMOGES Cedex