

Faculté de Médecine

Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement

Service de Gynécologie Obstétrique

Promoteur : Professeur JM Foidart

*Développement en Contraception d'un Modulateur Sélectif
du Récepteur de la Progestérone : le VA2914*

Docteur Axelle PINTIAUX

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade

de Docteur en Sciences Médicales

Année Académique 2008-2009

PLAN

Préambule et remerciements

Liste des abréviations

A. Introduction

| | |
|---|-----------|
| 1. Découverte et Développement de la Contraception Hormonale | 11 |
| 2. Développement de la Contraception Progestative | 16 |
| 3. Développement du Dispositif Intra-Utérin (DIU) et du Dispositif Intra-Utérin au Levonorgestrel (DIU-LNG) | 18 |
| 4. Mécanismes Généraux d'Action des Stéroïdes et Structure Générale de leurs Récepteurs | 20 |
| - <i>Mécanismes d'action des stéroïdes</i> | |
| - <i>Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires stéroïdiens</i> | |
| - <i>Structure générale des récepteurs stéroïdiens</i> | |
| 5. Structure du Récepteur de la Progesterone et Mécanismes d'Action | 25 |
| 6. Les Isoformes du Récepteur de la Progesterone (PR) | 30 |
| 7. Les Modulateurs Sélectifs du Récepteur de la Progesterone (SPRMs) | 33 |
| - <i>Intérêt du développement des SPRMs</i> | |
| - <i>Définition des SPRMs</i> | |
| - <i>Mécanismes d'action des SPRMs</i> | |
| - <i>Evaluation des propriétés progestatives/antiprogestatives d'une substance</i> | |
| 8. Les Ligands de PR | 37 |
| - <i>La progesterone</i> | |
| - <i>Les progestatifs</i> | |
| a) <i>Dérivés de la progesterone</i> | |
| b) <i>Dérivés de la 19-nortestostérone</i> | |
| c) <i>Dérivés de la spironolactone</i> | |
| - <i>Ligands de PR à potentiel antagoniste (PAs) d'après la classification reposant sur les effets endométriaux observés lors du test de Mc Phail et sur le potentiel abortif</i> | |
| a) RU486 (mifépristone) | |
| b) ZK98999 (onapristone) | |
| - <i>SPRMs en cours de développement: asoprinsil ou J867 et ulipristal ou VA2914</i> | |

| | |
|---|-----------|
| 9. Impact Gonadotrope des Ligands de PR | 44 |
| - <i>La progestérone</i> | |
| - <i>Les progestatifs</i> | |
| - <i>Les antagonistes de PR</i> | |
| 10. Effet des Ligands de PR sur l'Endomètre | 46 |
| - <i>La progestérone</i> | |
| - <i>Les progestatifs</i> | |
| - <i>Les antagonistes de PR</i> | |
| a) Onapristone | |
| b) Mifépristone | |
| - <i>Les SPRMs</i> | |
| a) VA2914 | |
| b) Asoprisnil | |
| c) Autres: SPRMs non stéroïdiens | |
| d) Nouveaux critères d'évaluation des endomètres sous SPRMs | |
| 11. Mécanismes Impliqués dans les Saignements Endométriaux Observés sous Progestatifs | 54 |
| - <i>Modulation de l'expression des récepteurs stéroïdiens dans l'endomètre (PR, ER, AR, GR)</i> | |
| a) Expression endométriale de PR | |
| b) Expression endométriale de ER | |
| c) Expression endométriale de AR | |
| d) Expression endométriale de GR | |
| - <i>Introcrinologie endométriale</i> | |
| - <i>Altérations de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire : rôle des métalloprotéases matricielles (MMPs) et de leurs inhibiteurs physiologiques (TIMPs)</i> | |
| - <i>Perturbations de l'angiogenèse et de la maturation vasculaire</i> | |
| a) Définition de l'angiogenèse | |
| b) Vascularisation utérine | |
| c) Mécanismes de l'angiogenèse | |
| d) Contrôle moléculaire de l'angiogenèse | |
| I) Promoteurs de l'angiogenèse | |
| II) Inhibiteurs de l'angiogenèse | |

| | |
|---|------------|
| - Hypoxie | |
| 12. Développement des SPRMs - Utilisation en Gynécologie des SPRMs (article de revue) | 72 |
| B. Objectifs de Recherche | 79 |
| C. Résultats et Publications | 81 |
| 1. Evaluation de l'administration continue de VA 2914 sur l'axe gonadotrope et sur l'endomètre : étude prospective randomisée portant sur 3 dosages différents versus placebo. | 82 |
| - Méthode | |
| - Résultats de l'étude clinique | |
| a) Effets sur l'axe gonadotrope | |
| b) Profil des saignements et tolérance clinique | |
| c) Aspects échographiques | |
| d) Histologie endométriale | |
| 2. Effet du VA2914 sur la matrice et la vascularisation endométriales <i>in vivo</i> | 95 |
| - Analyse de la vascularisation | |
| a) Méthode | |
| b) Résultats de l'analyse de la vascularisation | |
| - Mise en évidence du réseau fibrillaire de collagène dans l'endomètre et du VEGF | |
| a) Méthode | |
| b) Résultats | |
| 3. Etudes expérimentales complémentaires | 105 |
| a) Expression de ER et PR | |
| b) Impact du VA2914 sur l'expression des métalloprotéases matricielles et de leurs inhibiteurs | |
| c) Effet du VA2914 sur l'expression des facteurs angiogènes | |
| D. Discussion Générale | 109 |
| E. Conclusion et Perspectives | 118 |
| F. Annexes : articles de revue (applications contraceptives des SPRMs) | 120 |
| G. Références | 133 |

A Maman

Le rêve est grand...

Préambule et Remerciements

L'élaboration d'une thèse concrétise de nombreuses années de travail. Elle n'est pas le fruit d'un seul individu mais d'une ou plusieurs équipes.

Ce travail est né de rencontres, de collaborations et d'amitiés.

Il constitue le reflet de mes pôles d'activité, réunissant étude clinique et recherche fondamentale.

Le parcours de chacun est jalonné de rencontres qui façonnent notre vie.

Le Professeur R. Lambotte m'a permis d'accéder à la gynécologie et m'a proposé de poursuivre ma voie dans son service pour y exercer plus spécifiquement l'endocrinologie de la reproduction. Je lui en serai toujours reconnaissante.

Je tiens à remercier le Professeur U. Gaspard, qui par son enseignement passionné, m'avait donné le goût de cette discipline.

Le Professeur J.M. Foidart m'a accueillie au sein de son équipe clinique et de recherche et m'a offert cette grande chance de poursuivre l'acquisition de connaissances au sein d'un service d'endocrinologie de réputation internationale, celui du Professeur Bouchard à l'hôpital Saint-Antoine de Paris.

Le Professeur Foidart grâce à ses idées visionnaires, insufflant le renouveau dans son Département, m'a soutenue dans tous mes projets cliniques comme dans mes travaux de recherche au laboratoire. Je l'en remercie très sincèrement.

Je souhaite remercier le Professeur A. Noël et toute son équipe qui m'accueillent régulièrement au laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement depuis cette époque où nous étudions l'invasion trophoblastique. Je les remercie pour l'encadrement qu'ils m'ont apporté. Je remercie particulièrement Madame S. Ravet pour son aide, son travail bénédictin de mesure, de comptage vasculaire et ses méticuleux schémas, le Dr S. Blacher pour ses ingénieuses techniques et ses encouragements, Madame ML Alvarez et Monsieur F. Frankenne pour leur soutien scientifique depuis de nombreuses années au laboratoire,

Monsieur V. Lambert pour sa disponibilité et son assistance technique et Monsieur Guy Roland, souriant toujours après de longues heures de chambre froide.

La rencontre avec le Professeur Bouchard et ses collaborateurs fut déterminante dans l'orientation de ma vie professionnelle.

Une équipe passionnée m'a accueillie avec beaucoup de chaleur durant 2 ans.

Des liens forts se sont tissés entre les équipes parisienne et liégeoise qui se sont renforcés au cours des années. Ils nous ont permis de continuer à travailler ensemble et de réaliser les études qui font l'objet de cette thèse. Je remercie de tout cœur le Professeur Bouchard de la confiance qu'il m'a témoignée, de toute la connaissance qu'il m'a transmise et de son soutien toujours présent.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Docteur N. Chabbert-Buffet, clé de voute du travail sur les SPRMs, qui m'a toujours témoigné son amitié et accordé son aide, ses conseils dans ce travail comme dans bien d'autres.

Je souhaite également témoigner mes remerciements les plus amicaux au Professeur M. Nisolle pour ses encouragements stimulants, son soutien précieux et son aide dans la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes remerciements au Docteur A. Beliard qui m'a également aidée de ses conseils judicieux dans la finalisation de cette thèse.

Je remercie vivement Mesdames M. Spletincx et B. Deneumostier qui m'ont apporté leurs talents pour la mise en forme de ce travail.

Enfin, je tiens à remercier les membres du comité de thèse et du jury d'avoir accepté de consacrer leur temps précieux à l'évaluation de ce travail.

Je dois toute ma reconnaissance à ma famille qui m'a supportée et me supporte toujours dans mes activités souvent envahissantes, conciliant travail scientifique et activités cliniques universitaires. Toutes mes pensées affectueuses à Solène, ma fille, qui m'a apporté son soutien par ses performances informatiques.

Liste des Abréviations

| | |
|-------------------------------|---|
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| αSMA | <i>Alpha smooth muscle actin</i> |
| Ang | Angiopoïétine |
| AR | Récepteur des androgènes |
| βHSD | β -hydroxystéroïde déshydrogénase |
| CE | Cellule endothéliale |
| DIU | Dispositif intra-utérin |
| DIU-LNG | Dispositif intra-utérin à libération de lévonorgestrel |
| EBAF | <i>Endometrial bleeding-associated factor</i> |
| EGF | <i>Epidermal growth factor</i> |
| EG-VEGF | <i>Endocrine gland-vascular endothelial growth factor</i> |
| ER | Récepteur des estrogènes |
| ERE | <i>Estrogen response element</i> |
| FGF | <i>Fibroblast growth factor</i> |
| FSH | <i>Follicle stimulating hormone</i> |
| GnRH | <i>Gonadotropin releasing hormone</i> |
| GnRHR | <i>Gonadotropin releasing hormone receptor</i> |
| GR | Récepteur des glucocorticoïdes |
| HCG | Hormone chorionique gonadotrope |
| hCG | <i>human chorionic gonadotropin</i> |
| HIF | <i>Hypoxia-inducible factor</i> |
| HRE | <i>Hormone response element</i> |
| HSP | <i>Heat-shock proteins</i> |
| ID | <i>Inhibiting domain</i> |
| IGF | <i>Insulin-like growth factor</i> |
| IGFBP | <i>IGF binding protein</i> |
| LH | <i>Luteinizing hormone</i> |
| LNG | Lévonorgestrel |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| MHC | <i>Myosin Heavy Chain</i> |
| MMP | Métalloprotéase matricielle |

| | |
|---------------|---|
| MPA | Acétate de médroxyprogesterone |
| MR | Récepteurs des minéralocorticoïdes |
| mRNA | RNA messager |
| MT-MMP | Métalloprotéase membranaire |
| NCoR | Co-répresseur nucléaire |
| NG2 | <i>Nerve/glial antigen 2</i> |
| NLS | Séquence de localisation nucléaire |
| NRP | Neuropilines |
| PAEC | <i>Progesterone Receptor Modulator Associated Endometrial Changes</i> |
| PAs | Antagonistes du récepteur de la progestérone |
| PECAM | <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> |
| PDGF | <i>Platelet-derived growth factor</i> |
| PDGFR | Récepteur du PDGF |
| PG | Prostaglandine |
| PIGF | <i>Placental growth factor</i> |
| PR | Récepteur de la progestérone |
| PRE | <i>Progesterone response element</i> |
| RECK | <i>Reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs</i> |
| RNA | Acide ribonucléique |
| SMRT | <i>Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone</i> |
| SPRM | Modulateur sélectif du récepteur de la progestérone |
| SRC | <i>Steroid receptor coactivator</i> |
| TAF | <i>Transcription activation function</i> |
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> |
| TIMP | <i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteases</i> |
| Tie-2 | Récepteur des angiopoïétines |
| TNF | <i>Tumor necrosis factor</i> |
| TSP | Thrombospondine |
| uNK | Cellule “Natural Killer” utérine |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> |
| VEGFR | Récepteur du VEGF |
| VSMC | Cellule musculaire lisse vasculaire |
| vWF | Facteur de von Willebrand |

A. INTRODUCTION

1. Découverte et Développement de la Contraception Hormonale

C'est au début du 20^{ème} siècle que, pour la première fois, la possibilité d'inhibition de la fertilité par des extraits ovariens administrés par voie orale fut démontrée chez la souris par Ludwig Haberlandt, Professeur de Physiologie à l'Université d'Innsbruck.

Des extraits stéroïdiens administrés à différents modèles animaux reproduisent cette inhibition de la fertilité.

Dès 1931, L. Haberlandt émet le concept de contrôle possible des naissances par l'administration d'hormones.

Le développement du premier extrait stéroïdien, appelé "Infecundin" ne put aboutir en raison du décès prématuré du Professeur Haberlandt et de la disparition de son fidèle collaborateur, le gynécologue viennois le Docteur Otto Fellner suite à l'annexion de l'Autriche à l'Allemagne nazie.

C'est Edward Doisy qui procédera le premier à l'extraction de l'estradiol à partir des ovaires de truies.

Russell E. Marker, chimiste travaillant d'abord dans le domaine de la pétrochimie, va mettre au point une méthode de transformation de la sapogénine (stéroïde d'origine végétale) en une molécule progestative. La méthode d'extraction de la progestérone à partir d'ovaires est très peu rentable (les ovaires de 2 500 truies gravides sont nécessaires à l'extraction d'1 mg de progestérone). R.E. Marker voit la solution dans l'utilisation de sources végétales comme l'agave, le yam, riches en diosgénine dérivant de la sapogénine. C'est au Mexique qu'il va trouver la "Cabeza de Negro" utilisée par les autochtones pour faciliter la capture du poisson dont il va extraire la diosgénine. Ne trouvant aucune aide dans l'industrie, il fonde sa propre entreprise (Syntex) dans un vieil atelier de poterie mexicaine.

Carl Djerassi et d'autres chimistes de Syntex découvrent l'augmentation de l'activité progestative par retrait du carbone en position 19 de la progestérone. Hudson Hoagland, brillant biologiste, et Grégory Pincus, physiologiste, peu soutenus par leur université, développent un centre privé de recherche, le "Worcerster Foundation for Experimental Biology". S'y associe rapidement Min-Chueh Chang qui va confirmer la possibilité d'inhiber l'ovulation chez la lapine par la progestérone (cité dans Speroff *et al.* 1999).

La noréthistérone et le noréthynodrel deviennent à l'époque disponibles (cité dans McCann & Potter 1994). M. Chang, en les administrant par voie orale aux lapines, montre un taux d'inhibition de l'ovulation de 100 %. Grâce à une généreuse donatrice, la recherche dans ce domaine fut menée à bien par G. Pincus et M. Chang qui permirent la mise au point de la

première contraception hormonale. Cette formidable découverte fut annoncée en 1955 à Tokyo à l'"International Planned Parenthood Meeting".

Extrêmement sensibilisé par l'accroissement démographique et ses conséquences sur la misère des hommes, G. Pincus, par son acharnement, permit l'élaboration de la contraception hormonale et l'apporta dans le domaine public (Pincus 1965).

Depuis cette époque, la compréhension du contrôle hypothalamo-hypophysaire de l'ovulation a bien évolué. Néanmoins les mécanismes complexes de régulation hypothalamo-hypophysaire sont encore imparfaitement appréhendés. Le rôle inhibiteur de la progestérone et des progestatifs sur la pulsatilité de la GnRH (gonadotropin releasing hormone) hypothalamique entraînant un ralentissement de la libération hypophysaire de la LH (luteinizing hormone) est considéré comme le mécanisme contraceptif principal au niveau central (Kasa-Vubu *et al.* 1992).

Des estrogènes seront ajoutés aux progestatifs afin d'obtenir un contrôle du cycle. La pilule estroprogestative était née.

Enovid® fut enregistrée en 1960 (150 µg de mestranol et 9,85 mg de noréthynodrel). Dans le même groupe de chercheurs, John Rock voit dans les progestatifs une possibilité de contrer l'infertilité.

L'utilisation de la contraception hormonale s'accompagnera de changements importants dans notre société où elle est largement diffusée.

Dans les années 1970, les effets secondaires ainsi que l'impact du dosage de la pilule estroprogestative vont être mis en lumière. Le dosage efficace le plus faible va être recherché. L'estrogène puissant contenu dans les préparations estroprogestatives contraceptives est à l'origine des complications cardiovasculaires observées.

Le risque de thrombose veineuse profonde et de sa possible conséquence, l'embolie pulmonaire, est accru par l'utilisation d'estrogènes oraux de façon dose dépendante. Les premières études épidémiologiques montrèrent un risque multiplié par 6 de thrombose veineuse au cours de l'utilisation des pilules estroprogestatives fortement dosées en éthinylestradiol (80 – 100 µg) (Helmrich *et al.* 1987; Thorogood *et al.* 1992) .

Les premières études "cas contrôle" et de cohorte vont également révéler une augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral et d'infarctus du myocarde avec les préparations hautement dosées en éthinylestradiol (Hannaford *et al.* 1994; Helmrich *et al.* 1987; Jick *et al.* 1978; Lidegaard 1996; Vessey *et al.* 1984).

Les premiers progestatifs utilisés en contraception ont été obtenus à partir de la testostérone. Le retrait du carbone en position 19 transforme l'éthistérone en noréthindrone, molécule

progestative conservant néanmoins des propriétés anaboliques et androgéniques. Cette dernière molécule a également la propriété de lier le récepteur des estrogènes mais les répercussions cliniques sont négligeables aux doses utilisées (Edgren & Stanczyk 1999).

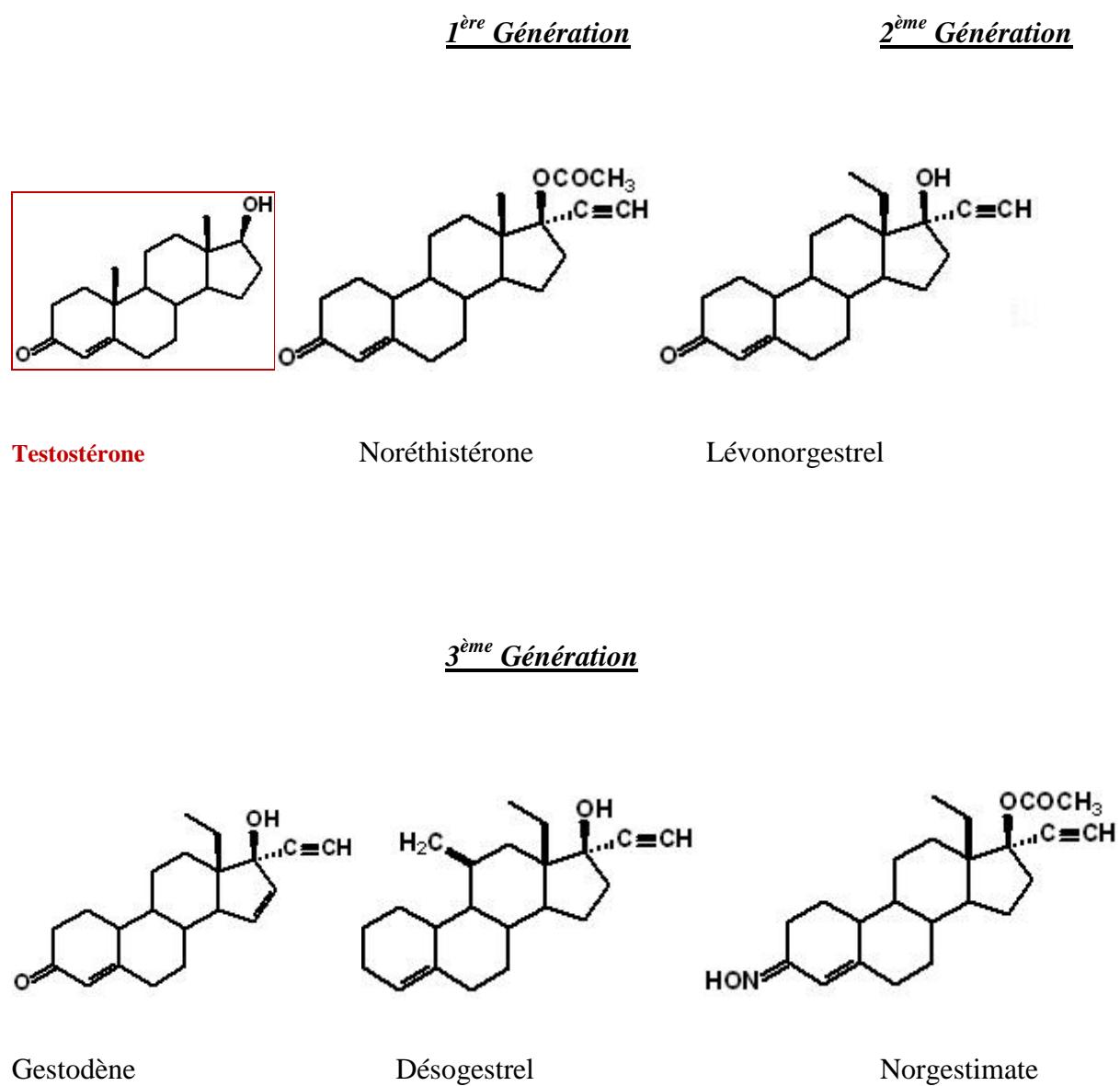
Les molécules progestatives dérivées de la 19-nortestostérone sont outre la noréthindrone, le noréthynodrel, l'accétate de noréthindrone, le diacétate d'éthynodiol, le lynestrénol, le norgestrel, le norgestimate, le désogestrel et le gestodène.

Le désogestrel et le gestodène, molécules les moins androgéniques de cette famille, sont utilisés dans les préparations estroprogestatives contraceptives dites de troisième génération (associés à 20 ou 30 µg d'éthinylestradiol).

La première génération d'estroprogestatifs est caractérisée par l'emploi d'éthinylestradiol à 50 µg ou plus. La seconde génération utilise les progestatifs proches de la noréthindrone, comme le lévonorgestrel (LNG) en association à 30 ou 35 µg d'éthinylestradiol.

Comparé au lévonorgestrel, le désogestrel comprend un groupe méthyl en position 11 et le gestodène une double liaison entre les carbones 15 et 16. Le norgestimate est souvent considéré comme un progestatif de troisième génération. Néanmoins, il parfois considéré comme un progestatif de seconde génération en raison de sa métabolisation notamment en LNG .

Figure 1 : Nouveaux Progestatifs : Gestodène, Norgestimate et Désogestrel



(D'après C. Matthew Peterson, 1995)

La réduction du pouvoir androgénique des progestatifs s'accompagne d'un effet favorable sur le taux de cholestérol et les lipoprotéines plasmatiques et concourt à offrir aux patientes une contraception plus sécurisante au niveau cardiovasculaire (Gevers Leuven *et al.* 1990; Kloosterboer & Rekers 1990).

Sous la pilule de troisième génération, le risque d'infarctus du myocarde n'apparaît pas augmenté par rapport à la population générale mais il est réduit par rapport à l'utilisation de la pilule estroprogestative de deuxième génération (Lewis *et al.* 1997). Avec la simple réduction du dosage en éthinylestradiol (< 50 µg), l'augmentation du risque d'accident vasculaire cérébral thrombotique n'est plus significative (1997) (WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Contraception, 1997). De ce point de vue, l'utilisation d'une pilule de troisième génération (gestodène ou désogestrel) n'apporte pas de bénéfice significatif supplémentaire (Lidegaard 1996; Lidegaard & Kreiner 1998).

Dans les grandes études évaluant les répercussions cardiovasculaires éventuelles de la contraception estroprogestative orale, le risque cardiovasculaire apparaît dominé par l'âge, le tabagisme, l'hypertension, le diabète, les antécédents cardiovasculaires personnels et familiaux, les antécédents de migraine et la dyslipidémie (1997; Lewis *et al.* 1997). L'histoire familiale d'infarctus du myocarde et le tabagisme affectent réellement le risque d'infarctus du myocarde associé à l'utilisation de la pilule estroprogestative (Lidegaard 1996).

Si le risque thrombotique veineux n'apparaît pas influencé par les progestatifs utilisés seuls, les progestatifs de troisième génération, en combinaison à l'éthinylestradiol, semblent augmenter ce risque (Madelenat & Koskas 2008; Speroff & DeCherney 1993). Les études concernant l'utilisation des générations de pilules estroprogestatives les plus récentes (préparations les moins dosées) objectivent la persistance d'une augmentation de risque (multiplié par 3 ou 4) par rapport à l'incidence dans la population générale. L'utilisation d'une préparation de troisième génération versus deuxième génération s'accompagne d'un risque augmenté de thromboembolisme veineux multiplié par 1,5 ou 2 selon les études (1995; Farmer & Lawrenson 1996; Jick *et al.* 1995; Spitzer *et al.* 1996).

La découverte de mutations prothrombotiques comme le facteur V de Leiden permet de mieux sélectionner les patientes à risque de thrombophilie selon leur histoire personnelle et familiale (Vandenbroucke *et al.* 1994). Dans un certain nombre de situations cliniques, la contraception estroprogestative ne pourra être utilisée avec sécurité.

2. Développement de la Contraception Progestative

La contraception progestative seule pourra trouver sa place lorsque l'éthinylestradiol est à éviter (risque thrombotique veineux ou artériel, hypertension artérielle, tumeur estrogénodépendante, migraine accompagnée, lupus érythémateux ...).

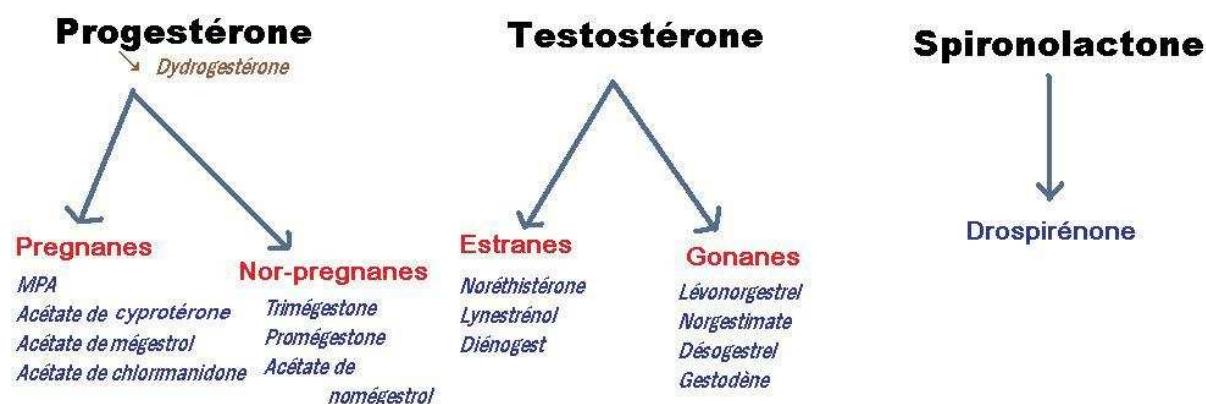
Selon la molécule progestative et son dosage, les effets sur l'axe gonadotrope et sur l'endomètre, principales cibles contraceptives, seront différents.

Les progestatifs dérivés des androgènes possèdent une activité antigenadotrope établie, inhibent le pic de LH et représentent le principe contraceptif des premières pilules estroprogestatives mais aussi celui de la dernière génération (Christin-Maitre 2008).

Certains dérivés de la 17-hydroxyprogesterone (les pregnanes) possèdent également une action antigenadotrope puissante (Couzinet *et al.* 1999; Jamin *et al.* 2003).

Dans le groupe des norpregnanes, l'acétate de nomégestrol et la promégestone, non disponible actuellement en Belgique, sont utilisés pour leur pouvoir antigenadotrope face à des kystes ovariens fonctionnels et en contraception progestative pure mais sans reconnaissance officielle dans cette indication.

Figure 2 : Classification des Progestatifs



Par contre, les microprogestatifs sont enregistrés dans l'indication contraceptive. Il s'agit de petites doses de progestatifs utilisés seuls, en continu (0,075 mg de désogestrel ou 0,030 mg de LNG) commercialisées en Belgique sous les noms respectivement de Cerazette® et Microlut®. Dérivés de la 19-nortestostérone, leur faible dosage tend à limiter leurs effets métaboliques indésirables.

L'effet contraceptif est obtenu par une action endométriale et un épaississement de la glaire cervicale. Le transfert tubaire peut également être modifié. L'ovulation est inconstamment inhibée sous Microlut® (60%). L'inhibition plus puissante de l'axe gonadotrope observée sous Cerazette® en fait une contraception plus fiable (Rice *et al.* 1999; McCann & Potter 1994; Rice *et al.* 1999).

L'efficacité contraceptive du microprogestatif chez des femmes motivées et bien conscientes de l'importance d'une prise régulière est du même ordre que celle de la pilule estroprogestative (Graham & Fraser 1982).

Le problème principal de cette contraception progestative seule réside dans l'apparition irrégulière des saignements. Le profil des saignements est en effet imprévisible allant de l'aménorrhée (20 %) aux saignements irréguliers (métrorragies ou spotting selon l'abondance) (Graham & Fraser 1982).

Ces saignements constituent la raison principale de l'arrêt de la pilule progestative (Broome & Fotherby 1990).

Sous cette contraception, des kystes ovariens fonctionnels peuvent être observés. Néanmoins, ceux-ci ne représentent pas un problème clinique significatif (Tayob *et al.* 1985).

Dénuee des effets vasculaires des estroprogestatifs, la contraception progestative voit son développement également dans des méthodes à action prolongée.

Ces méthodes simplifient l'utilisation de la contraception en augmentant la compliance.

Le Norplant® 1 est constitué de 6 capsules de silastic contenant en tout 216 mg de LNG qui diffuseront le principe actif durant 7 ans. Le dispositif, placé en sous cutané, offre une sécurité contraceptive aussi importante que la stérilisation ou le DIU (Roy *et al.* 1984). Lors des premiers mois d'utilisation, la dose de LNG relarguée dans la circulation par l'implant (85 µg/24h) est du même ordre que celle obtenue lors de la prise d'un microprogestatif. Les mécanismes d'action contraceptive du Norplant® sont similaires à ceux de la mini pilule progestative (Segal *et al.* 1991).

Comme observé chez les utilisatrices de microprogestatifs, les saignements irréguliers (80 % des patientes au cours de la première année d'utilisation) représentent l'inconvénient principal de cette méthode contraceptive (Nilsson & Holma 1981; Shoupe *et al.* 1991).

Commercialisé en Belgique, un implant (Implanon®) de 60 mg de 3 céto-désogestrel en diffuse 60 µg quotidiennement et assure la contraception durant 3 ans. Les bénéfices et les effets secondaires sont comparables à ceux du Norplant® (Diaz *et al.* 1991; Olsson *et al.* 1990).

Une contraception injectable (Depo-Provera® : 150 mg de microcristaux d'acétate de médroxyprogesterone (MPA) en solution aqueuse, à administrer en intra-musculaire tous les 3 mois) est disponible depuis les années 1960 dans certains pays et est reconnue pour son importante efficacité contraceptive (1 grossesse sur 100 femmes après 5 ans d'utilisation) (Belsey *et al.* 1986; Rosenfield *et al.* 1983). Les mécanismes d'action contraceptive de cette méthode sont ceux observés pour l'implant et les microprogestatifs. De plus, en raison du taux circulant élevé de MPA, une inhibition du pic de la LH est observée. Comme décrit pour les précédentes contraceptions progestatives, un des problèmes importants induit par cette méthode est le saignement irrégulier (70 % des patientes au cours de la première année d'utilisation) (Belsey *et al.* 1986; Rosenfield *et al.* 1983). Plus de 25 % des patientes arrêtent le Depo-Provera® au cours de la première année d'utilisation (Cromer *et al.* 1994). Au cours du temps, les saignements s'amendent et 80 % des patientes présentent une aménorrhée après 5 ans d'utilisation contrairement à la situation observée sous Norplant® où seulement 10 % des utilisatrices obtiennent une aménorrhée après 5 ans d'utilisation (Gardner & Mishell, Jr. 1970).

3. Développement du DIU et du DIU-LNG

Dès le début du 20^{ème} siècle, une méthode contraceptive voit son développement : le dispositif intra-utérin. E. Gräfenberg en Allemagne et T. Ota au Japon sont les pères du DIU (Gräfenberg E 1930; Ota 1934)

L'efficacité du DIU sera majorée par l'adjonction de cuivre en 1969 (Zipper *et al.* 1969). L'ajout d'un progestatif au DIU va permettre une meilleure tolérance clinique en réduisant dysménorrhée, ménorragie et taux d'infection pelvienne (Lethaby *et al.* 2000). Le Mirena® est un DIU en forme de T contenant 52 mg de LNG (DIU-LNG) et relarguant 20 µg de ce progestatif quotidiennement (Luukkainen *et al.* 1986). La concentration plasmatique de LNG observée chez les patientes porteuses d'un DIU de type Mirena® représente la moitié de celle observée sous Norplant® (Bilian 2007). Elle permet une suppression partielle des gonadotrophines. Les cycles sont ovulatoires dans 80 % des cas, 1 an après l'insertion du dispositif (Nilsson *et al.* 1984). L'action contraceptive est celle du DIU qui induit une réaction

inflammatoire endométriale contre un corps étranger (Ortiz *et al.* 1996). L'expression endométriale de glycodeline A, glycoprotéine inhibant l'interaction entre les gamètes, est décrite sous DIU-LNG comme sous DIU au cuivre (Mandelin *et al.* 1997). Suite à l'adjonction du LNG, l'endomètre apparaît déclimaté et les glandes atrophiques (Nisolle & Foidart 2009). L'action atrophiante sur l'endomètre, et l'épaississement de la glaire cervicale, impropre au passage des spermatozoïdes, complètent les mécanismes contraceptifs de cette méthode hautement fiable (0,2 % de grossesse) (Sivin & Schmidt 1987).

Endéans les 2 ans d'utilisation du DIU-LNG, 70 % des patientes présentent une oligo-aménorrhée et 30 % développent une aménorrhée. Comme observé sous contraception progestative pure, l'utilisation du DIU-LNG s'accompagne, dans les premiers mois d'utilisation, de mètrorragies indésirables (Chi 1991).

Le DIU-LNG permet d'obtenir un effet contraceptif durant 7 ans. Il est également indiqué en thérapeutique dans les mètrorragies fonctionnelles et l'hyperplasie endométriale (Orbo *et al.* 2008). C'est en Finlande qu'il a été essentiellement étudié dans ces indications. Il apparaît une alternative efficace et moins onéreuse aux traitements chirurgicaux utérins (Luukkainen & Toivonen 1995).

Les mécanismes pathogéniques des saignements utérins fonctionnels sont toujours à l'étude. L'endomètre, cible majeure des progestatifs et de la progestérone, subit des remaniements périodiques importants au cours du cycle menstruel.

Sa croissance, observée durant la phase proliférative sous l'action de l'oestradiol, est suivie d'une maturation durant la phase sécrétive sous l'action de la progestérone préparant l'endomètre à une éventuelle implantation. En l'absence de grossesse, lors de la chute du taux circulant de progestérone, l'endomètre se dégrade et sa partie superficielle s'élimine au cours des règles. Les stéroïdes sexuels apparaissent comme des facteurs systémiques permettant l'évolution de l'endomètre à travers les différentes phases caractéristiques du cycle menstruel. La chute du taux de progestérone représente un élément clé dans le déclenchement du saignement. Différents paramètres régulant l'action des stéroïdes dans l'endomètre sont impliqués dans l'apparition des saignements endométriaux fonctionnels.

4. Mécanismes Généraux d'Action des Stéroïdes et Structure Générale de leurs Récepteurs

- *Mécanismes d'action des stéroïdes*

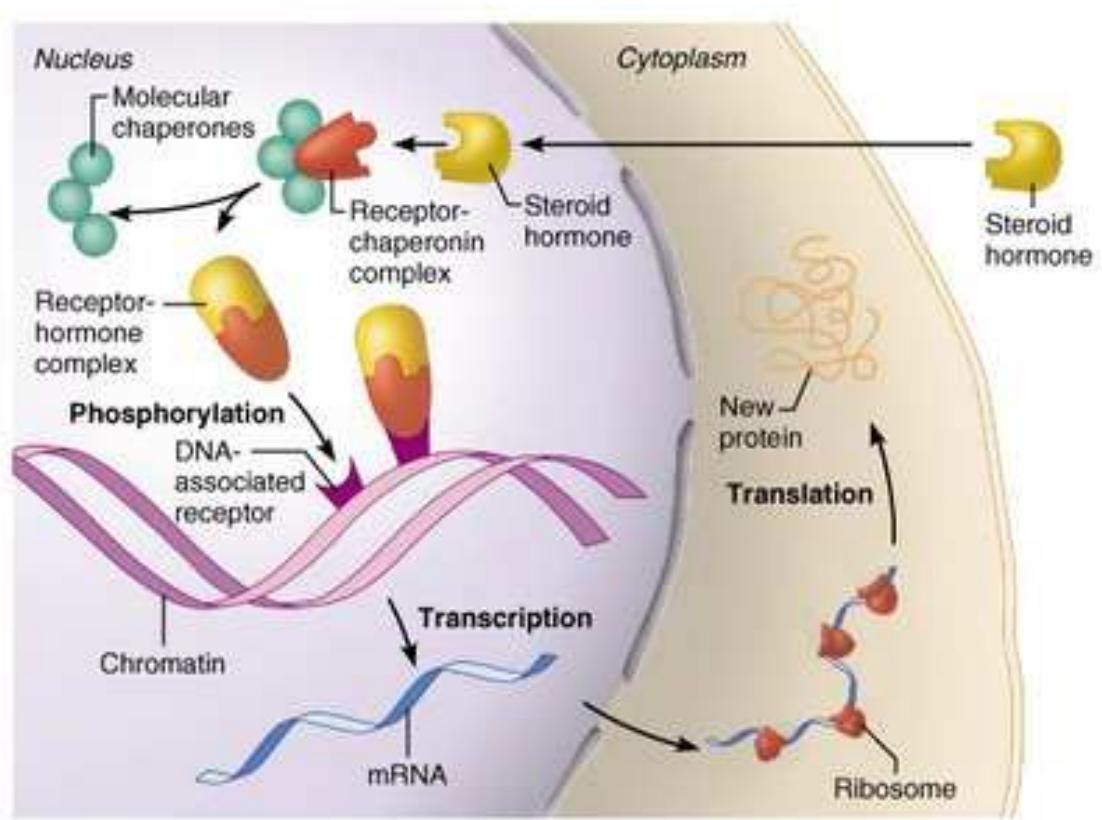
Les stéroïdes agissent sur leurs cellules cibles en contrôlant la transcription de gènes après fixation sur leurs récepteurs nucléaires. Les récepteurs des stéroïdes font partie de la *super famille des récepteurs nucléaires* (Evans 1988).

Les récepteurs de stéroïdes partagent une structure commune avec les récepteurs des hormones thyroïdiennes, de la vitamine D, de l'acide rétinoïque, du cholestérol et des acides gras. Cette famille inclut également des protéines représentées dans de nombreuses espèces allant des insectes à l'espèce humaine dont on ignore les ligands, ce sont les récepteurs orphelins.

Pour régler positivement ou négativement la transcription, les récepteurs nucléaires interagissent avec des molécules capables de se connecter à la machinerie transcriptionnelle de base ou de modifier l'état d'acétylation de protéines chaperonnes. Les récepteurs nucléaires se fixent à leurs éléments de réponse (Hormone Response Element – HRE) en présence de leur ligand. En l'absence de ligand, le récepteur contacte, via son domaine de fixation au ligand, des corépresseurs qui entraînent notamment la désacétylation des protéines chaperonnes qui stabilisent leur fixation sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) et rendent la chromatine inaccessible aux facteurs de transcription. Par contre, la fixation du ligand au récepteur entraîne un changement spatial de celui-ci qui est en mesure de fixer les coactivateurs responsables de l'acétylation des protéines chaperonnes et permettre leur dégagement de l'ADN accessible ainsi à la transcription. Ils stabilisent la liaison du récepteur ou de la machinerie basale de transcription sur le promoteur. (Brosens *et al.* 2004; Weigel 1996).

- *Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires stéroïdiens*

Figure 3 : Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires stéroïdiens



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

- *Structure Générale des Récepteurs Stéroïdiens*

- *La région N-terminale (A-B)* qui est la moins conservée dans la super famille des récepteurs nucléaires comprend 20 acides aminés pour le récepteur de la vitamine D et 600 acides aminés pour celui des minéralocorticoïdes. Cette région contient un activateur de la transcription AF1(activation function) agissant de façon constitutive indépendamment du ligand.
- *La région C*, domaine de liaison à l'ADN, le DBD (DNA Binding Domain) comprend 8 cystéines en position stable qui permettent la formation de deux doigts de zinc. Ce domaine est essentiel à l'activation de la transcription. La fixation du ligand entraîne un changement dans la configuration du récepteur permettant la liaison à HRE sur le gène cible. La spécificité de liaison du récepteur à son HRE est déterminée par le premier doigt de zinc. Le deuxième doigt de zinc permet la dimérisation du récepteur.
- *La région D*, située entre le domaine de liaison à l'ADN et la région E, domaine de fixation de l'hormone, permet le contrôle du transit du récepteur à partir du cytoplasme où il est synthétisé, vers le noyau. Cette région est également un site de rotation permettant des modifications spatiales.
- *La région E/F*, domaine de liaison à l'hormone, le LBD (Ligand Binding Domain), est située à l'extrémité carboxylée du récepteur. Cette région permet, outre la liaison à l'hormone, la dimérisation des récepteurs et l'activation de la transcription par une zone fonctionnelle appelée AF2. C'est aussi l'endroit de liaison aux protéines chaperonnes. Contrairement à AF1, l'activité de AF2 dépend totalement de la fixation de l'hormone au récepteur (Drummond 2006).

Figure 4 : Organisation structurelle des récepteurs nucléaires

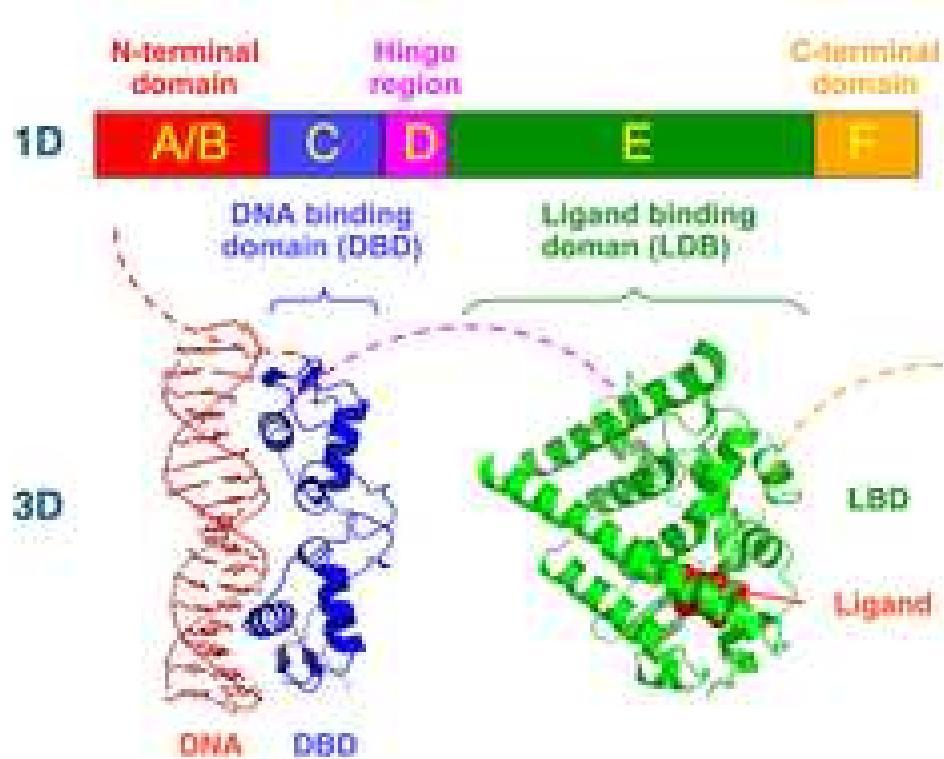
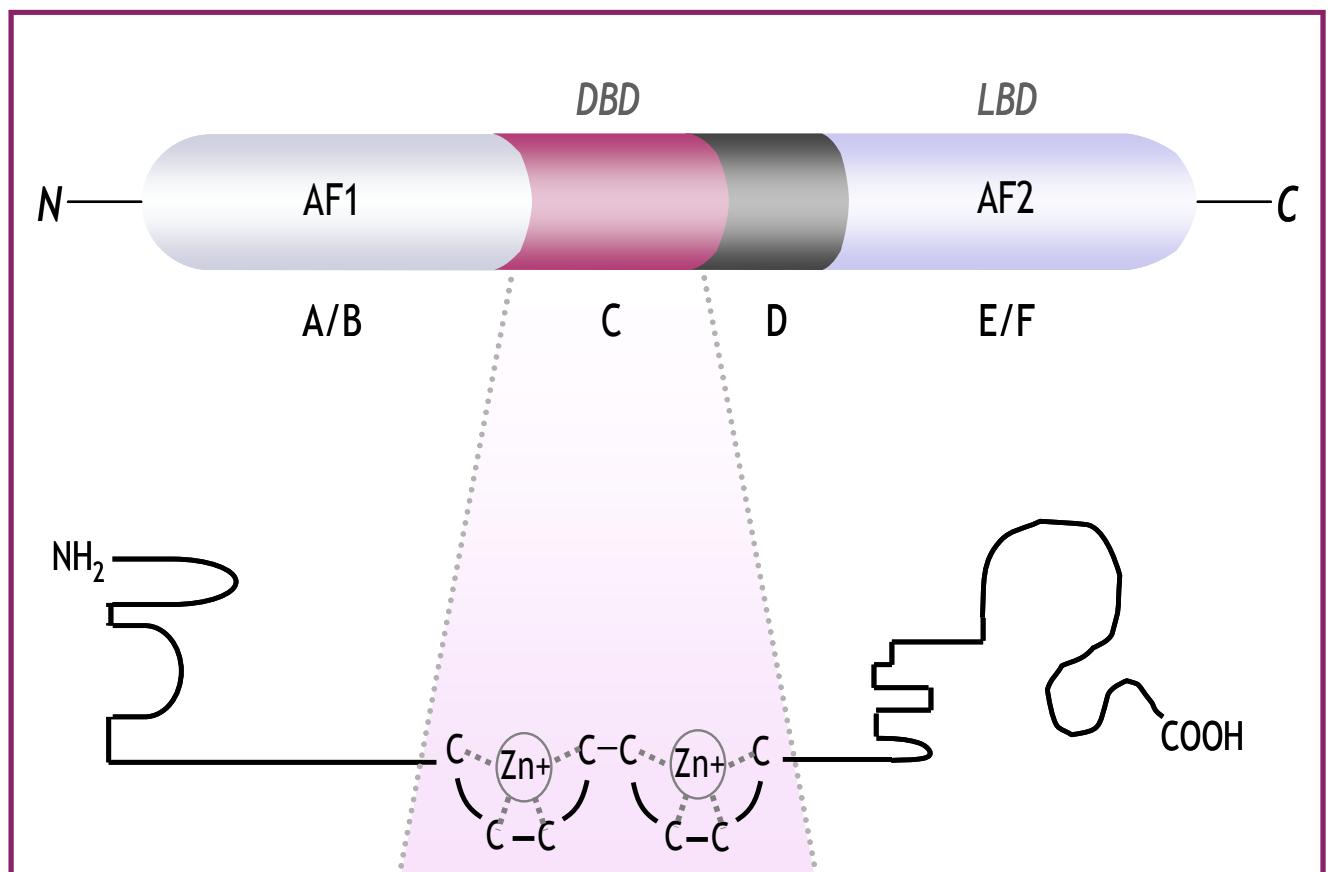


Figure 5 : Structure générale des récepteurs des stéroïdes



(D'après Drummond, 2006)

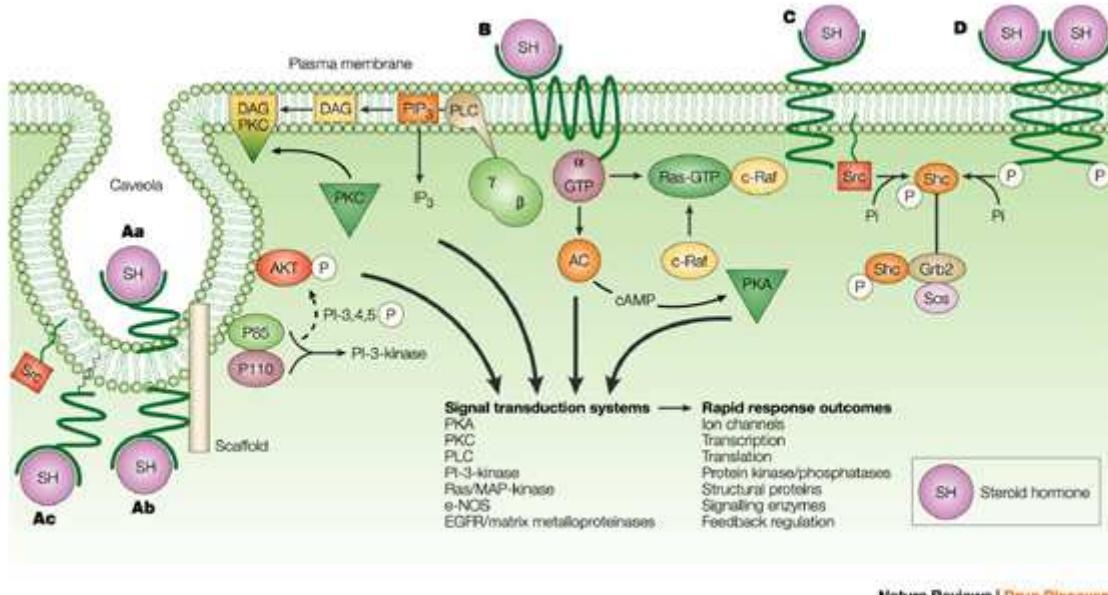
5. Structure du Récepteur de la Progestérone et Mécanismes d'Action

Le récepteur de la progestérone (PR) fait partie de la famille des récepteurs nucléaires. Ce récepteur active la transcription de gènes après fixation du ligand (Li *et al.* 2003).

D'autres voies de signalisation sont décrites (src, ras, MAP kinases ...) (Migliaccio *et al.* 1998). La progestérone contrôle l'expression de nombreux gènes dans le système reproducteur mais également dans d'autres tissus.

Il existe de plus des effets rapides de la progestérone indépendants du phénomène de transcription, ce sont les effets non génomiques (Balasubramanian *et al.* 2008a; Balasubramanian *et al.* 2008b; Boonyaratanaakornkit *et al.* 2008). Il s'agit de mécanismes d'action extranucléaire de la progestérone. Ainsi la progestérone possède la capacité de se fixer au récepteur de l'ocytocine, couplé aux protéines G et d'inhiber son action (Grazzini *et al.* 1998). C'est par le biais d'un dérivé, l'allopregnenolone ne se fixant pas sur PR mais modulant l'action du récepteur de l'acide gammaaminobutyrique que la progestérone peut engendrer des effets sur le système nerveux central (Boonyaratanaakornkit & Edwards 2004). Des récepteurs membranaires à la progestérone sont décrits. Certains présentent une structure apparentée à celle des récepteurs couplés aux protéines G (Zhu *et al.* 2003) et pourraient être impliqués dans le contrôle de la parturition (Karteris *et al.* 2006).

Figure 6 : Mécanismes extra-nucléaires de la progesterone

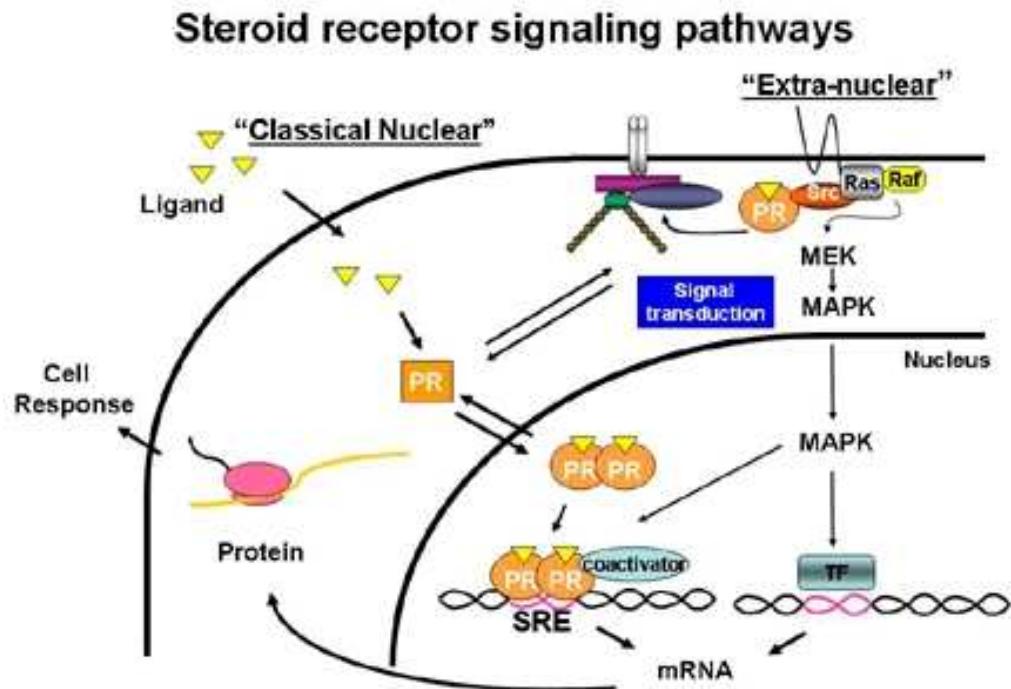


Nature Reviews | Drug Discovery

Schematic diagram of a steroid hormone interacting with four classes of membrane receptors to generate second messengers linking to variety of signal-transduction systems. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model.

(D'après AW. Norman, MT. Mizwicki & DPG Norman, 2004)

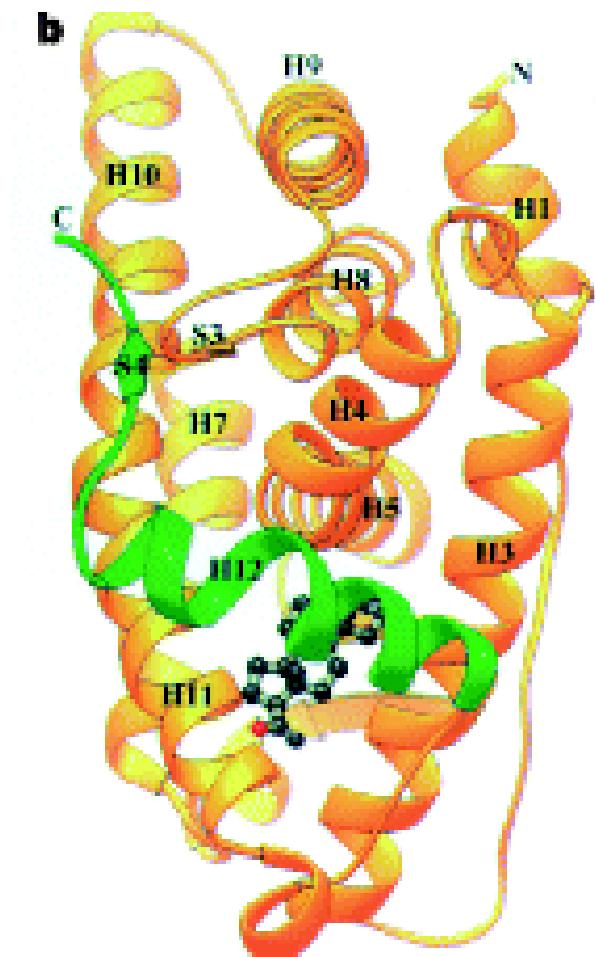
Figure 7 : Voies de signalisation de PR



Le récepteur de la progestérone contient comme les différents membres de la super famille des récepteurs nucléaires, une extrémité N-terminale, un domaine central de liaison à l'ADN, et une extrémité C-terminale permettant la fixation du ligand. Le LBD, contient, outre le domaine de liaison à l'hormone, des déterminants de dimérisation (DI) liant des protéines chaperonnes comme les protéines de chocs thermiques (HSPS) en l'absence de ligand. Ce LBD contient également une séquence de localisation nucléaire (NLS). Le DBD contient une seconde séquence de localisation nucléaire et un domaine de dimérisation dépendant de la fixation à l'ADN. Les NLS contrôlent le trafic nucléocytoplasmique des récepteurs nucléaires. Ces signaux entraînent PR dans le noyau (Guiochon-Mantel *et al.* 1994). Un domaine d'activation de la transcription AF1 est localisé dans l'extrémité N-terminale et le domaine d'activation AF2, hautement conservé, est situé dans l'extrémité C-terminale. AF2 est activé suite à un changement spatial du récepteur créant une poche hydrophobe permettant la liaison à une famille de co-activateurs, les SRC (Steroid Receptor Coactivators). La liaison de la progestérone à son récepteur induit des changements conformationnels qui permettent la dissociation des protéines de chocs thermiques, l'homodimérisation du récepteur et la fixation des homodimères au niveau des éléments de réponse à la progestérone (PREs) au niveau du promoteur des gènes cibles (Cheung & Smith 2000; Tsai & O'Malley 1994).

Le LBD de PR, lié à l'hormone, comporte des hélices α rangées en sandwich. Le LBD de PR comparé à celui du récepteur des estrogènes(ER) ne comporte pas l'hélice 2. Néanmoins, la nomenclature des hélices a été conservée par homologie avec le récepteur de ER. Ainsi la dernière hélice du LBD de PR est dénommée hélice 12 alors que le récepteur n'en comporte que 11. Cette hélice comporte la séquence d'activation AF2. La mobilité de cette hélice 12 est responsable des propriétés dynamiques différentes du LBD dans sa forme apo (non liée) et holo (liée). Cette hélice impliquée dans la fonction d'activation AF2 ne serait pas stable dans la forme apo. Un agoniste stabilisera l'hélice 12 dans une conformation active grâce à laquelle le recrutement des co-activateurs pourrait se dérouler. Le RU486 empêche l'hélice 12 de se positionner dans sa conformation active. L'hélice occuperait ainsi une position empêchant les co-activateurs de se recruter mais induirait par contre une conformation propice à une interaction des molécules co-répressives (Xu & Lambert 2003).

Figure 8 : Structure tertiaire du domaine de liaison du ligand du récepteur de la progestérone lié à un agoniste



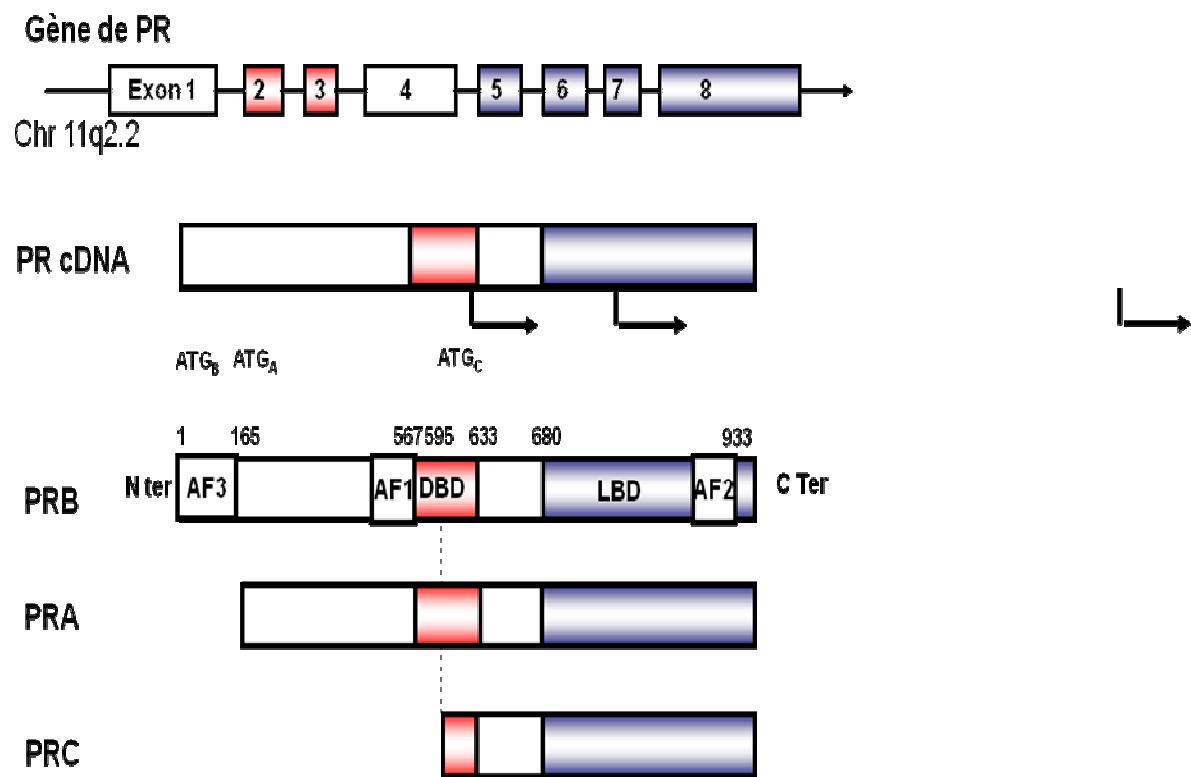
Le positionnement d'un agoniste dans la poche hydrophobe de liaison du ligand d'un récepteur stéroïdien induit un repli de l'hélice H12 (en vert) dans une position propice à l'interaction avec des coactivateurs et à l'activité transcriptionnelle.

(D'après SP Williams, 1998)

6. Les isoformes du Récepteur de la Progestérone (PR)

Plusieurs isoformes de PR ont été décrites dans l'espèce humaine, dont les 2 principales sont hPRA et hPRB (Clarke 1990; Taylor *et al.* 2009). La distribution tissulaire et leur fonction ne sont pas identiques (Graham & Clarke 1997; Graham & Clarke 2002). Ces isoformes sont codées par le même gène situé sur le chromosome 11. L'utilisation de 2 promoteurs distincts aboutit à la synthèse de 2 ARN(acide ribonucléique) messagers différents. L'hPRA, la forme la plus courte, ne contient pas 164 acides aminés du domaine N terminal de hPRB. L'hPRB, la forme longue, contient dans son domaine N-terminal un 3^{ème} domaine de transactivation AF3. La 3^{ème} isoforme décrite, hPRC, serait impliquée dans le déclenchement de la parturition (Taylor *et al.* 2006; Taylor *et al.* 2009). Cette isoforme de 60 kDa est tronquée en N-terminal et ne comporte qu'une partie du domaine de liaison à l'ADN (Wei *et al.* 1990). Cette isoforme ne possède pas le premier doigt de zinc et ne peut se lier à l'ADN mais a la capacité de lier la progestérone. Sa distribution est essentiellement cytoplasmique et sa fonction hypothétique serait de séquestrer la progestérone, l'empêchant de se fixer aux autres isoformes. Elle a également la possibilité de lier hPRB l'empêchant de se lier aux éléments de réponse de la progestérone induisant ainsi un effet dominant négatif sur hPRB.

Figure 9 : Les isoformes de PR : PRA, PRB , PRC



PRB semble un plus puissant activateur de la transcription que PRA (Giangrande & McDonnell 1999; Richer *et al.* 2002; Wei *et al.* 1990) probablement en raison de la présence d'un troisième domaine d'activation AF3 situé au niveau de l'extrémité N-terminale (Sartorius *et al.* 1994). PRA peut fonctionner comme un répresseur dominant sur d'autres récepteurs stéroïdiens incluant PRB et ER (récepteur des estrogènes). Ce mode d'action répresseur peut s'exprimer à la fois après liaison d'agonistes ou d'antagonistes à PRA. Un domaine inhibiteur (ID) est responsable de cette activité de répresseur et est situé au niveau de l'extrémité N-terminale de PRA. Néanmoins, cette séquence ID est également présente au niveau de PRB. Un mécanisme spécifique situé au sein de l'extrémité N-terminale jouerait un rôle suppresseur sur ID au sein de PRB. Le domaine AF3 pourrait être à l'origine de l'inhibition de ID, domaine commun aux récepteurs A et B (Leonhardt *et al.* 2003).

Les fonctions spécifiques de PRA et PRB ont pu être caractérisées par les modèles murins après ablation sélective de PRA ou PRB.

L'absence de PRA contribue à un phénotype caractérisé par une infertilité, une hyperplasie endométriale, une anovulation, des anomalies ovariennes en présence d'une réponse normale de la glande mammaire à la progestérone.

L'ablation sélective de PRB ne modifie pas la réponse utérine à la progestérone. Les souris sont fertiles. Néanmoins, elles montrent de sévères anomalies du développement de la glande mammaire normalement induites par la grossesse (Conneely *et al.* 2003; Mulac-Jericevic & Conneely 2004)

Si PRB joue un rôle essentiel et prépondérant, en l'absence de ligand, une majorité des gènes sont régulés *in vitro* par l'isoforme PRA (Jacobsen *et al.* 2005). Le rapport PRA/PRB varie dans différentes conditions physiologiques et pathologiques. La réponse au ligand, qu'il soit agoniste ou antagoniste, est influencée par la concentration cellulaire des différentes isoformes et probablement aussi des différents co-activateurs et co-répresseurs (Mote *et al.* 2002; Sartorius *et al.* 2003).

7. Les Modulateurs Sélectifs du Récepteur de la Progestérone (SPRMs)

- *Intérêt du développement des SPRMs*

Depuis une cinquantaine d'années, de nombreux progestatifs ont été synthétisés. Cette classe pharmacologique a été développée dans le domaine de la contraception, en gynécologie fonctionnelle et dans le traitement de la ménopause. Néanmoins, outre les saignements indésirables observés sous contraception progestative, ces molécules sont accompagnées d'effets indésirables incluant changement d'humeur, dépression, inconfort abdominal (Sitruk-Ware 2004). Certains progestatifs synthétiques associés aux estrogènes dans le traitement de la ménopause ont montré des effets délétères sur le sein et sur le système cardiovasculaire (Beral 2003; Rossouw *et al.* 2002).

Le développement des stéroïdes se tourne depuis quelques années vers une nouvelle famille : les modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone.

Depuis la mise au point de la mifépristone (Philibert 1981), la famille s'est agrandie et est constituée de ligands de PR possédant un spectre d'activité allant de l'antagoniste pur (PA) à des molécules aux effets mixtes agonistes/antagonistes.

Le SPRM idéal éviterait l'administration de progestatif à la patiente ménopausée non hystérectomisée, présenterait des effets antiprolifératifs endométriaux et mammaires tout en maintenant les effets protecteurs des estrogènes au niveau osseux et cardiovasculaire. En contraception, il permettrait un contrôle endométrial optimal sans inhiber la production d'estrogènes endogènes. Il serait dénué des effets neurologiques indésirables des progestatifs et pourrait contrôler les pathologies gynécologiques hormonosensibles tels les fibromes utérins et l'endométriose.

- *Définition des SPRMs*

L'activité de PR peut être inhibée par des molécules stéroïdiennes ou non stéroïdiennes que sont les antagonistes de PR. Le chef de file des antagonistes stéroïdiens est la mifépristone ou RU 486. Cette molécule a été développée largement dans le domaine de la gynécologie et de l'obstétrique ces dernières années (Pintiaux *et al.* 2009).

Les différents ligands du récepteur de la progestérone peuvent entraîner tout un spectre d'activités allant de l'agoniste pur à l'antagoniste en passant par des activités mixtes.

Les modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone (SPRMs) constituent une famille de molécules possédant des propriétés mixtes agonistes/antagonistes en fonction du type cellulaire, des promoteurs des gènes et des voies de signalisation (Spitz 2003).

- *Mécanismes d'Action des SPRMs*

Les antagonistes de PR empêchent les interactions de PR avec les co-activateurs et permettent le recrutement de co-répresseurs comme le NCoR (co-répresseur nucléaire) et le SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone). Lors de la liaison d'une molécule agoniste à PR, celle-ci réduit la possibilité d'action des co-répresseurs. Le rapport entre les co-activateurs et les co-répresseurs détermine le pouvoir agoniste, antagoniste ou mixte du ligand de PR. Par exemple, l'onapristone (ZK 98299) induit une association avec les co-répresseurs NCoR et SMRT plus puissante que ne le fait la mifépristone et ne permet pas le recrutement des protéines co-activatrices. L'onapristone est classé comme un antagoniste pur de PR contrairement à la mifépristone. La mifépristone modifie la conformation de l'extrémité C-terminale de PR qui inactive AF2 et ne permet pas l'interaction avec les SRCs (Onate *et al.* 1995). La mifépristone déplaçant l'hélice 12, altère la conformation de la poche hydrophobe nécessaire à la fixation des coactivateurs à AF2 (Tanenbaum *et al.* 1998). Les SPRMs permettraient le recrutement à la fois des co-activateurs et des co-répresseurs.

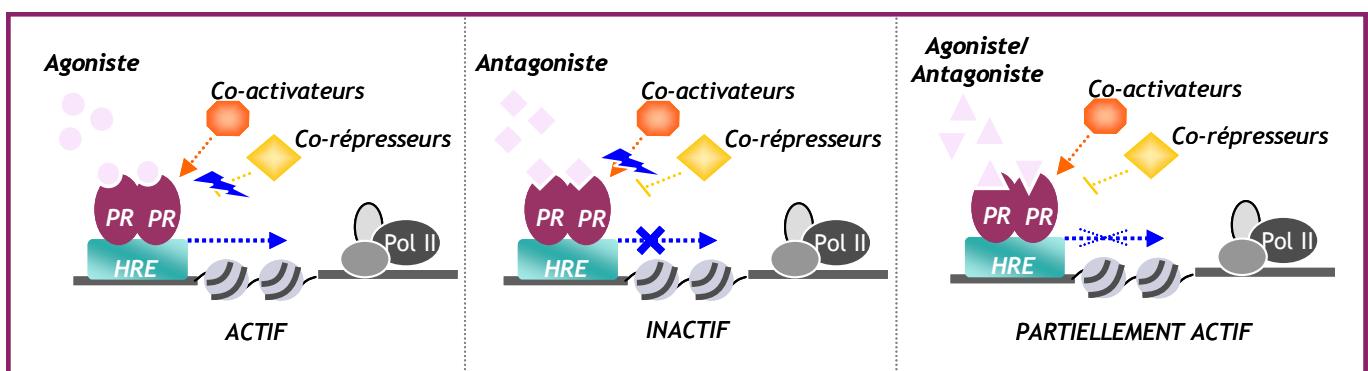
Dans la plupart des conditions, l'activité transcriptionnelle dépendante de l'activation des récepteurs stéroïdiens nécessite une synergie fonctionnelle entre AF-1 et AF-2 (Kastner *et al.* 1990). Cette synergie implique une association dépendante du ligand, au sein même du récepteur entre les extrémités N et C-terminales. Le RU486 ne permet pas cette interaction (Tetel *et al.* 1999).

L'antagonisme de PR peut également se réaliser par la voie de l'hétérodimérisation des récepteurs ou par compétition pour PRE.

La mifépristone possède une affinité plus importante pour PR que la progestérone et entre en compétition avec elle pour la liaison à PR. Les contacts moléculaires semblent différents entre le LBD et la mifépristone en comparaison des contacts créés par un agoniste (Benhamou *et al.* 1992). En présence de mifépristone, les étapes d'activation de PR telles la dissociation des HSPs, la dimérisation et la liaison aux HREs, ne sont pas altérées. Le phénomène de dimérisation apparaît même renforcé en présence de mifépristone ainsi que l'association de PR à l'ADN (DeMarzo *et al.* 1992; Skafar 1993). L'onapristone permet également la fixation de PR aux HREs mais n'offre pas la même force de liaison que la mifépristone (Leonhardt &

Edwards 2002; Leonhardt *et al.* 2003). La régulation de certains gènes par les stéroïdes n'est pas dépendante de la liaison du récepteur aux HREs. Une interaction protéine-protéine au niveau du récepteur active d'autres voies d'activation des facteurs de transcription. Cette voie de régulation est le plus souvent négative. Ainsi PR va-t-il exercer une répression de l'activité de NF-kappa B, de Stat5 induit par la prolactine, de AP1 (fos/jun) (Edwards *et al.* 2000). RU486 et ZK98299 semblent se comporter comme des agonistes de PR sur des gènes cibles régulés par PR mais en présence de voies non classiques de contrôle de la transcription (Leonhardt *et al.* 2003).

Figure 10: Mécanismes d'action des ligands de PR



(D'après Chwalisz *et al.*, 2005)

- *Evaluation des propriétés progestatives/antiprogestatives d'une substance*

Le test de Mc Phail, appréciant l'activité progestative d'une substance, détermine le degré de prolifération et de transformation endométriale de la lapine prépubère imprégnée initialement par l'estradiol (Mac Phail MK, 1934). Les propriétés antiprogestatives d'une molécule peuvent être estimées en l'administrant conjointement à la progestérone. Selon cette méthode, la mifépristone, l'onapristone et le VA2914 se comportent comme des antagonistes purs et l'asoprisnil présente des propriétés mixtes (Elger *et al.* 2000).

Le maintien et l'inhibition du corps jaune chez le cochon d'Inde est une autre méthode permettant d'évaluer la propriété progestative ou non d'une substance. Dans les conditions physiologiques, la chute de la progestérone induit la sécrétion de prostaglandines PGF-2 α . Les cochons d'Inde sont traités par la substance à évaluer du 10^{ème} au 17^{ème} jour du cycle, ensuite un prélèvement sanguin mesurant le métabolite principal de PGF-2 α est réalisé. Les antagonistes de PR inhibent la sécrétion de prostaglandine PGF- 2 α utérine, inhibent la lutéolyse et prolongent la vie du corps jaune (Elger *et al.* 2000).

Une induction de menstruation précoce par des SPRMs administrés en phase lutéale chez les primates constitue également un modèle animal d'étude de l'action anti-progestative d'une substance.

L'action abortive des SPRMs peut être testée chez les cochons d'Inde gestantes traitées aux 43 et 44^{èmes} jours de gestation. Ce test a montré une action abortive de la mifépristone supérieure aux autres molécules de la famille des SPRMs.

Les études d'affinité permettent de calculer une affinité relative de liaison à PR d'une molécule testée par rapport à celle de la progestérone. L'adjonction de doses croissantes de la substance à évaluer permet de mesurer la concentration qui réduit de 50 % la liaison de la progestérone marquée à son récepteur. Des études d'affinité de récepteurs peuvent également être conduites pour les ligands des récepteurs des estrogènes, des androgènes, des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes.

L'étude des lignées cellulaires permet d'éclairer les propriétés agonistes ou antagonistes d'une même molécule en fonction du contexte cellulaire et de la dose administrée. Des lignées cellulaires exprimant une isoforme de PR et co-transfектées avec un gène rapporteur sont mises en contact avec un ligand à tester. Ainsi, le RU486 peut montrer des propriétés d'agoniste ou d'antagoniste selon la lignée cellulaire étudiée. Une action agoniste du RU 486 est observée sur les cellules T47D de cancer mammaire humain en présence d'un activateur de

la protéine kinase A ou après transfection du gène rapporteur synthétique PRE-tk-LUC (Attardi *et al.* 2002; Beck *et al.* 1993; Liu *et al.* 2002). Par contre, la mifépristone comme le VA2914 réduisent au sein des cellules T47D, l'activité de la phosphatase alcaline dépendante de la progestérone (Attardi *et al.* 2002). Dans les mêmes conditions, l'asoprisnil se comporte comme un antagoniste moins puissant que la mifépristone {Demanno, 2003 96 /id}.

Le RU486 montre des propriétés antagonistes dans la lignée des cellules HeLa après transfection du gène rapporteur PRE-tk-LUC. Les différences d'action dépendent de l'expression de co-facteurs de PR, les cellules HeLa exprimant plus de co-répresseurs NCoR et SMRT que les cellules T47D qui elles, expriment plus de co-activateurs SRC-1 (Liu *et al.* 2002).

8. *Les ligands de PR*

- *La progestérone*

La progestérone est le ligand physiologique de PR. Il est principalement synthétisé et sécrété par l'ovaire chez la femme non ménopausée. Ce stéroïde dérive du cholestérol qui, transféré dans la mitochondrie, va subir un clivage par une première enzyme située dans la membrane interne de la mitochondrie. Le transfert dans la mitochondrie s'effectue grâce à la protéine StAR (steroid acute regulatory element) (Clark *et al.* 1994). Après clivage de la chaîne latérale du cholestérol, la pregnénolone est formée (enzyme P450scc = side chain clavage). La pregnénolone est ensuite métabolisée en progestérone grâce à la 3 β hydroxystéroïde déshydrogénase. Après l'ovulation, la partie murale du follicule se réorganise pour former le corps jaune. Les capillaires du stroma prolifèrent et pénètrent dans la lame basale. Les cellules de la granulosa lutéinisées sont en mesure de produire à la fois les estrogènes et la progestérone en grande quantité et de les libérer dans la circulation grâce au réseau capillaire développé. La sécrétion de la progestérone à partir du corps jaune est sous la dépendance de la LH. En dehors de la grossesse, la durée de vie du corps jaune est de 14 jours. Son apoptose est génétiquement programmée. La chute de la progestérone est responsable du déclenchement des menstruations. En cas de grossesse, le corps jaune sera maintenu grâce à la présence d'hCG stimulant les récepteurs de la LH pendant les 3 premiers mois de grossesse. Le placenta prendra ensuite le relais hormonal.

La molécule de progestérone présente une structure caractéristique à 4 cycles comme les stéroïdes dérivés du cholestérol. Elle contient 21 atomes de carbone. Son squelette, le

cyclopentanoperhydrophenanthrène comprend une fonction cétone en C3, deux méthyles en C10 et C13, un groupe COCH₃ en C17 et une double liaison en C4.

Figure 11 A : Cyclopentanoperhydrophenanthrène

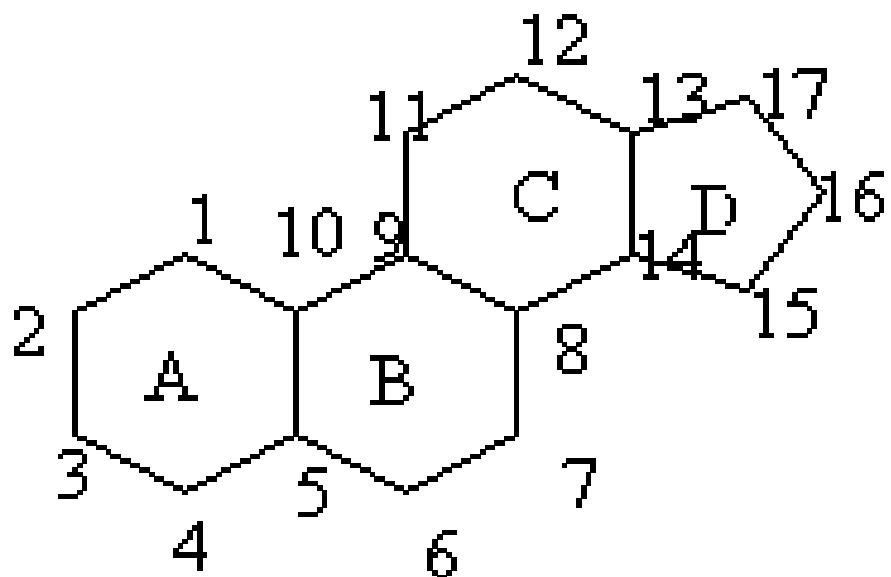
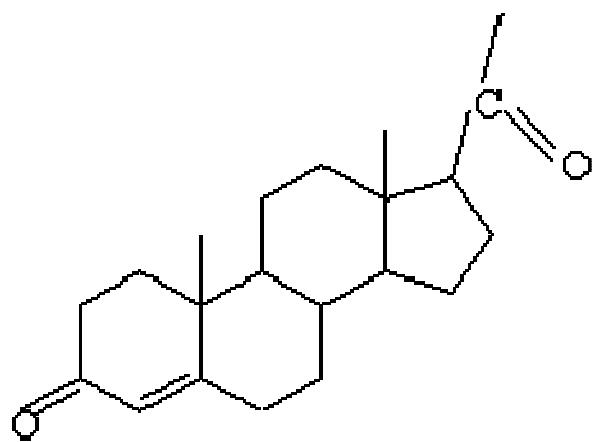


Figure 11 B : Progestérone



- *Les progestatifs*

Les progestatifs sont des analogues structurels de la progesterone, de la testostérone ou de la spironolactone (Sitruk-Ware 2004).

a) Dérivés de la progesterone

Ces dérivés contiennent un groupement COCH₃ en C17 et une double liaison en C4. Les dérivés de la progesterone sont classés en pregnanes, issus de la 17 α -hydroxyprogesterone et en norpregnanes, issus de la 19-norprogesterone. Ces dérivés présentent une activité lutéomimétique et antigonadotrope proportionnelle à la dose administrée. L'acétate de cyprotérone présente de plus une capacité de liaison au récepteur des androgènes (AR) dont elle inhibe le fonctionnement.

b) Dérivés de la 19-nortestostérone

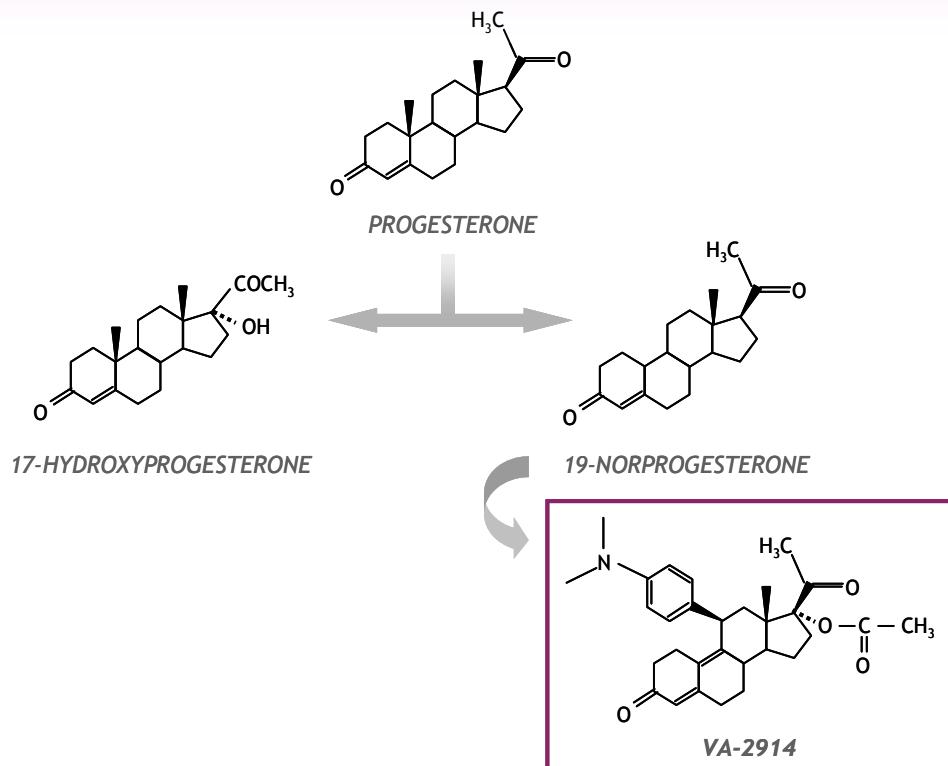
La transformation d'un androgène en progestatif se réalise par la fixation d'un radical éthinylique en position C17. Les progestatifs de cette classe sont répartis en 2 groupes : le groupe estrane représente les progestatifs dits de 1^{ère} génération qui possède une activité androgénique et le groupe gonane, les progestatifs des 2^{ème} et 3^{ème} générations dont l'activité androgénique est réduite. Ces progestatifs utilisés en contraception possèdent des effets antigonadotropes dépendant de la dose administrée (Erkkola & Landgren 2005).

c) Dérivés de la spironolactone

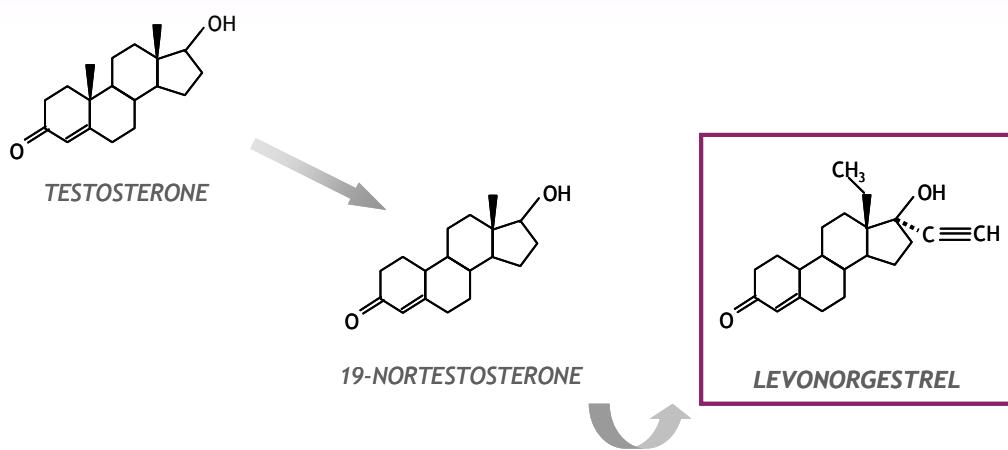
La drospirénone dérivée de la spironolactone présente des propriétés antiminéralocorticoïdes conduisant à une diminution de la rétention sodée et hydrique. Son affinité pour le récepteur des minéralcorticoïdes (MR) est cinq fois supérieure à celle de l'aldostérone. De plus la drospirénone possède une action antiandrogénique de l'ordre de 30% de celle détenue par l'acétate de cyprotérone (Sitruk-Ware 2005).

Figure 12 A et B : Les dérivés de la progesterone et de la testostérone

A. Les dérivés de la progesterone



B. Les dérivés de la testostérone



(D'après AE Schindler et al., 2003)

- *Ligands de PR à potentiel antagoniste (PAs) d'après la classification reposant sur les effets endométriaux observés lors du test de Mc Phail et sur le potentiel abortif*

a) RU486 (mifépristone)

Le RU486 est le premier antagoniste du récepteur de la progestérone décrit et développé dans le début des années 80 (Philibert 1981). Il possède des propriétés anti-glucocorticoïdes et une affinité pour GR trois fois plus importante que celle de la dexaméthasone. Il est dérivé de la 19-nortestostérone et présente une affinité pour AR quatre fois plus importante que celle de la testostérone. Un radical triphényl-éthylénique en position C11 lui confère des propriétés antiprogestatives. Son affinité pour PR est cinq fois plus importante que celle de la progestérone {Philibert, 1989 97 /id}.

Le RU486 ne présente aucune affinité pour MR ni pour ER dans l'espèce humaine (Chwalisz *et al.* 2000).

b) ZK98999 (onapristone)

L'onapristone possède une structure similaire au RU486 et est considéré comme un antagoniste pur de PR. En raison d'une toxicité hépatique importante, son développement a été interrompu (Chabbert-Buffet *et al.* 2005). Cette molécule ne possède pas d'activité estrogénique ni antiestrogénique dans l'espèce humaine (Chwalisz *et al.* 2000). Il exerce une activité antiandrogénique via sa liaison à AR. Son activité antiglucocorticoïde est moindre que celle observée pour la mifépristone (Chwalisz *et al.* 1995).

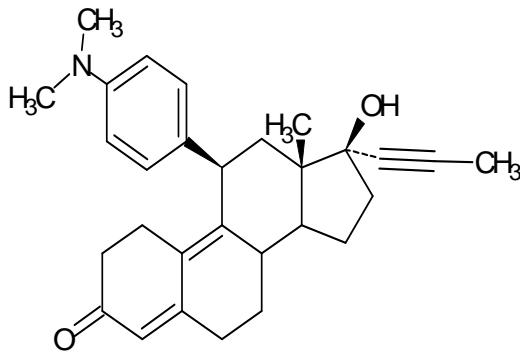
- *SPRMs en cours de développement: asoprisnil ou J867 et ulipristal ou VA2914*

Les SPRMs, dérivés stéroïdiens actuellement en cours de développement ont conservé certaines des structures des progestatifs notamment la fonction céto en C3 et le radical méthyl en C13 présents dans la molécule native de la progestérone ainsi que des fonctions substituées en C17 qui augmentent la demi-vie et l'activité biologique des composés. De plus, ils possèdent un radical encombrant en C11 qui leur confère une activité antagoniste.

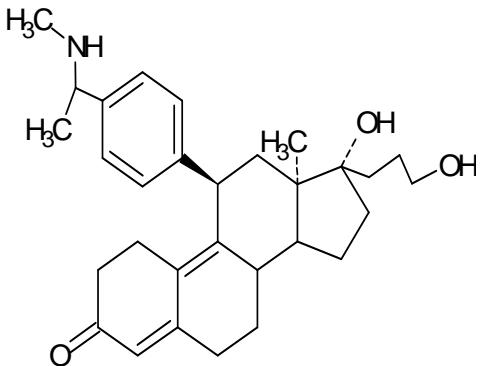
L'asoprisnil présente une forte affinité pour PR (Demanno *et al.* 2003; Schubert *et al.* 2005). Il possède une affinité modérée pour le récepteur des glucocorticoïdes (GR), faible pour AR et ne montre aucune affinité pour ER et MR.

L'ulipristal ou VA2914 dérive de la 19-norprogesterone (Gainer & Ulmann 2003). Un radical triphényl- éthylénique lui a été ajouté. Initialement, ce composé a été développé sous le nom de CDB2914 par la Contraceptive Development Branch du National Institute of Health (USA). Il possède une structure proche de celle du RU486 mais diffère par une activité antiglucocorticoïde minime (Hild *et al.* 2000) et une affinité minime pour GR (Attardi *et al.* 2004). Sa métabolisation par le foie contre-indique son utilisation en cas d'insuffisance hépatique. Les syndromes de malabsorption peuvent réduire son efficacité ainsi que les inducteurs enzymatiques qui accélèrent sa métabolisation. Après une administration orale de 1 à 200 mg, la molécule est détectable dans le sérum après 15 minutes. Le pic de concentration est obtenu 30 à 60 minutes après l'ingestion (Gainer & Ulmann 2003).

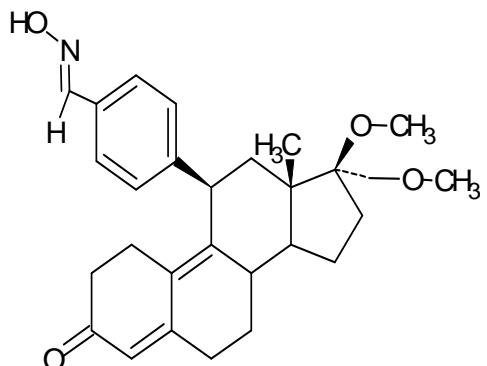
Figure 13 : Structure chimique des ligands de PR à potentiel antagoniste



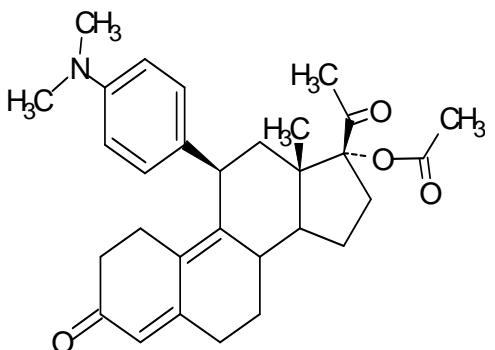
Mifepristone (RU 486)



Onapristone (ZK 98 299)



Asoprisnil (J 867)



Ulipristal (VA2914)

9. Impact gonadotrope des ligands de PR

La GnRH joue un rôle clé dans le contrôle central de la reproduction (Gharib *et al.* 1990). Elle régule la synthèse et la sécrétion des gonadotrophines après fixation à son récepteur, le GnRHR (Duval *et al.* 1997). La régulation de la sécrétion de la GnRH et celle de l'expression du GnRHR constituent des mécanismes de contrôle essentiels de l'action de la GnRH. La quantité de GnRHR au niveau des cellules pituitaires gonadotropes est influencée par les stéroïdes sexuels {Sakurai, 1997 119 /id}.

- La progestérone

La progestérone exerce un rétrocontrôle négatif sur les fonctions hypothalamo-hypophysaires tant chez l'animal que chez l'homme. La progestérone inhibe la pulsatilité de la GnRH. Le ralentissement de la pulsatilité ainsi observé en phase lutéale permet d'éviter la survenue d'un second pic ovulatoire garant de la mono-ovulation. Les stéroïdes ovariens régulent la fréquence de sécrétion de la GnRH au niveau hypothalamique et cette fréquence règle la synthèse des gonadotrophines (Marshall & Griffin 1993). Les stéroïdes sexuels agissent par l'intermédiaire des neurones à kisspeptine sur les neurones à GnRH. Ceux-ci possèdent le récepteur GPR54 dont la kisspeptine est le ligand. Contrairement aux neurones à GnRH, les neurones à kisspeptine présentent des récepteurs stéroïdiens et également celui de la leptine. Régulés non seulement par les hormones stéroïdiennes mais également par des facteurs métaboliques et environnementaux, les neurones à kisspeptine constituent une étape essentielle dans la régulation de la sécrétion de la GnRH tant à la puberté que chez l'adulte. Sous l'action de la leptine, ils synthétisent la kisspeptine. Ces neurones régulent de façon opposée l'expression du gène *Kiss-1* au sein du noyau arqué où ils l'inhibent et du noyau antéroventral périventriculaire (AVPV) où ils la stimulent.. Les neurones arqués seraient impliqués dans le rétrocontrôle négatif des stéroïdes sur la sécrétion de la GnRH et les neurones à kisspeptine du noyau AVPV réguleraient le contrôle positif des stéroïdes sur le pic préovulatoire des gonadotrophines (Dungan *et al.* 2007; Roa *et al.* 2008; Roa *et al.* 2009). L'expression du GnRHR au niveau des cellules pituitaires est réduite lors de la phase lutéale et induite après la lutéolyse (Crowder & Nett 1984). On observe une augmentation de la sensibilité hypophysaire en péri-ovulatoire à la GnRH, secondaire à une augmentation de l'expression du gène du GnRHR. Cet effet ne serait pas régulé par l'estradiol. En effet, le gène

du GnRHR ne contient pas de ERE. Par contre, le taux bas de la progestérone avant l'ovulation pourrait expliquer cette augmentation d'expression (Nett *et al.* 2002). PRE est présent au niveau du gène codant pour le GnRHR. Cette observation est en accord avec une régulation de ce gène par la progestérone.

La progestérone réduit l'activité d'un promoteur de transcription au niveau des cellules pituitaires humaines. L'addition de RU486 diminue également l'activité du promoteur de transcription. La surexpression de PRA ou PRB au niveau des cellules pituitaires réduit l'activité de ce même promoteur (Cheng *et al.* 2001). Les récepteurs de la progestérone sont exprimés au niveau des cellules pituitaires uniquement gonadotropes (Garrido-Gracia *et al.* 2008).

- *Les progestatifs*

L'effet antigonadotrope des progestatifs est bien connu (Erkkola & Landgren 2005). Ceux-ci, développés en contraception, permettent l'inhibition de la sécrétion des gonadotrophines et du pic de la LH à mi-cycle. Le taux moyen de la LH est diminué. La fréquence de sa pulsatilité est diminuée et la réponse à la GnRH exogène est réduite. L'étude *in vitro* de cellules pituitaires traitées par progestatifs montre l'inhibition de la sécrétion de la LH et non l'inhibition de la synthèse de celle-ci qui reste stockée dans les granules cytoplasmiques (Zhao *et al.* 2004).

- *Les antagonistes de PR et les SPRMs*

La **mifépristone** présente un effet inhibiteur au niveau pituitaire de la sécrétion des gonadotrophines (Sarkar 2002). Administré à la dose d'1 mg/kg/j, le RU486 permet d'inhiber le pic de la LH sans réduire le taux d'estradiol. La sécrétion basale de la LH n'est pas affectée par le traitement (Heikinheimo *et al.* 1996). La réponse pituitaire à l'administration de la GnRH n'est pas modifiée par l'administration de RU486. L'action antigonadotrope du RU486 n'apparaît donc pas médiée uniquement par l'hypophyse (Heikinheimo *et al.* 1995). Une dose quotidienne inférieure à 2 mg/j ne permet pas d'inhiber l'ovulation (Baird *et al.* 2003a; Baird *et al.* 2003a).

Le **VA2914** est une substance hautement efficace par voie orale. Une simple dose de 2 mg, administrée le jour du proestrus chez le rat, prévient l'ovulation. Par contre l'administration

sous-cutanée, jusqu'à 8 mg, ne permet pas de bloquer l'ovulation chez tous les animaux. L'action contraceptive de la molécule est observée également lors de l'administration en continu chez le rat (Reel *et al.* 1998). Chez la femme ménopausée traitée par 1 mg d'estriadiol et 50 mg de VA2914 per os durant 6 semaines, les gonadotrophines sont freinées significativement. Néanmoins, la freination de la FSH et de la LH est déjà observée dès l'utilisation de 2,5 mg de VA2914 (Christian *et al.* 2002). Les propriétés anti-ovulatoires du VA2914 chez la femme n'ont pas été rapportées dans la littérature avant notre étude. Celle-ci permettra d'évaluer les propriétés antigonadotropes éventuelles de la molécule à 3 dosages différents.

L'**asoprisnil**, 11 β -benzaldoxime SPRM, a été sélectionné pour un développement en raison de ses propriétés progestatives, antiprolifératives au niveau de l'endomètre et pour l'absence d'activité abortive. Chez la femme non ménopausée, cette molécule a montré des propriétés freinatrices de la LH (Chwalisz *et al.* 2005).

10. Effet des ligands de PR sur l'endomètre

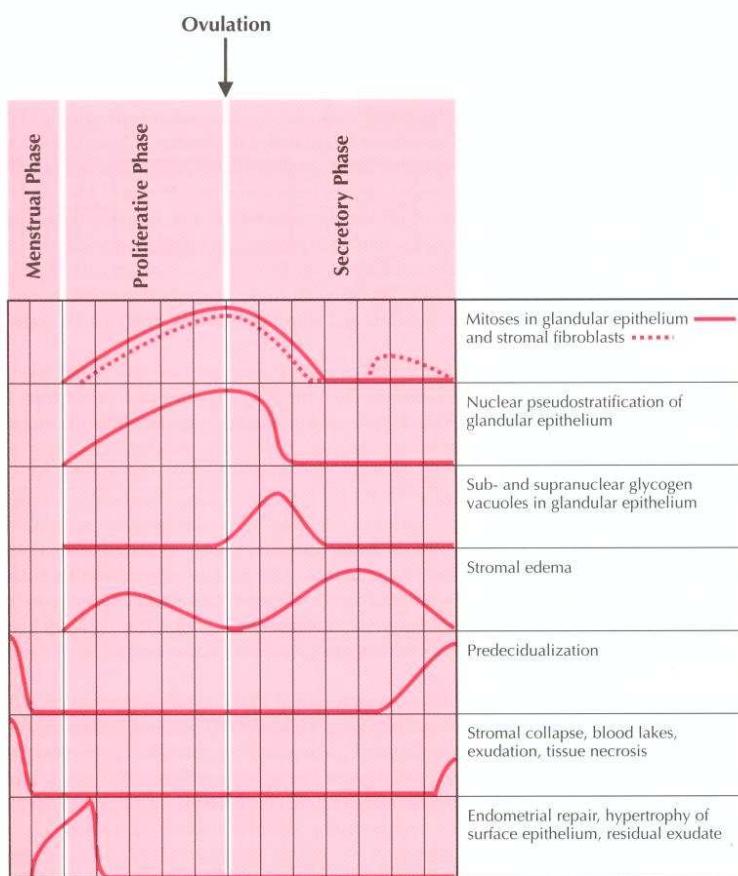
L'endomètre est une muqueuse fortement vascularisée composée de 2 zones, une fonctionnelle en contact avec la lumière utérine et une basale à partir de laquelle se reconstruit l'endomètre après la desquamation menstruelle. Sous l'épithélium de surface, on observe un plexus capillaire. Outre l'épithélium de surface, les glandes et le stroma, l'endomètre contient un nombre non négligeable de cellules inflammatoires qui peuvent atteindre 40 % du contenu cellulaire lors de la menstruation (Salamonsen & Woolley 1999).

- *La progestérone*

L'endomètre, cible principale de la **progestérone**, subit des modifications fonctionnelles durant le cycle menstruel (Massai *et al.* 1993). Les changements endométriaux sont le reflet de l'imprégnation stéroïdienne. Après la phase proliférative sous le contrôle de l'estriadiol, l'endomètre présente une phase sécrétatoire sous le contrôle de la progestérone produite par le corps jaune. Durant cette phase, les glandes deviennent tortueuses, s'élargissent et se dilatent. Les cellules épithéliales des structures glandulaires s'hypertrophiennent. Les sécrétions glandulaires, riches en glycogène et glycoprotéines apparaissent dans la lumière des glandes. Les modifications histologiques observées dans l'endomètre au cours du cycle ont été décrites

par Noyes dès 1950. Ces critères histologiques permettent de dater précisément le cycle {Noyes, 1950 389 /id; Noyes, 1950 389 /id}. En fin de phase sécrétoire, la décidualisation signe la fin de la fenêtre d'implantation qui se situe entre le 20^{ème} et le 24^{ème} jour du cycle. La décidualisation est caractérisée par une transition mésenchymo-épithéliale des cellules stromales, par les modifications de la matrice extracellulaire (MEC), la sécrétion de prolactine, d'IGFBP1 (Insulin Growth Factor Binding Protein-1), de prostaglandines (PG), de cytokines et par l'invasion des cellules NK (natural killer) présentant un phénotype spécifiquement décidual (CD 56+, CD 16-) contrairement au NK systémiques qui sont CD 56- et CD 16+ (Bilinski *et al.* 2008).

Figure 14 : Critères de Noyes



(D'après Speroff, 1999)

- *Les progestatifs*

L'action endométriale des **progestatifs** dépend de la molécule, de son dosage, de sa durée et de son schéma d'administration, de la présence ou non d'estradiol. Les modifications observées vont de l'inhibition de la croissance endométriale avec décidualisation stromale et infiltration par une population cellulaire inflammatoire à une atrophie pouvant comporter des zones de nécrose tissulaire. Le traitement progestatif à long terme peut conduire à une fibrose et des calcifications endométriales réversibles à l'arrêt de la thérapeutique (Song & Fraser 1995).

Les progestatifs peuvent exercer une activité contraceptive au niveau de l'endomètre rendant celui-ci impropre à la nidation, inhibant la synthèse de PR, accroissant l'importance du stroma et réduisant le nombre de glandes ainsi que l'œdème stromal (Erkkola & Landgren 2005). Sous progestatif seul au long cours, l'endomètre apparaît fin et atrophique avec répression des récepteurs de l'œstradiol (Moyer & Felix 1998).

Un apport estrogénique persistant en l'absence de progestatif entraîne une stimulation endométriale et l'augmentation de risques d'hyperplasie. Au cours de l'étude PEPI (1996), une hyperplasie endométriale a été observée chez 60 % des patientes ménopausées, recevant des estrogènes, après trois ou quatre mois seulement suivant l'initiation du traitement. Par contre, sous traitement combiné estroprogestatif, aucune augmentation d'hyperplasie endométriale n'a été objectivée. Le problème posé par les SPRMs est l'effet antagoniste potentiel au niveau de l'endomètre soumis aux estrogènes endogènes ou exogènes. L'endomètre en présence d'estradiol non opposé par un progestatif, présente une activité mitotique dominante et une absence d'apoptose.

Lors d'un traitement combiné estroprogestatif, les modifications cycliques de l'endomètre sont remplacées par un état atrophique.

- *Les antagonistes de PR*

- a) Onapristone

L'onapristone dont le développement a été interrompu suite à une toxicité hépatique est considéré comme un antagoniste pur de PR. D'autre part, il présente des propriétés estrogéniques dans le modèle murin.

L'onapristone augmente le poids utérin chez le rat impubère, action non retrouvée chez le rat adulte. Sous onapristone, la hauteur de l'épithélium endométrial luminal est augmentée. Cette action est inhibée complètement par un anti-estrogène pur, le ICI 182780 (Bigsby & Young 1994). En outre, sous onapristone, une synthèse de l'ADN au sein de l'épithélium utérin est induite. Cet effet est inhibé par le tamoxifène. Chez le rat traité par estradiol et onapristone, l'onapristone paraît renforcer la stimulation de l'épithélium glandulaire et luminal observée sous estradiol seul. Aucun effet antiprolifératif endométrial n'est observé dans ce modèle {Chwalisz, 2000 340 /id; Chwalisz, 1998 7 /id}.

Par contre, dans un modèle d'endométriose appliqué chez le rat, un effet antiprolifératif sur l'endomètre ectopique est observé sous onapristone (Stöckemann K., 1995). L'expression de certains gènes apparaît altérée dans l'endométriose (Giudice L., 2003). Ainsi, l'expression du gène Cyr61 contrôlant l'adhésion et l'angiogenèse apparaît modifiée dans l'endométriose. Les anti-estrogènes et les anti-progestatifs réduisent l'expression de Cyr61. Cette modulation de l'expression génique est proposée comme mécanisme candidat dans le rôle thérapeutique des SPRMs dans l'endométriose.

Administrée aux doses de 2,5 et 5 mgr tous les 3 jours durant 4 à 7 cycles, l'onapristone induit une atrophie endométriale dose dépendante chez le primate non humain (Gopalkrishnan K, 2003)

L'onapristone administrée à des patientes ménopausées, à la dose de 1 ou 10 mg quotidiennement durant 56 jours combinée à 2 mg d'œstradiol oral induit une activité proliférative endométriale. Au sein de l'endomètre présentant des glandes dilatées, aucun cas d'hyperplasie n'est rapporté. La détection du Ki67 est néanmoins positive dans chaque biopsie. Aucune différence de marquage n'est observée selon le dosage utilisé (Cameron *et al.* 2003)

b) Mifepristone

Comme l'onapristone, antagoniste pur de PR, la mifepristone présente une activité abortive.

Le modèle du cochon d'Inde permet de quantifier une éventuelle activité agoniste de PR résiduelle. Dans ce modèle, la mifepristone ne montre pas d'activité anti-lutéolytique.

Par contre, dans l'espèce humaine cette molécule ne montre pas d'action agoniste au niveau de l'utérus.

Comme l'onapristone, elle présenterait une activité estrogénique via ER chez le rat immature (Dibbs *et al.* 1995). Cet effet est néanmoins controversé (Bigsby & Young 1994).

Dans l'espèce humaine la mifépristone ne se lierait pas à ER et inhibe la prolifération endométriale chez les patientes soumises aux estrogènes endogènes (Brenner *et al.* 2002; Narvekar *et al.* 2004).

L'administration chronique à faible dose augmente l'expression de ER et AR et inhibe l'expression de PR (Narvekar *et al.* 2004) alors que la combinaison d'estradiol et de mifepristone accroît l'expression de ER, PR et AR au niveau de l'épithélium glandulaire et du stroma (Brenner *et al.* 2002).

L'endomètre observé chez les patientes soumises à la mifepristone à des dosages inférieurs à 2 mg quotidiennement, révèle un aspect soit inchangé, soit déstructuré (Batista *et al.* 1992; Croxatto *et al.* 1998; Marions *et al.* 1998).

Administrée à la dose de 2 à 10 mg quotidiennement, la mifépristone induit une déstructuration architecturale de l'endomètre : apparition de glandes dilatées kystiques, activité mitotique réduite et absence de transformation sécrétoire. Il est à remarquer que l'inhibition de l'ovulation est observée chez la majorité des patientes sous 5 mg (Baird *et al.* 2003b; Croxatto *et al.* 1993; Ledger *et al.* 1992; Narvekar *et al.* 2004). L'endomètre de patientes exposées à 50 mg par jour pendant 6 mois révèle un caractère prolifératif et sécrétoire. L'immunodétection de ER et PR au niveau des glandes reste inchangée par rapport aux contrôles dont l'endomètre a été prélevé en phase folliculaire. Par contre, la détection de ER au sein du stroma est augmentée. Les observations réalisées sont en faveur d'une imprégnation estrogénique non opposée par un effet progestatif (Murphy *et al.* 1995).

Sous 10 mg de mifepristone administrés quotidiennement pendant 6 mois, une hyperplasie simple de l'endomètre est décrite chez 14 % des patientes traitées pour fibrome utérin (Chwalisz *et al.* 2005). La révision de ces cas a confirmé l'hyperplasie simple et a converti le diagnostic en glandes endométriales kystiques. Sous 5 à 10 mg de mifépristone, le même groupe rapportait un taux de 28 % d'hyperplasie simple (Eisinger *et al.* 2003).

Chez une patiente soumise à 400 mg par jour de mifepristone en cures de 6 mois répétées pour un syndrome de Cushing, une hyperplasie simple de l'endomètre avec élargissement utérin global a été décrite. Cette anomalie s'est résolue spontanément lors de l'arrêt du traitement (Newfield *et al.* 2001).

Sous 200 mg de mifepristone administrée quotidiennement et au long cours dans le cadre de méningiomes inopérables, 14 % d'hyperplasies endométriales ont été décrites, 8 % d'hyperplasies accompagnées de polypes et 2,6 % de polypes seuls (Horne & Blithe 2007).

Utilisée à hautes doses, la mifepristone manifeste des propriétés anti-progestatives et anti-glucocorticoïdes. Le taux de l'hormone adénocorticotrope (ACTH) est augmenté pouvant expliquer une stimulation de la surrénale et un accroissement de la production d'estradiol. Le phénomène d'hyperplasie endométriale rapporté est la plupart du temps réversible et surévalué à la lumière de la nouvelle classification anatomopathologique définie récemment par les experts dans ce domaine (Horne & Blithe 2007).

Les effets des PAs observés au sein de l'endomètre dans l'espèce humaine ou chez les autres primates semblent bien différents de ceux rapportés dans les modèles murins. Chez le primate, les PAs induisent une inhibition de la prolifération endométriale en bloquant l'action de la progestérone, inhibant la croissance et la différenciation observées normalement en phase sécrétoire et inhibant la croissance des artères spiralées. D'autre part, ils inhibent l'activité mitotique au cours de la phase proliférative bloquant la croissance glandulaire, stromale et artérielle estrogénodépendante. Par contre, chez le rat ou le cochon d'Inde, les PAs n'inhibent pas la croissance utérine estrogénodépendante, ni la prolifération endométriale. Une physiologie différente pourrait expliquer ces effets variables observés sur l'utérus de primate et de murin. Par contre, chez la lapine, les effets inhibiteurs des PAs présentent une certaine similitude avec les observations réalisées chez le primate. Les PAs inhibent la croissance endométriale. Par contre, ils stimulent la croissance du myomètre et du stroma endométrial chez la lapine. A nouveau, des différences interespèces sont observées. Les données issues de ces modèles animaux ne sont donc pas directement transposables à l'espèce humaine (Chwalisz *et al.* 2000).

- *Les SPRMs*

a) VA2914

Le VA2914 apparaît un puissant antagoniste de la progestérone selon le test de McPhail. La prolifération des glandes endométriales observées sous progestérone chez la lapine immature prétraitée par estradiol est inhibée de façon dose dépendante par le VA2914 (Hild *et al.* 2000). Chez la patiente ménopausée, traitée par estradiol oral à raison d'1 mg par jour combiné soit à de la médroxyprogesterone 2,5 mg soit à 5 ou 10 mg de VA2914 par voie orale pendant 6 semaines, les biopsies endométriales révèlent des images d'hyperplasie dans le groupe VA2914 (11/20 patientes). Aucune hyperplasie n'est décrite sous progestatif (Christian *et al.* 2002). Chez une patiente sur 12 soumises au VA2914 (10 mg) durant 3 cycles dans le cadre de l'évaluation de cette molécule sur les myomes, un aspect endométrial kystique sans atypie est rapporté (Levens *et al.* 2008).

b) Asoprisnil

Cette molécule possède une sélectivité endométriale chez le primate humain et non humain. Elle présente des effets antiprolifératifs endométriaux importants sans propriété abortive. L'asoprisnil se comporte en agoniste en l'absence de progestérone. Cet effet serait induit par les modifications spatiales de l'extrémité carboxy-terminale de PR permettant le recrutement de coactivateurs. En présence de progestérone, l'asoprisnil se comporte en antagoniste, effet qui peut s'expliquer par un phénomène d'hétérodimérisation de PR lié à différents ligands (Leonhardt & Edwards 2002).

Évalué par le test de McPhail, il montre des effets agonistes mais limités en comparaison de l'effet engendré par la progestérone. En présence de progestérone, l'effet antagoniste reste inférieur à celui observé sous mifépristone. Chez le cochon d'Inde non gravide, il agit comme un agoniste, permettant la transformation sécrétoire de l'endomètre (Elger *et al.* 2000).

Chez le primate non humain, un aspect endométrial non prolifératif est observé en présence d'une aménorrhée et d'une estradiolémie compatible avec une phase folliculaire. À haute dose, l'asoprisnil administré durant 39 semaines induit une atrophie endométriale. Les marqueurs de prolifération (Ki-67 et histones phosphorylées) sont réprimés même lors de l'utilisation de la molécule à faibles doses (Brenner & Slayden 2005).

Les endomètres de patientes soumises à l'asoprisnil montrent une désynchronisation entre l'épithélium endométrial et le stroma : faible transformation sécrétoire et peu ou pas de mitoses au sein des glandes, effet sur le stroma variable allant de la compaction aux modifications prédictives focales. Les parois artériolaires développent un épaississement particulier (Chwalisz *et al.* 2005; Williams *et al.* 2007). Dans l'endomètre fin soumis à

l’asoprisnil, il n’est pas toujours possible de différencier la zone basale de la fonctionnelle (Williams *et al.* 2007).

c) Autres : SPRMs non stéroïdiens

Ceux-ci sont à l'aube de leur développement. Peu d'études à ce jour sont publiées dans ce domaine. Le composé dit "25" un analogue non stéroïdien benzimidazole-2-thione inhibe chez le rat immature la croissance endométriale induite par les estrogènes. Par contre, il ne possèderait pas d'action freinatrice sur la LH chez le rat castré (Dong *et al.* 2004). Une série de molécules 5-benylidene-1,2-dihydrochromeno(3,4-f)quinolines possédant une très forte affinité pour PR et une sélectivité tissulaire (utérus versus sein) est à l'étude (Zhi *et al.* 2003).

d) Nouveaux critères d'évaluation des endomètres sous SPRMs

L'utilisation à long terme des SPRMs et des PAs a permis d'observer des modifications endométriales inhabituelles par rapport aux critères classiques d'évaluation (OMS). L'utilisation de ces molécules ne conduit pas aux aspects endométriaux observés sous estrogènes seuls où l'activité mitotique et l'absence d'apoptose sont prévalentes. Dans le développement des SPRMs et dans celui de la mifépristone, des hyperplasies endométriales ont été rapportées (Baird *et al.* 2003b; Chwalisz *et al.* 2005; Eisinger *et al.* 2003; Newfield *et al.* 2001; Baird *et al.* 2003b). La révision des lames d'endomètres soumis à différents SPRMs et PAs a conclu à un excès de diagnostics d'hyperplasie et à l'absence d'éléments réellement inquiétants pour la sécurité endométriale (Horne & Blithe 2007). Pour répondre aux exigences de la FDA (seuil de sécurité endométriale : 1% ou moins d'hyperplasie selon les critères de l'OMS) la poursuite des études sur l'endomètre soumis aux SPRMs est essentielle ainsi que l'utilisation d'autres techniques d'évaluation. Dans ce cadre, la recherche d'un marqueur comme le PTEN, gène suppresseur de tumeur, peut trouver sa place (Mutter 2000).

Selon les diverses observations réalisées sur les endomètres soumis aux SPRMs, un aspect particulier émerge, comportant une désynchronisation entre le stroma et les glandes, la présence possible de dilatations glandulaires kystiques et la coexistence au sein d'une même glande d'aspects mitotique, apoptotique et sécrétoire (Mutter *et al.* 2008). Le terme PAEC, c'est-à-dire PRM Associated Endometrial Changes permet de regrouper les observations réalisées jusqu'à présent sur les endomètres soumis à cette nouvelle classe thérapeutique (Mutter *et al.* 2008).

11. Mécanismes Impliqués dans les Saignements Endométriaux Observés sous Progestatifs

Sous traitement progestatif, l'endomètre va subir des modifications qui vont dépendre du type de progestatif, de son dosage mais également des stéroïdes endogènes qui sont sécrétés en fonction du pouvoir antigenadotrope de la molécule progestative en présence.

Sous DIU-LNG qui délivre au sein de l'endomètre une concentration de LNG 1000 fois supérieure à celle observée lors d'une prise orale ou sous-cutanée, les glandes apparaissent atrophiques, le stroma décidualisé et la vascularisation altérée (Critchley *et al.* 1998; Ferenczy 2003; Nisolle & Foidart 2009; Critchley *et al.* 1998; Ferenczy 2003). L'expression de ER et de PR est réduite, ainsi que celle de AR (Burton *et al.* 2003; Galant *et al.* 2004; Jones *et al.* 2000; Zhu *et al.* 1999). La vascularisation endométriale est également fortement modifiée sous DIU-LNG avec augmentation de la densité et altération de la maturation vasculaire (Nisolle & Foidart 2009; Stephanie *et al.* 2007). Ce déficit de maturation vasculaire s'accompagne d'une réduction de péricytes (Stephanie *et al.* 2007). L'exposition de l'endomètre au DIU-LNG pendant 1 à 3 mois entraîne un accroissement du nombre de petits vaisseaux immatures de façon très significative. La surface occupée par les éléments vasculaires dans l'endomètre augmente de façon importante avec le temps (Stephanie *et al.* 2007). Les effets du LNG (accroissement de la densité vasculaire, de la surface vasculaire dans l'endomètre, altération de la maturation vasculaire) permettent d'expliquer les saignements indésirables observés durant les premiers mois d'exposition à cette molécule qu'elle soit administrée sous forme d'implant sous cutané ou associée à un DIU (Hickey *et al.* 1999b; Rogers *et al.* 1993; Stephanie *et al.* 2007; Stephanie *et al.* 2007; Rogers *et al.* 2000; Stephanie *et al.* 2007).

Les hypothèses explicatives des saignements endométriaux ne sont pas univoques et impliquent l'expression des récepteurs stéroïdiens dans l'endomètre (PR, ER, AR), l'introcrinologie endométriale, les altérations de la membrane basale et de la MEC, l'hypoxie, la génération de radicaux libres ainsi que les perturbations de l'angiogenèse (Critchley *et al.* 2006; Krikun *et al.* 2002; Lebovic *et al.* 2000).

- *Modulation de l'expression des récepteurs stéroïdiens dans l'endomètre*
(PR, ER, AR, GR)

a) Expression endométriale de PR

L'expression de PR dans l'endomètre est régulée par les estrogènes qui l'induisent et par la progestérone qui la réprime (Garcia *et al.* 1988; Mote *et al.* 1999). Elle varie selon les compartiments cellulaires et la période du cycle. Elle est modulée essentiellement dans le compartiment glandulaire, l'expression dans le stroma étant stable au cours du cycle (Critchley *et al.* 1993; Garcia *et al.* 1988; Lessey *et al.* 1988). Au niveau de la région basale de l'endomètre, PR est exprimé dans les glandes et le stroma tout au long du cycle ; par contre au sein des glandes de la partie fonctionnelle de l'endomètre, son expression décroît de la phase proliférative à la phase sécrétoire.

L'expression des isoformes paraît également régulée différemment selon le compartiment cellulaire et la période du cycle.

L'expression de PRB dans le stroma de la zone fonctionnelle décroît de la phase proliférative à la phase sécrétoire pour atteindre un taux quasi indétectable en fin de cycle (Mangal *et al.* 1997; Wang *et al.* 1998). L'expression de PRA est persistante dans le stroma tout au long du cycle au niveau de la zone fonctionnelle. Au niveau du compartiment épithelial de la zone fonctionnelle, l'expression des 2 isoformes diminue durant la phase sécrétoire. La freinatation plus importante de l'expression de PRB par la progestérone expliquerait la régulation différente de l'expression de ces 2 isoformes.

Le taux d'expression de PR est élevé dans les cellules stromales à proximité des vaisseaux utérins (Perrot-Applanat *et al.* 1988; Perrot-Applanat *et al.* 1994). PR est observé dans les parois vasculaires endométriales : absent au niveau de l'endothélium des vaisseaux endométriaux humains, il est par contre exprimé au niveau des cellules stromales périvasculaires (Critchley *et al.* 2001; Critchley *et al.* 2006; Perrot-Applanat *et al.* 1988).

Il existe cependant une controverse quant à l'absence de PR au niveau des cellules endothéliales endométriales humaines (Iruela-Arispe *et al.* 1999; Vazquez *et al.* 1999).

b) Expression endométriale de ER

Les estrogènes jouent un rôle fondamental au niveau de la fonction endométriale dont ils contrôlent la prolifération et le développement vasculaire (Ferenczy *et al.* 1983; Smith 2001).

Ils contrôlent de nombreux gènes au niveau de l'endomètre et induisent l'expression de PR, de ER, du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de la lactoferrine (Lessey *et al.* 1988; Meduri *et al.* 2000; Teng *et al.* 2002). Le VEGF est un médiateur clé local de la néovascularisation de la zone fonctionnelle de l'endomètre. Son ARNm est accru dès le milieu de la phase proliférative (Shifren *et al.* 1996).

L'action des estrogènes est médiée par les récepteurs ER α et ER β codés par 2 gènes distincts (Kuiper *et al.* 1996; Mosselman *et al.* 1996). Le rôle de ER β au niveau utérin n'est pas encore déterminé. La forme la plus abondamment exprimée dans l'endomètre est ER α (Fujimoto *et al.* 1999; Matsuzaki *et al.* 1999). La prolifération endométriale est dépendante de ER α (Couse *et al.* 2000). L'expression de ER α est accrue dans les compartiments glandulaire et stromal de la couche fonctionnelle en phase proliférative et décroît lors de la phase sécrétive, sous le contrôle de la progestérone. Au niveau de la couche basale, ER α est exprimé dans le compartiment glandulaire et stromal tout au long du cycle (Garcia *et al.* 1988; Snijders *et al.* 1992). ER β est détecté au sein de l'endothélium et des cellules musculaires lisses des vaisseaux endométriaux. Jusqu'à présent, ER α , PR et AR n'ont pu être mis en évidence au sein de ces structures. Par contre, ils sont exprimés fortement au niveau des cellules du stroma périvasculaire. Leur expression est accrue par les estrogènes et réprimée par la progestérone au niveau de la couche fonctionnelle de l'endomètre. Selon ces observations, les phénomènes tels l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire devraient être médiés par ER β alors que l'influence des progestatifs et des androgènes ne se réalisera qu'indirectement, à partir des cellules stromales périvasculaires (Critchley *et al.* 2006).

Un variant de ER β , appelé hER β cx / β 2 est obtenu par épissage alternatif de l'exon 8 de ER β (ER β 1) (Ogawa *et al.* 1998). Tout au long du cycle menstruel, l'immuno-expression de ER β 1 au niveau endométrial apparaît stable. Au contraire, l'expression de hER β cx / β 2 apparaît réduite dans les glandes de la zone fonctionnelle au milieu de la phase sécrétive. Cette inhibition de l'expression n'est pas constatée au niveau de la couche basale endométriale. Des études *in vitro* ont montré la possibilité d'observer des homodimères ER α -ER α ou ER β -ER β ou des hétérodimères ER α -ER β au niveau du même type cellulaire {Cowley, 1997 407 /id}. La co-expression de ER β cx / β 2, dans un type cellulaire exprimant ER β 1 et/ou ER α , devrait permettre une modulation importante des effets estrogéniques au niveau de l'endomètre et accroît encore la complexité des mécanismes régissant la fonction endométriale (Critchley *et al.* 2002).

c) Expression endométriale de AR

AR est exprimé au niveau de l'endomètre et principalement au niveau des cellules stromales. L'expression de AR est augmentée par l'estradiol et inhibée par la progesterone. Les antagonistes de la progesterone augmentent l'expression de AR dans le stroma et l'induisent dans les glandes endométriales (Slayden *et al.* 2001; Narvekar *et al.* 2004). L'administration d'androgènes induit une atrophie endométriale. Celle-ci peut être expliquée par l'effet inhibiteur des androgènes sur l'expression des récepteurs ER et PR (Hirst *et al.* 1992). Les effets antiprolifératifs induits par les inhibiteurs du récepteur de la progesterone semblent médiés par AR. En effet, l'administration de flutamide inhibe l'effet induit par les antagonistes de PR sur l'épaisseur endométriale, sur l'effet de compaction du stroma et sur l'index mitotique (Slayden & Brenner 2004). L'administration d'antagonistes du récepteur de la progesterone inhibe l'activité mitotique estrogénodépendante au niveau des glandes endométriales. Cet effet paradoxal (les antagonistes du récepteur de la progesterone ne se lient pas aux récepteurs des estrogènes) a été appelé "effet anti-estrogénique fonctionnel non compétitif". L'activation du récepteur des androgènes semble le mécanisme clé de cette inhibition de la prolifération en présence d'estrogènes (Brenner & Slayden 2005).

d) Expression endométriale de GR

GR est exprimé au niveau endométrial dans le compartiment stromal incluant les cellules lymphoïdes et endothéliales {Bamberger, 2001 356 /id; Henderson, 2003 357 /id} et ce indépendamment de la phase du cycle {Vienonen, 2004 358 /id}. Ce récepteur est également exprimé par les cellules uNK (Cellule "Natural Killer" utérine) (Henderson *et al.* 2003). Ce récepteur pourrait avoir un rôle dans l'implantation, la prolifération cellulaire endométriale, l'apoptose et le remodelage endométrial {Jabbour, 2006 348 /id} . Une expression endométriale augmentée de GR est observée chez les patientes ménopausées mètrorragiques sous traitement hormonal substitutif estroprogestatif (Vani *et al.* 2008).

- *Intracrinologie endométriale*

L'action d'un récepteur stéroïdien est dépendante de la disponibilité des ligands et de la nature de ceux-ci. Certains systèmes enzymatiques, présents dans l'endomètre, permettent la transformation de stéroïdes, modifiant ainsi leur puissance. La famille de la 17-β-

hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β HSD) comprend 8 membres dont 6 isoformes ont été caractérisées dans l'espèce humaine. Le rôle de la 17 β HSD de type 2 est de transformer l'œstradiol en estrone, la testostérone en androsténédione et la 20 α dihydroprogesterone (inactive) en progesterone. Lors de la phase sécrétoire, la 17 β HSD2 est induite par la progesterone (Casey *et al.* 1994; Mustonen *et al.* 1998). Cet enzyme va décroître lorsque la concentration de progesterone diminue ou lors d'un traitement par un antagoniste du récepteur de la progesterone (Maentausta *et al.* 1993; Mustonen *et al.* 1998). Le LNG, qui peut lier à la fois AR et PR, induit l'expression de la 17 β HSD2 mais cette expression n'est pas stable et diminue avec le temps. Ainsi, lors de la mise en place du DIU-LNG, on observe des hauts taux de 17 β HSD2 endométriaux dès le premier mois de traitement. Trois mois après l'insertion du dispositif, le taux de 17 β HSD2 va décroître dans l'épithélium glandulaire. De concert, on observe une diminution de l'expression de PR au cours du temps. Ainsi, cet enzyme convertissant l'estradiol en un estrogène moins puissant, l'estrone, peut participer aux saignements fonctionnels observés pendant les premiers mois d'utilisation du DIU-LNG, établissant une situation intracellulaire de "déficience estrogénique fonctionnelle" (Critchley *et al.* 2006). Les antagonistes du récepteur de la progesterone sont à l'étude dans différents essais cliniques visant à inhiber les saignements sous progestatif seul. Les antagonistes de PR augmentent l'expression de ER et réduisent l'expression de la 17 β HSD2 (Critchley *et al.* 2006).

- *Altérations de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire : rôle des métalloprotéases matricielles (MMPs) et de leurs inhibiteurs physiologiques (TIMPs)*

a) Les métalloprotéases

La régulation des métalloprotéases matricielles et de leurs inhibiteurs représente un mécanisme clé du contrôle des saignements de l'endomètre (Galant *et al.* 2000; Galant *et al.* 2004; Skinner *et al.* 1999; Vincent *et al.* 1999). L'augmentation d'expression et l'activation des MMPs apparaissent comme des éléments clés du déclenchement du processus de la menstruation (Kokorine *et al.* 1996; Salamonsen *et al.* 2002). Synthétisées sous forme inactive, elles sont soit sécrétées soit exprimées sous forme de protéines transmembranaires. Elles sont contrôlées par des inhibiteurs tissulaires spécifiques, les TIMPs et sont capables d'hydrolyser la MEC et des protéines non matricielles comme les molécules d'adhésion, des

facteurs de croissance et des cytokines. La famille des MMPs est divisée en 4 groupes : les collagénases, les stromélysines, les gélatinases et les MMPs de type membranaire (Woessner, Jr. 1999). L'expression des MMPs varie au cours des différentes phases du cycle menstruel. L'expression de la MMP-1 (collagénase-1), MMP-2 (gélatinase A), MMP-3 (stromélysine- 1), MMP-7 (matrilysine), MMP-9 (gélatinase B) et MMP-12 (métalloélastase) est accrue durant la menstruation alors que celle d'autres MMPs comme la 26 (endométase) est exacerbée durant la phase proliférative (Goffin *et al.* 2003; Henriet *et al.* 2002). Durant la phase sécratoire sous l'action de la progestérone, l'expression et l'activité des MMPs dans l'endomètre est maintenue quiescente. L'expérimentation animale confirme l'importance de la chute de la progestérone dans le déclenchement de la menstruation et dans la régulation des MMPs et ce, quel que soit le taux d'estradiol (Rudolph-Owen *et al.* 1998). Au milieu de la phase sécratoire, l'utilisation de mifépristone est accompagnée d'une importante altération de la MEC de l'endomètre et de saignements abondants (Swahn *et al.* 1990). Sous DIU-LNG, l'expression de la MMP-9 est augmentée dans les cellules stromales, épithéliales et endothéliales (Skinner *et al.* 1999). Celle-ci est également augmentée chez les utilisatrices de MPA à titre contraceptif (Vincent *et al.* 2002). La MMP-3 paraît particulièrement exprimée chez les patientes présentant des saignements sous DIU-LNG (Oliveira-Ribeiro *et al.* 2004) ou sous Norplant® (Marbaix *et al.* 2000). La synthèse de l'ARNm de la MMP-1 est localisée au sein des zones de dégradation de la MEC endométriale chez les utilisatrices de Norplant® (Galant *et al.* 2000).

Les cellules inflammatoires peuvent également contribuer à l'expression des MMPs. Outre les cellules épithéliales et stromales, les cellules endométriales inflammatoires sont à l'origine de l'induction et de l'activation de MMPs (Salamonsen *et al.* 2000). Le rôle des cellules inflammatoires dans l'augmentation de la MMP-1 et de la MMP-9 a été démontré chez les utilisatrices du DIU-LNG et les utilisatrices de Norplant® (Milne *et al.* 2001; Vincent *et al.* 1999). Il a été observé une augmentation de l'ARNm des MMP-1, 2, 3, 7, 9 et 12 dans l'endomètre d'utilisatrices du DIU-LNG à court terme (1 mois après l'insertion du dispositif) alors que le taux d'ARNm de la MMP-26 apparaissait diminué. Après 6 mois d'utilisation du DIU-LNG, on observe une diminution de l'expression des MMPs-2 et 3 dans l'endomètre. La technique de zymographie a permis de confirmer l'activité de la MMP-2 plus souvent présente chez les utilisatrices du DIU-LNG. Ces profils d'expression, variant en fonction du temps, peuvent contribuer à expliquer les différences observées dans le profil de saignement des utilisatrices du LNG au cours du temps d'exposition {Labied, 2009 186 /id}.

Diverses cytokines participent à la régulation de l'expression des MMPs (Goldman, 2003). C'est par la voie du TGF β (transforming growth factor) que la progestérone inhibe des MMPs d'origine épithéliale et stromale permettant le maintien de l'intégrité de la MEC endométriale (Bruner *et al.* 1995). Durant le cycle menstruel, les 3 isoformes du TGF β et les 2 types de récepteurs TGF β R1 et 2 sont exprimés (Gaide Chevronnay *et al.* 2008). Les TGF β s sont des régulateurs de la prolifération cellulaire, de la différentiation et du remodelage de la MEC (Jones *et al.* 2006). L'expression de l'ARNm des TGF β -Rs apparaît stable tout au long du cycle. Par contre, les isoformes du TGF β sont exprimées différemment au cours du cycle. Le lefty-A/endometrial bleeding associated factor (EBAF), inhibiteur de la voie de signalisation du TGF β 2, augmente au cours de la phase sécrétoire pour atteindre un maximum au cours de la menstruation (Cornet *et al.* 2002) . La balance entre le lefty-A/EBAF et le TGF β 2 pourrait moduler l'expression des MMPs lors de la phase sécrétoire et de la phase menstruelle. L'expression maximale du TGF β 3 est observée durant la phase proliférative et contrôlerait la phase de réparation tissulaire (Gaide Chevronnay *et al.* 2008).

Les TGF β s sont sécrétés sous forme de complexes inactifs fixés à différentes molécules de la MEC ou à des molécules péricellulaires et peuvent être activés par différentes métalloprotéases, par la thrombospondine, par la plasmine et par les intégrines. L'expression anormale du lefty, en dehors de la phase périmenstruelle, a été observée dans l'endomètre de patientes souffrant de saignements irréguliers (Kothapalli *et al.* 1997).

b) Les inhibiteurs des métalloprotéases

Parmi les inhibiteurs physiologiques des métalloprotéases, les TIMPs-1 et -2 sont exprimés dans l'endomètre de façon constitutive au cours du cycle, seul le TIMP-3 présente des variations cycliques. Durant la phase proliférative, les TIMPs-1, -2 et -3 sont présents dans tous les compartiments cellulaires. Les TIMPs-1 et -2 sont associés à l'endothélium vasculaire et aux VSMCs (cellule musculaire lisse vasculaire) des artéries spiralées (Zhang & Salamonsen 1997). L'expression de TIMP-3 est maximale en fin de phase sécrétoire, coïncidant avec la pré-décidualisation des cellules stromales (Gao *et al.* 2001; Goffin *et al.* 2003; Higuchi *et al.* 1995). Le TIMP-3 est également produit par les cellules endothéliales et stromales non décidualisées (Henriet *et al.* 2002; Zhang & Salamonsen 1997).

- *Perturbation de l'angiogenèse et de la maturation vasculaire*

a) Définition de l'angiogenèse

L'endomètre est un des rares tissus qui, chez l'adulte, présente une angiogenèse physiologique. Les mécanismes contrôlant le développement de l'angiogenèse dans l'endomètre peuvent être altérés et contribuer aux saignements endométriaux pathologiques.

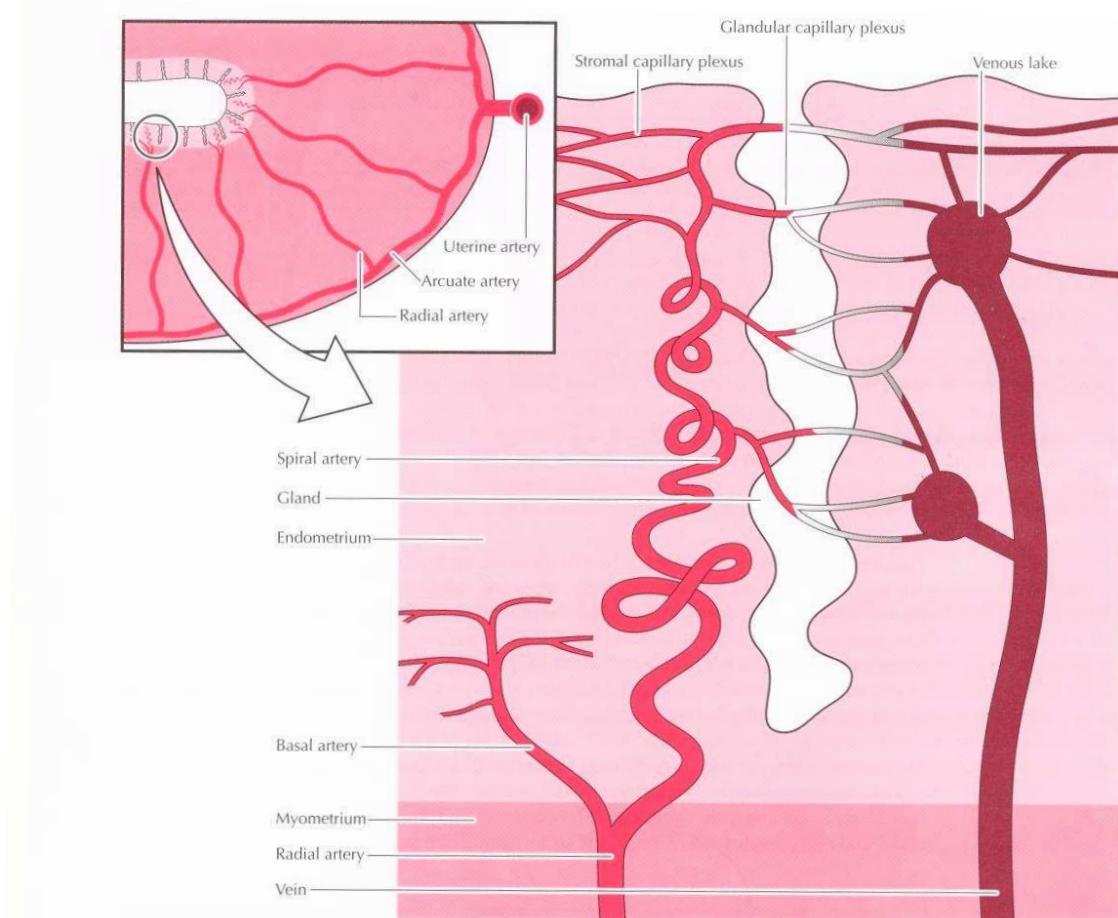
Le processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire existant est appelé angiogenèse, la vasculogenèse consistant en la formation de vaisseaux embryonnaires à partir d'angioblastes. L'angiogenèse survient normalement lors de phénomènes de réparation tissulaire ou lors de développements vasculaires pathologiques. Néanmoins, chez la femme en phase reproductive, ce phénomène d'angiogenèse se déroule physiologiquement à la fois dans l'ovaire et dans l'endomètre (Weston & Rogers 2000).

b) Vascularisation utérine

Les artères utérines donnent naissance aux artères arquées d'où sont issues les artères radiales qui s'étendent à travers le myomètre jusqu'à la jonction entre le myomètre et l'endomètre. Ensuite, les artères radiales se divisent en artères basales qui vont assurer la vascularisation de la partie basale de l'endomètre. D'autre part des artères spiralées se développent et assurent la vascularisation de la partie fonctionnelle de l'endomètre. Ce sont ces artères qui vont subir les modifications les plus importantes au cours du cycle menstruel. Après la menstruation, elles sont courtes. Elles vont ensuite s'allonger durant la phase proliférative, s'épaissir et se connecter par un réseau précapillaire au plexus sous-épithéial capillaire. Durant la phase sécrétoire, les artères spiralées continuent à se développer, formant un réseau de plus en plus tortueux. Après la menstruation, qui a permis l'élimination de la partie fonctionnelle de l'endomètre, le réseau vasculaire va subir une importante croissance et des remaniements influencés par les facteurs qui contrôlent l'angiogenèse (Weston & Rogers 2000).

D'un point de vue histologique, l'artère radiale est entourée d'une couche épaisse de cellules musculaires lisses exprimant l'actine α [α -smooth muscle actin (α -SMA)], ainsi que la chaîne lourde de la myosine [myosin heavy chain (MHC)] (Abberton *et al.* 1999). Au fur et à mesure de leur convergence vers la lumière endométriale, les structures artérielles perdent des cellules musculaires lisses péri-vasculaires jusqu'à atteindre le plexus capillaire sous-épithéial qui est formé seulement de cellules endothéliales et n'exprime plus l' α -SMA (Smith 2001).

Figure 15 : Vascularisation utérine



(D'après Speroff, 1999)

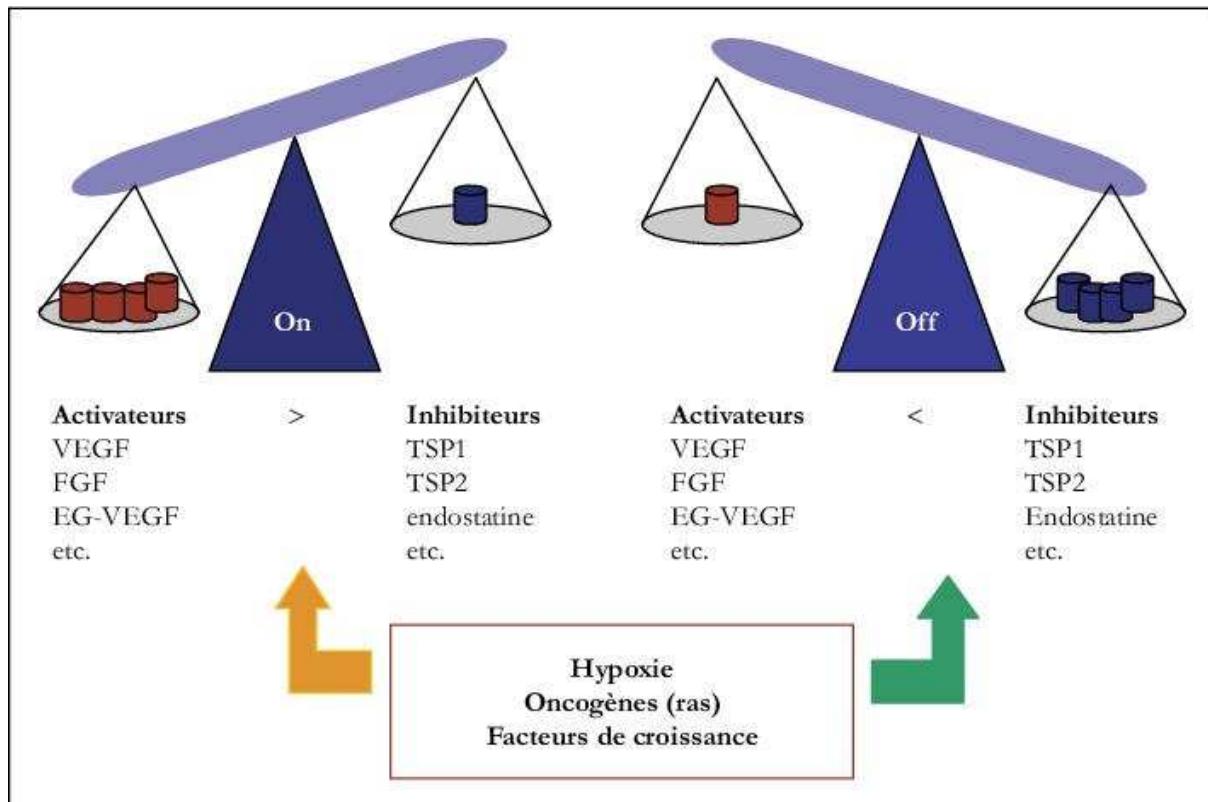
c) Mécanismes de l'angiogenèse

L'angiogenèse peut se développer selon 4 mécanismes : le bourgeonnement, l'intussusception (division interne du vaisseau), l'élongation et la vasculogenèse postnatale, qui permet la réalisation d'une angiogenèse par incorporation de précurseurs de cellules endothéliales à partir de la moelle osseuse. Les principaux mécanismes d'angiogenèse reconnus dans l'endomètre sont l'intussusception ou l'élongation plutôt que le bourgeonnement (absence de l'intégrine $\alpha v \beta 3$, marqueur du bourgeonnement), mécanisme par contre essentiel dans la croissance tumorale (Weston & Rogers 2000).

d) Contrôle moléculaire de l'angiogenèse

L'estradiol présente un effet mitogénique sur les cellules endothéliales endométriales. Par contre, cet effet est inhibé par la progestérone. L'inhibition de prolifération des cellules endothéliales endométriales par la progestérone est antagonisée par l'administration de mifépristone (Weston & Rogers 2000).

Figure 16 : Contrôle moléculaire de l'angiogenèse : le switch angiogénique



VEGF : vascular endothelial growth factor ; EG-VEGF : endocrine gland-vascular endothelial growth factor ; FGF : fibroblast growth factor ; TSP1 : thrombospondine 1 ; TSP2 : thrombospondine 2.

(D'après A Bikfalvi, 2006)

Le contrôle moléculaire de l'angiogenèse dépend d'un équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques.

I) Promoteurs de l'angiogenèse

Un des promoteurs de l'angiogenèse le plus étudié est le **VEGF**. Il possède des propriétés de puissant mitogène sur les cellules endothéliales. Il apparaît essentiel dans la vasculogenèse et dans l'angiogenèse et est présent dans tous les tissus. L'inactivation d'un simple allèle du VEGF est létale à un stade embryonnaire précoce, conséquence de l'importance de cette molécule dans le développement vasculaire inhérent à tout développement tissulaire.

Le gène du VEGF chez l'homme est situé sur le chromosome 6. Il comprend 8 exons qui subissent un épissage alternatif conduisant à 5 isoformes du VEGF dit A. D'autres VEGFs issus de gènes distincts ont été décrits, le VEGF B, C, D, E, PlGF1 et PlGF2 (Hicklin and Ellis, 2005). Trois récepteurs sont décrits, le VEGFR1 {Shibuya, 1990 176 /id} VEGFR2/KDR (kinase insert domain-containing region) (Terman et al., 1992), VEGFR3 {Pajusola, 1992 178 /id}.

Le VEGFR2/KDR est exprimé principalement dans l'endothélium. Ce récepteur est surexprimé au niveau des cellules stromales dans la partie superficielle de l'endomètre durant la phase prémenstruelle (Nayak *et al.* 2000). Cette augmentation d'expression suit la chute de la progestérone. L'administration de progestérone 24 heures après la chute de celle-ci permet d'interrompre l'induction de l'expression de VEGFR2 au niveau stromal mais ne le permet pas au niveau endothérial. Il est à noter que l'expression de la proMMP-1 est également induite de concert dans les mêmes cellules stromales lors de la chute de la progestérone. L'expression du VEGF est augmentée en phase prémenstruelle et peut ainsi décliner ses actions à travers le récepteur VEGFR2/KDR surexprimé au même moment (Critchley *et al.* 2006).

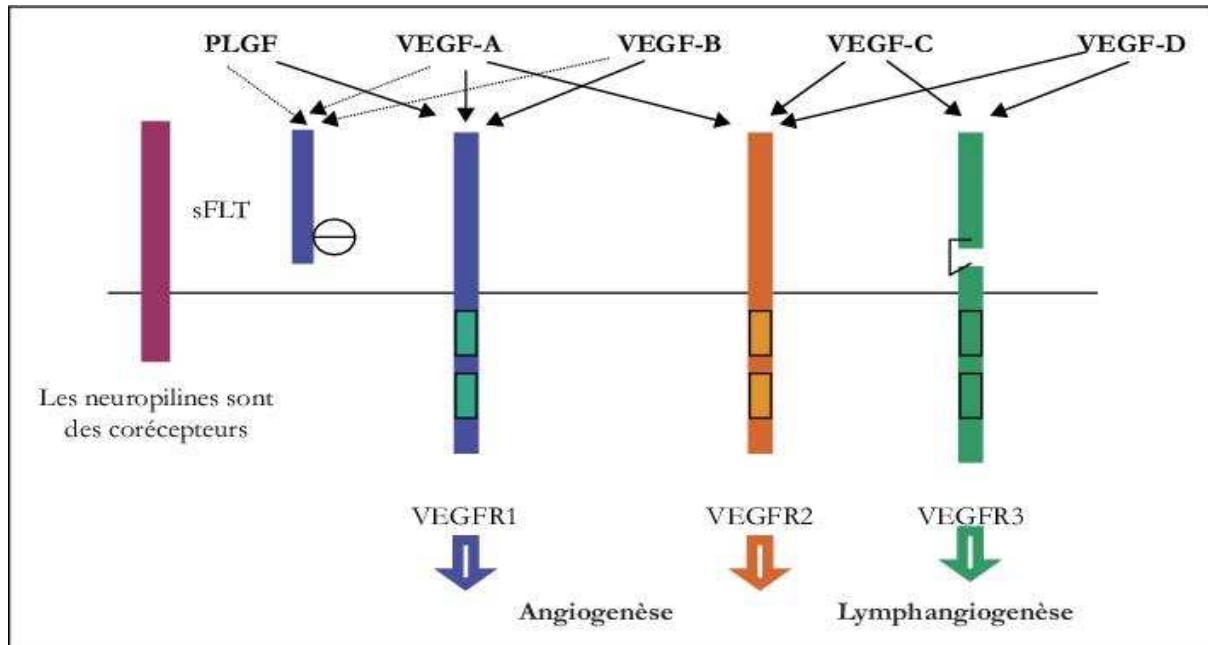
Facteur angiogène essentiel et non redondant, le VEGFA peut être induit par des cytokines telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α), le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) et l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor) (Giudice *et al.* 1997; Tazuke & Giudice 1996). L'hypoxie est un facteur essentiel de stimulation du VEGFA et de l'inhibition de la thrombospondine 2 qui maintient normalement l'endothélium vasculaire à l'état quiescent. L'HCG est un autre facteur qui permet la stimulation de l'angiogenèse au cours de l'invasion endométriale par le trophoblaste (Berndt *et al.* 2006).

Les molécules de VEGF-A se fixent sur les récepteurs de surface VEGFR2/KDR et VEGFR1 ainsi que sur un corécepteur la neuropilin 1 (Nrp1) (Shibuya 2001). **L'Endocrine Gland-**

VEGF (EG-VEGF) est un mitogène spécifique pour les cellules endothéliales des glandes endocrines (LeCouter & Ferrara 2002). Il permet l'activation d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Le stroma des lésions endométriotiques exprime davantage le EG-VEGF que l'endomètre eutopique. Celui-ci présente des différences significatives d'expression du EG-VEGF en relation avec la phase du cycle, le surexprimant en phase sécrétoire (Lee *et al.* 2009). Son rôle dans l'angiogenèse endométriale est suspecté et à l'étude.

La surexpression d'autres facteurs angiogéniques tels le VEGF et son récepteur, certaines MMPs, les angiopoïétines, est décrite dans les lésions endométriotiques prolifératives en faveur d'un rôle de l'angiogenèse dans la pathogenèse de la maladie (Bourlev *et al.* 2006; Di Carlo *et al.* 2008).

Figure 17 : La famille des facteurs de croissance vasculo-endothéliaux (VEGF) et de leurs récepteurs.



La stimulation du VEGFR2 et du VEGFR1 par les différents membres de la famille induit l'angiogenèse, celle du VEGFR3 la lymphangiogenèse. Par ailleurs, la neuropiline 1 (Nrp1) et la neuropiline 2 (Nrp2) sont des corécepteurs. Dans certains cas, une forme soluble du VEGF-1 est produite (sFLT1), qui a pour conséquence de limiter l'angiogenèse. Les spécificités des différentes formes de VEGF et des placental growth factors (PIGF) sont indiquées.

(D'après A Bikfalvi, 2006)

Les facteurs de croissance fibroblastique (FGF) appartiennent à une famille qui contient actuellement plus de 20 membres. Le FGF1 (acide) et le FGF2 (basique) ont été particulièrement étudiés pour leurs propriétés angiogéniques. Ces protéines se lient à des récepteurs de surface cellulaire spécifiques à activité tyrosine kinase. Quatre types ont été décrits (Ornitz & Itoh 2001). Le FGF1 et le FGF2 ont des effets plus marqués sur la prolifération des cellules endothéliales capillaires que le VEGF. Le FGF2 régule la production des activateurs du plasminogène, l'expression des intégrines. Le FGF2 est capable également d'induire l'expression du VEGFC et de participer à la lymphangiogenèse (Bikfalvi 2006).

Les angiopoïétines et leurs récepteurs sont également des molécules clés dans le contrôle de l'angiogenèse. L'angiopoïétine 1 (Ang-1) permet d'induire la formation de tubes capillaires *in vitro* à partir de cellules endothéliales et est identifiée comme le ligand de la kinase transmembranaire Tie 2. Protéine glycosylée de 72 kDa, l'Ang-1 se lie à son récepteur Tie 2 et active sa phosphorylation. La délétion du gène codant pour l'Ang-1 conduit à la létalité des embryons. Chez la souris, dès le développement embryonnaire précoce, l'Ang-1 est exprimée au niveau du myocarde et du mésenchyme. A un stade ultérieur, elle est exprimée dans les cellules environnant les vaisseaux en développement. L'Ang-1 induirait, au niveau des cellules endothéliales, la synthèse des facteurs responsables du recrutement des cellules périvasculaires (Yancopoulos *et al.* 2000). L'interaction de l'Ang-1/Tie-2 est responsable du maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins en renforçant les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules péri-vasculaires de soutien (péryctes et cellules musculaires lisses) et en stimulant le recrutement de ces cellules.

D'autres angiopoïétines (2 – 3 – 4 – 5) ont été identifiées. L'Ang-2 apparaît comme un antagoniste de l'Ang-1 (Hanahan 1997). L'action d'Ang-2, via l'inhibition de Tie-2, conduit à une perte de contact entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires, permettant l'action des facteurs proangiogènes tel que le VEGF et la reprise de l'angiogenèse. Ainsi le VEGF, Ang-1 et Ang-2 possèdent des rôles complémentaires dans le développement et le maintien du réseau vasculaire.

La réduction d'expression de l'Ang-1 est décrite chez les patientes ménorragiques (Hewett *et al.* 2002).

Le TGF β exerce une action biphasique sur les cellules endothéliales *in vitro*, stimulatrice à faible concentration et inhibitrice à plus forte concentration. *In vivo*, il stimule l'angiogenèse et est exprimé en phase prémenstruelle dans l'endomètre par les cellules immunitaires {Jones, 2006 212 /id; Tuxhorn, 2002 423 /id}.

Les régulateurs du développement et facteurs neuronaux

Un certain nombre de gènes, importants pour le développement embryonnaire, régulent également le développement vasculaire.

Les membres de la famille des éphrines et leurs récepteurs, les récepteurs Notch et les Notch-ligands, et les molécules de la famille hedgehog et leurs récepteurs participent au développement vasculaire. Notch (1, 2, 3, 4) représente une famille de récepteurs transmembranaires qui lient un certain nombre de ligands dont Delta et Jagged (Uyttendaele *et al.* 2001). Ces récepteurs apparaissent essentiels au remodelage de la vascularisation embryonnaire, à la différentiation des artères et des veines et à l'angiogenèse (Mailhos *et al.* 2001) ; (Pola *et al.* 2001). Un ligand de Notch, Delta- 4, est fortement exprimé au cours de la néoangiogenèse chez l'adulte. D'autres protéines, hedgehog, participent aussi au remodelage de la vascularisation embryonnaire. Elles sont exprimées dans le tissu vasculaire postnatal et permettent l'augmentation du diamètre des vaisseaux (Pola *et al.* 2001).

Les éphrines (EphB2) et leur récepteur EphB4 participent au développement vasculaire et déterminent la spécificité des cellules endothéliales, artérielles et veineuses. Leur expression est augmentée dans les tumeurs endométriales utérines (Adams & Klein 2000).

II) Inhibiteurs de l'angiogenèse

La thombospondine 1 (TSP1) est un inhibiteur puissant de l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* (Lawler 2002). Les thombospondines sont des glycoprotéines produites à partir de cellules normales ou transformées. La perte d'un gène suppresseur de tumeur entraîne une réponse angiogénique par diminution de la sécrétion de TSP1. Le gène suppresseur capable de réguler l'expression de TSP1 est la protéine p53 dont la fonction est altérée dans la maladie de Li-Fraumeni. La TSP 1 inhibe l'angiogenèse grâce à des effets sur la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales mais également sur la mobilisation de facteurs pro-angiogéniques. Elle peut empêcher la mobilisation du VEGF en inhibant l'activation de la MMP-9. Si la TSP1 inhibe le développement des vaisseaux sanguins, ce n'est pas le cas pour celui des vaisseaux lymphatiques. La TSP 1 est présente dans les cellules stromales. Elle est surexprimée par la progestérone. Elle est également détectée dans la membrane basale des vaisseaux en phase sécrétoire (Iruela-Arispe *et al.* 1996).

Le fragment hémopexine (PEX) est l'extrémité C-terminale de la MMP-2. Elle possède une forte activité anti-angiogénique *in vivo* (Brooks *et al.* 1998). Elle inhibe l'activité catalytique

de la MMP-2, inhibe la dégradation de la MEC et la migration cellulaire. Son rôle dans l'endomètre, néanmoins, n'a pas été défini.

Une glycoprotéine membranaire, **RECK** (reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs) possède également la capacité d'inhibition des MMPs et du contrôle de l'angiogenèse. Sa surexpression est associée à une réponse angiogénique (Oh *et al.* 2001).

Le facteur plaquettaire 4 (PF4), polypeptide de 7 kDa produit par les plaquettes, inhibe l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Maione & Sharpe 1990). Son action pourrait être exercée par l'inhibition de la liaison du FGF2 et du VEGF à leurs récepteurs. Il inhibe également les récepteurs du FGF par dimérisation des récepteurs et inhibition des capacités de liaison (Perollet *et al.* 1998).

Le développement vasculaire normal requiert l'action de différents facteurs en cascade. Ainsi, le VEGF entraîne la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales aboutissant à la formation de vaisseaux désordonnés non hiérarchisés et immatures. Ensuite, d'autres facteurs comme l'Ang-1, le TGF- β , le PlGF permettent la stabilisation et le remodelage vasculaire. Le PDGF (platelet-derived growth factor) est un des principaux effecteurs entraînant le recrutement des péricytes. Ce recrutement est indispensable afin de stabiliser les vaisseaux et les rendre insensibles aux facteurs de prolifération. Le flux sanguin participe également au modelage vasculaire (Carmeliet 2004).

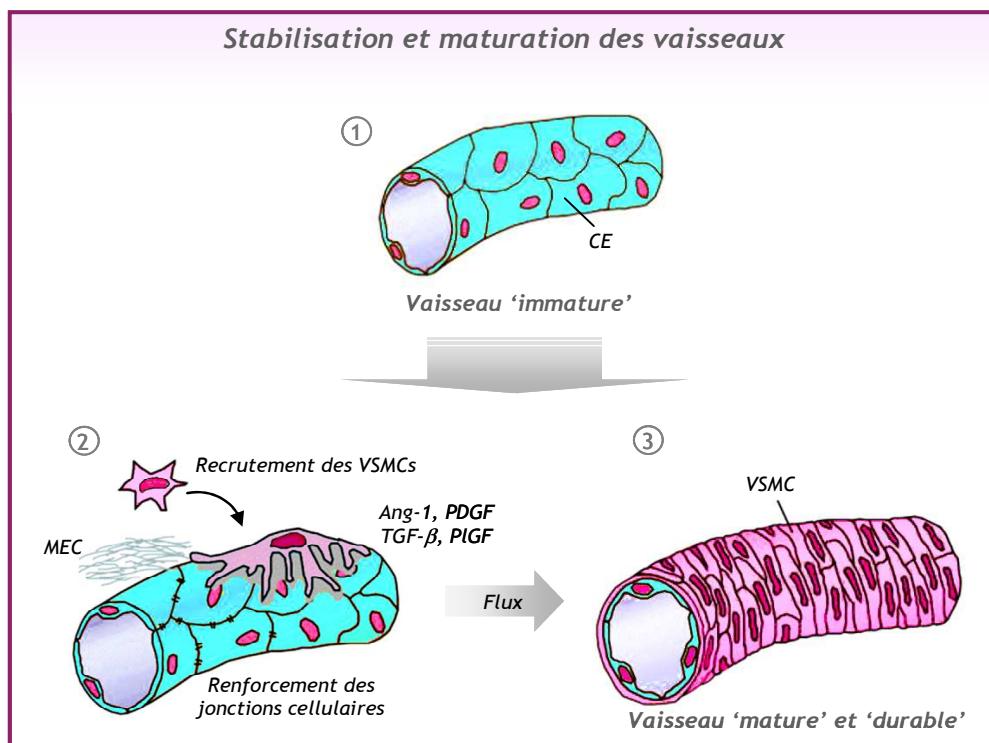
Les péricytes peuvent présenter une grande diversité de phénotypes intermédiaires entre ceux des cellules musculaires lisses et ceux des fibroblastes ainsi qu'exprimer des marqueurs immunohistochimiques variables en fonction du tissu, de l'espèce et de l'étape de développement (Gerhardt & Betsholtz, 2003). Le NG-2 et l'alpha smooth muscle actin (α -SMA) sont utilisés comme marqueurs péricytaires, mais aucun d'eux n'est parfaitement spécifique ni exprimé par tous les péricytes.

L'origine des VSMCs est complexe et peut varier en fonction du tissu (Carmeliet 2000). Ces cellules se différencient à partir de cellules mésenchymateuses *in situ* tels que les péricytes (Nehls *et al.* 1992; Schor *et al.* 1995), les cellules stromales, les cellules myoépithéliales et les myofibroblastes (Lazard *et al.* 1993). Elles peuvent également se différencier à partir de cellules endothéliales ou à partir de précurseurs de moëlle osseuse ou de macrophages (Carmeliet 2000). Au fur et à mesure du processus de différenciation, les VSMCs expriment des marqueurs caractéristiques incluant l' α SMA et la MHC (Price *et al.* 1994). L' α SMA est

une protéine contractile du cytosquelette et un des marqueurs les plus précoce de différenciation des VSMCs (Skalli *et al.* 1986). Elle est fortement exprimée dans les péricytes (Nehls *et al.* 1994). La MHC est une protéine contractile qui apparaît après l'αSMA, dans les VSMCs différencierées (Owens 1995; Price *et al.* 1994; Schwartz & Liaw 1993).

Figure 18 : Stabilisation et Maturation des Vaisseaux

- (1) Vaisseau immature composé de cellules endothéliales (CE),
- (2) Recrutement des VSMCs et renforcement des jonctions cellulaires
- (3) Vaisseau stabilisé et mature



(D'après P Carmeliet, 2004)

- *Hypoxie*

Les saignements utérins physiologiques dépendant de la chute de la progestérone n'impliquent pas uniquement des médiateurs de l'inflammation mais également les métabolites conséquents de l'hypoxie induite par la constriction des artères spiralées. Des molécules contrôlant la vasoconstriction sont probablement impliquées mais leur nature n'est pas encore parfaitement déterminée. Le rôle des prostaglandines, des endothélines, de l'angiotensine II est proposé. L'expression des récepteurs de l'endothéline varie en fonction du cycle (O'Reilly *et al.* 1992) L'expression de l'angiotensine II et de ses récepteurs varie également au cours du cycle (Ahmed *et al.* 1995).

Le principal facteur angiogénique induit par l'hypoxie est le VEGF (Sharkey *et al.* 2000). L'hypoxie induit la transcription du VEGF. Le promoteur du VEGF contient l'élément de réponse pour le HIF (hypoxia inducible factor). Par contre, le promoteur de VEGFR2/KDR ne possède pas l'élément de réponse pour le HIF. Le VEGF stimule l'expression de VEGFR2/KDR dans l'endothélium vasculaire (Kremer *et al.* 1997). Le VEGF, le VEGFR2/KDR et les métalloprotéases sont exprimés de concert par les cellules stromales de la partie fonctionnelle de l'endomètre en prémenstruel au moment de la chute de la progestérone. Le VEGF est capable d'induire l'expression des métalloprotéases (Wang & Keiser 1998; Unemori *et al.* 1992) L'hypothèse émise par Critchley est l'implication en cascade, après la chute de la progestérone, de médiateurs inflammatoires et de prostaglandines locales qui induisent une vasoconstriction et une surexpression de cytokines. La constriction des artères spiralées s'accompagne d'hypoxie induisant le VEGF qui lui-même induit son propre récepteur, VEGFR2/KDR, au niveau des cellules stromales de la région fonctionnelle endométriale. Le VEGF est ensuite capable, par son action au niveau de VEGFR2/KDR, d'induire l'expression des métalloprotéases au sein des cellules stromales. L'inflammation induit un large afflux de leucocytes. Ces cellules inflammatoires renforcent l'action du VEGF sur l'activation des métalloprotéases (Critchley *et al.* 2006). Des perturbations de ces contrôles moléculaires sont proposées comme des mécanismes éventuels de l'apparition de saignements anormaux.

12. Développement des SPRMs - Utilisation en Gynécologie des SPRMs (article de revue)

Cet article de revue présente les applications actuelles des SPRMs, celles en voies de développement et celles toujours à l'étude.

Gynecological Endocrinology, February 2009; 25(2): 67–73



EDITORIAL

Gynaecological uses of a new class of steroids: the selective progesterone receptor modulators

AXELLE PINTIAUX^{1,2}, NATHALIE CHABBERT-BUFFET^{3,4}, & JEAN-MICHEL FOUDART^{1,2}

¹*Department of Gynaecology, CHU, University of Liege, Liege, Belgium*, ²*Laboratory of Tumor and Development Biology, Center of Experimental Cancer Research (CECR), University of Liege, Liège, Belgium*, ³*Department of Obstetrics, Gynecology, Reproductive Medicine and Public Health, Hospital Tenon, AP-HP, Paris, France*, and ⁴*EA 1533 UPMC University Paris 06, Paris, France*

(Received June 2008; accepted July 2008)

Abstract

Selective progesterone receptor modulators (SPRM) represent a new class of synthetic steroids, which can interact with the progesterone receptor (PR) and can exert agonist, antagonist or mixed effects on various progesterone target tissues *in vivo*. This review evaluates the actual and potential usefulness of SPMs in gynaecology.

Keywords: *SPRM, progesterone, progesterone receptor, contraception, therapeutic abortion, endometriosis, myoma, woman, human*

Introduction

The progesterone receptor (PR) belongs to the nuclear receptor super family and controls specific genes involved in female reproduction. The primary action of progesterone is to initiate and maintain pregnancy. Progesterone, the natural ligand of the PR, represents the pure agonist, onapristone, mifepristone show a pure antagonist activity and asoprisnil exhibits partial agonist/antagonist effects [1]. The synthesis of mifepristone, the first PR antagonist (PA) was a starting point of drug discovery and the research programme in the area of PAs [2–4].

Progesterone is involved in the control of ovulation, facilitating the luteinising hormone (LH) surge.

It transforms the endometrium from a proliferative to a secretory state and, together with estradiol, maintains endometrial integrity [5] preparing the endometrium for implantation. It inhibits uterine contractility [6].

In uterus, progesterone controls the growth and differentiation of endometrial and myometrial cells. During the luteal phase, in the primate uterus, progesterone inhibits estrogen induced mitotic activity in the functional zones of the endometrial epithelium but shows some stimulatory effect on both

the basalis and endometrial angiogenesis [7]. Progesterone can also play a key role on growth of benign smooth muscles tumours from uterine myometrium [8–10]. In normal breast epithelial cells, progesterone has important mitogenic properties with a peak of a mitotic activity during the luteal phase [11].

Synthetic progestins administered with estrogen in post-menopausal women are involved in the moderately increased risk of breast cancer [12,13]. In the mammary glands of nulliparous Brcal/p53 deficient mice, the PA mifepristone prevents mammary tumorigenesis [14].

From the physiological properties of progesterone and the pharmacological profile of synthetic progestins, and their possible drawbacks, it appears that the potential advantages and the clinical applications of selective progesterone receptor modulators (SPRMs) are very promising in major public health areas.

Clinical application of the SPRMs

Medical abortion

Mifepristone, the first glucocorticoids, and PA [2], a derivative of norethindrone, alters the endometrium and causes decidual necrosis and trophoblast to

Correspondence: Jean-Michel Foidart, Département de Gynécologie et Obstétrique, Boulevard 12^e de Ligne, 1 B-4000 Liège, Belgium. Tel: +32-4-225.65.82. Fax: +32-4-224.00.05. E-mail: jmfoidart@ulg.ac.be

ISSN 0951-3590 print/ISSN 1473-0766 online © 2009 Informa Healthcare USA, Inc.
DOI: 10.1080/09513590802531120

separate from decidua [2,15–17]. Mifepristone sensitises the pregnant uterus and cervix to endogenous and exogenous prostaglandins, increasing uterine activity and inducing cervical softening. Mifepristone is well absorbed orally and reaches a peak serum concentration in pregnant woman within 2 hours. The pharmacokinetics is similar for any dose over 100 mg. The half-life of mifepristone is approximately 19 hours in pregnant women [16].

Mifepristone used alone with oral doses ranging from 50 to 400 mg allows complete abortion in 60–80% up to 48 days gestation. The addition of small doses of a prostaglandin analogue (such as misoprostol) has a synergistic effect resulting in nearly 100% complete abortion [18,19] with lower doses than those required when the prostaglandin analogue is used alone. Moreover, the addition of mifepristone to misoprostol increases complete abortion at a faster rate up to 63 days gestation [16].

The most commonly used medical abortion regimen worldwide is presently mifepristone followed by a prostaglandin analogue. The FDA-approved regimen consists of 600 mg of oral mifepristone followed by a prostaglandin analogue, usually misoprostol, 36–48 hours later. This regimen has been reported to induce complete abortion in 92–99% women [20–23]. As expected on the basis of its pharmacokinetics, lower doses of mifepristone are equally effective as the 600 mg dose when combined with a prostaglandin analogue [24–26]. In the large trial performed by the World Health Organisation, pregnant women were included up to 63 days gestation and received either 200 mg or 600 mg mifepristone, followed 48 hours later by an oral administration of 400 µg misoprostol. Both groups showed similar complete abortion rates (89 and 88%, respectively) [26]. This efficacy is similar to that of vacuum aspiration. In addition, studies using 200 mg mifepristone combined with 800 µg misoprostol administered vaginally to more than 4000 women also confirmed the efficacy of this low dose of mifepristone [27–29]. The vaginal administration of misoprostol prolongs the efficacy of mifepristone regimens up to 63 days. A shorter interval between the administration of mifepristone and prostaglandin analogue does not impair the rate of abortion [30].

The use of mifepristone between 9 and 13 weeks gestation is equally effective as a cervical primer [31]. Animal studies showed that mifepristone induces collagen remodelling. It caused a decrease in collagen organisation with decreased fibril length and diameter [32]. The prostaglandin analogue, misoprostol, is more commonly used in this indication because it is cheaper and largely available. Nevertheless, bleeding and abdominal pain are decreased with mifepristone compared with misoprostol [31,33].

Mifepristone for second trimester abortion decreases the interval between induction to abortion and increases the success rate. It is administered in either 200 or 600 mg dosing and followed by prostaglandin analogue.

Management of miscarriage

A randomised placebo controlled trial showed that expulsion occurred in 82% of women with first trimester arrested pregnancy, within 5 days after administration of 600 mg mifepristone compared with only 8% of women given placebo but the success rate was comparable with that of a misoprostol used alone [34].

Emergency contraception

Emergency contraception (EC) is a term used to describe a group of methods for preventing an unwanted pregnancy that are administered during the first few days after unprotected intercourse. It can decrease individual woman's pregnancy risks by as much as 89% after a single coitus. EC is an important action for woman giving them a chance to avoid the psychological and physical consequences of unwanted pregnancy including the need for legal or clandestine abortion [35].

Several approaches to EC have been described, including high doses of estrogens, danazol, intrauterine devices, oral contraceptive with estrogen and progestin [36], a progestin alone (levonorgestrel) and SPRMs (mifepristone and VA 2914). The Yuzpe regimen involved the combined use of ethynodiol diacetate 100 µg and 0.5 mg of levonorgestrel, repeated once 12 hours apart, with the first dose given within 72 hours of unprotected intercourse. This regimen, which was popular in the late seventies and early eighties, has now been supplanted by a more effective and better tolerated progestin only product, containing levonorgestrel. They were to be used within 72 hours of unprotected intercourse.

PR modulators offer another option for EC. They can maintain efficacy for periods of time, longer than 72 hours in a single dose regimen [37,38]. A higher efficacy of mifepristone compared with the Yuzpe regimen was also observed. Side effects such as nausea, vomiting, headache, dizziness, fatigue, low abdominal pain and hot flushes were observed less frequently in women receiving mifepristone [39]. Lowering the dose of mifepristone from 600 to 10 mg did not significantly impair its effectiveness as an emergency contraceptive [40]. Low doses of mifepristone are associated with less disturbance of the menstrual cycle length. A dose as low as 10 mg seems preferable to the 600 mg dose [38]. This trial also showed that unlike levonorgestrel or Yuzpe

regimen, the efficacy of mifepristone does not appear to decline with increased interval up to 120 h.

Recently, a second generation PR modulator with lower anti-glucocorticoid activity than mifepristone was tested in EC. Participants were randomly assigned to receive a single dose of 50 µg of VA 2914 plus a placebo 12 hours later or two doses of 0.75 mg of levonorgestrel taken 12 hours apart. VA 2914 was at least as effective as levonorgestrel in preventing pregnancy after unprotected intercourse. Lower efficacy with increasing interval between intercourse and EC treatment above 48 hours was observed only with levonorgestrel. In contrast, the effectiveness of VA 2914 did not decline after 48 hours. Adverse effects were generally similar in both treatment groups, but more nausea was observed among the VA 2914 treated women. Nausea, as a side effect, has not been reported in other trials with VA 2914 at higher doses. Moreover, VA 2914 was also effective in preventing pregnancy when administered after ovulation [36]. In both groups, women experienced considerable variation in menstrual cycle length when compared with their reported individual normal cycle length. On average, the onset of menses after EC use was 2, 1 day earlier than anticipated in levonorgestrel users and 2, 6 days later in VA 2914 users [37].

Acceleration of tubal transport of fertilised eggs has been reported in rats exposed to anti-progestogen [41]. No information is available in women. It is well documented, however, that mifepristone does not increase the risk of tubal pregnancy [41,42].

Long-term contraception

PAs and SPRMs do have contraceptive potential possibly, by several mechanisms [5,43]. They inhibit ovulation by blocking the LH surge and can induce endometrial desynchronisation, thereby interfering with implantation. Recently, mifepristone but not levonorgestrel was shown to inhibit human blastocyst attachment to an *in vitro* endometrial three-dimensional cell culture model [44]. High doses of mifepristone may even induce follicular atresia [45].

The threshold dose for ovulation inhibition is 2 mg/day. At a lower dosage, ovulation occurs and the administration of 0.5 mg mifepristone daily or 5 mg weekly is not effective in pregnancy prevention [46,47]. Two-hundred milligrams of mifepristone, administered 48 hours after the LH surge, shows contraceptive efficacy. However, this option is not clinically relevant because the detection of an LH surge routinely is an expensive and an unreliable method [5,47].

Administration of mifepristone, in the late luteal phase, is not effective in pregnancy prevention [48,49].

VA 2914 is an orally active steroidial SPRM which demonstrates potent PA activity *in vivo* and *in vitro* [50] with a reduced anti-glucocorticoid activity compared with mifepristone [51]. This compound shows anti-ovulatory activity and post-coital anti-fertility activity in rats [52].

We evaluated ovulation inhibition by VA 2914 in women, in a continuous regimen of administration of 2.5, 5 and 10 mg/day for 3 months. We also examined the endometrial impact in each group.

Anovulation (defined by absence of progesterone above 3 ng/mL) was obtained in nearly 80% women in the 5 and 10 mg/day groups with a high rate of amenorrhea (81.2 and 90%, respectively). Plasma estradiol levels remained in the physiological follicular phase range.

Endometrial histological analysis showed predominantly a pattern of secretory phase. Some cystic glandular dilatations were observed in rare cases. No hyperplasia was detected [53].

We quantified the effects of VA 2914 on endometrial vascularisation, fibrillar matrix and vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in endometrial biopsies from 41 women before and after 12 weeks treatment. No changes were noted in structure, number and size of endometrial vessels. The collagen network and VEGF-A distribution remained comparable during the luteal phase at baseline and under VA 2914 treatment [54]. From these observations, we conclude that long-term VA 2914 treatment does not result in an endometrial morphology comparable with that induced by a progestin. It thus acts on endometrial cells, in a specific way, which is clearly distinct from that of a progestin.

Treatment of uterine leiomyomata

Uterine leiomyomata, also named fibroids, are benign tumours that occur in up to 35% women above 35 years. They account for up to 40% of all hysterectomies [55]. Non-surgical treatment options for symptomatic leiomyomata are limited because gonadotropin releasing hormone agonists (GnRHa) induce hypo estrogenism and side effects limiting the treatment duration [56]. Even, when a decrease in leiomyomata size of 36% is observed after 12 weeks of GnRHa treatment, the uterus returns to pre-treatment size within 6 months after treatment completion. The indications of GnRHa are thus limited to short-term pre-surgical treatment [57].

Progesterone and PR seem to play a key role in the control of uterine fibroid growth [58]. Mitotic activity is maximal during the luteal phase [59]. Several studies have shown an up-regulation of PR in uterine leiomyomata compared with normal adjacent myometrium at mRNA and protein levels [60]. The expression of the proliferation marker Ki-67 is also

increased in leiomyomata, when compared with that in normal myometrium, and up-regulated by progesterone [60]. Expression of epidermal growth factor, a proliferative cytokine, and Bcl2, an apoptosis-inhibiting protein is also increased in fibroids relative to the adjacent myometrium, specifically during the secretory phase [61]. Progesterone increases Bcl2 protein expression in primary leiomyomata cell cultures [62]. Progestins finally attenuate or even reverse the inhibitory effects of GnRHa on leiomyomata size when used as add-back therapy [63–65]. However, Mifepristone has opposite effects [66] and may decrease proliferation of these smooth muscle cells, suggesting a clinical usefulness of SPRMs for the treatment of myomas. Asoprisnil, a mixed progesterone agonist/PA with no anti-glucocorticoid effect, inhibits proliferation and induces apoptosis in cultured uterine leiomyoma cells in the absence of comparable effects on cultured normal myometrial cells suggesting a cell type specific effect [67].

Down regulation of VEGF, of adrenomedullin, a vasoactive hormone and of their receptors was shown by western blot analysis in cultured human uterine leiomyoma cells treated with VA 2914. This action of VA 2914 was not observed in the surrounding normal myometrial cells, suggesting a cell type specific action of this SPRM on leiomyoma cells [68].

In clinical studies, daily treatment with 5–50 mg mifepristone for 3–6 months resulted in a reduction in uterus and leiomyoma volumes, ranging from 27 to 49% and 26 to 74%, respectively. Moreover, the prevalence and severity of dysmenorrhoea, menorrhagia and pelvis pressure were reduced. Treatment was well tolerated. Nevertheless, endometrial hyperplasia, a serious adverse effect of mifepristone was detected in 28% women [65]. A 20% reduction of myoma volume was also observed in over 90% patients treated with 12.5 mg mifepristone or GnRHa [69]. The recurrence rate after cessation of treatment was 40% after GnRHa and 17.8% after mifepristone [64].

Asoprisnil (5, 10 or 25 mg) given orally, once daily for 12 weeks reduced the uterine volume as well as the volume of the largest leiomyoma in a dose-dependent manner. At 10 and 25 mg, it suppressed pelvis pressure after 12-weeks treatment in contrast to placebo, which was inactive. No decrease of plasma estradiol or increase of cortisol was observed. This treatment is well tolerated and reduces significantly both duration and intensity of uterine bleeding in a dose-dependant manner [70].

Treatment of endometriosis

Endometriosis is an estrogen-dependent disease due to ectopic endometrium. It causes pelvic pain,

dyspareunia, dysmenorrhoea and infertility [71]. Pelvic pain is the result of a local inflammatory reaction and up-regulation of cyclooxygenase (COX)-2. The use of COX-2 inhibitors is therefore an effective symptomatic option [72]. Use of therapeutic agents, which hinder endometriosis, is limited by their side effects. GnRHa and GnRH antagonists use results in a hypo estrogeic state with hot flushes and bone loss, which limits the treatment duration. Progestins, the other therapeutic option, can induce bloating, breakthrough bleeding, mood changes, acne, hirsutism that can alter therapeutic compliance [73].

Inhibiting ectopic endometrium proliferation without inducing estrogen deprivation would be an important goal for the treatment of endometriosis. In this indication, SPRMs may ultimately have an important place. Mifepristone inhibits endometrial cells proliferation by activating the nuclear factor-kappa B signalling pathway [74]. Mifepristone also promotes apoptosis in human endometrial cells by over expression of *Bax*, the apoptosis promoting gene and by down-regulation of the anti-apoptosis gene *Bcl2* [75].

Mifepristone (5 or 50 mg/day for 6 months or 100 mg/day for 3 months) improved the clinical symptoms associated to endometriosis [75]. The 50 mg daily dose elicited a mean 55% regression of visible endometriosis after 6 months of treatment.

Asoprisnil, which inhibits endometrial proliferation and prostaglandin synthesis [76], was studied in subjects with a laparoscopic diagnosis of endometriosis at 5, 10 and 25 mg (versus placebo) for 12 weeks. All doses were significantly effective on pain scores, at all treatment months compared with placebo [70]. The effect on bleeding pattern was also dose-dependent. Asoprisnil was well tolerated in short-term studies, and no serious adverse event was reported during treatment period and follow-up [76].

Conclusion

PAs and SPRMs are largely used for fertility control. They have proven efficacy for abortion and EC. In long-term contraception, they offer an estrogen-free contraception with a better bleeding pattern than that associated with progestins. Because they control the growth of leiomyoma and endometrial cells without inducing an hypo estrogeic state, their use in endometriosis and symptomatic leiomyomata could be promising. Large Phase III trials in patients with menorrhagia associated with uterine fibroids are in progress. Efficacy and safety of long-term administration for management of uterine bleeding, endometriosis and uterine fibroids are actively studied.

On the basis of their pharmacological and clinical features, SPRMs could have in the future important potential implications in women's health care.

Some of them such as asoprisnil and mifepristone inhibit mammary epithelial cells proliferation, in animal models. They might have a key role in the prevention and treatment of benign and malignant breast pathologies.

Some concern appeared initially about endometrial safety because hyperplasia was described on mifepristone treatment. Endometrial biopsies from patients treated with different SPRMs were recently reviewed by a panel of experienced pathologists to develop consensus observations and recommendations [77]. New terminology and diagnostic criteria were defined as PRM-associated endometrial changes. These observations are reassuring as no pre-malignant lesions were seen. However, long-term follow-up is necessary to better define the specific role of this new class of agents as well as of their regimen of administration.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

References

- Chwalisz K, Perez MC, DeManno D, Winkel C, Schubert G, Elger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr Rev* 2005;26:423–438.
- Philibert D. RU38486: an original multifaceted anti-hormone *in vivo*. In: Agarwal M, editor. Adrenal Steroid Antagonism. Berlin: Walter de Gruyter and Co.; 1984. pp 77–101.
- Neef G, Beier S, Elger W, Henderson D, Wiechert R. New steroids with anti-progestational and anti-glucocorticoid activities. *Steroids* 1984;44:349–372.
- Kloosterboer HJ, Deckers GH, Van de Heuvel MJ, Loozen HJ. Screening of anti-progestagens by receptor studies and bioassays. *J Steroid Biochem* 1988;31:567–571.
- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz E. Selective progesterone receptor modulator and progesterone antagonist: mechanism of action and clinical application. *Hum Reprod Update* 2005;11:293–307.
- Csapo A. Progesterone block. *Am J Anat* 1956;98:273–291.
- Padykula HA. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1991;622:47–56.
- Brandon DD, Bethea CL, Straway EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, Erickson TE, Warner C, Keenan EJ, Clinton GM. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are over expressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:78–85.
- Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 1999;14:2844–2850.
- Kawaguchi K, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Nonogaki H, Mori T. Mitotic activity in uterine leiomyomas during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:637–641.
- Lundstrom E, Wilczel B, von Palfy Z, Soderqvist G, von Schoultz B. Mammographic breast density during hormone replacement therapy: differences according to treatment. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:348–352.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy post-menopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:321–333.
- Beral V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the million women study. *Lancet* 2003;362:419–427.
- Poole AJ, Li Y, Kim Y, Lin SC, Lee WH, Lee EY. Prevention of Brca1-mediated mammary tumorigenesis in mice by a progesterone antagonist. *Science* 2006;314:1467–1470.
- Mahajan DK, London SN. Mifepristone (RU 486): a review. *Fertil Steril* 1997;86:967–975.
- Hermann WL, Schindler AM, Wyss R, Bischoff P. Effects of anti-progesterone RU 486 in early pregnancy and during the menstrual cycle. In: Beaulieu EE, Siegel S, editors. The Antiprogestin Steroid RU 486 and Human Fertility Control. New York: Plenum; 1985. pp 259–262.
- Schreiber C, Creinin M. Mifepristone in abortion care. *Semin Reprod Med* 2005;23:82–91.
- Tang OS, Ho PC. Clinical applications of mifepristone. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:655–659.
- Kovacs L, Sas M, Resch BA, Ugocsai G, Swahn ML, Bygdeman M, Rowe PJ. Termination of very early pregnancy by RU 486, an anti-progestational compound. *Contraception* 1984;29:399–410.
- Shoupe D, Mishell DR Jr, Brenner PF, Spitz IM. Pregnancy termination with a high and medium dosage regimen of RU-486. *Contraception* 1986;33:455–461.
- Peyron R, Aubeny E, Targosz V, Silvestre L, Renault M, Elkik F, Leclerc P, Ullmann A, Baulieu EE. Early termination of pregnancy with mifepristone (RU 486) and the orally active prostaglandin misoprostol. *N Engl J Med* 1993;328:1509–1513.
- Aubeny E, Peyron R, Turpin CL, Renault M, Targosz V, Silvestre L, Ullmann A, Baulieu EE. Termination of early pregnancy (up to 63 days of amenorrhea) with mifepristone (RU 486) and increasing doses of misoprostol. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1995;40 (Suppl 2):85–91.
- Spitz IM, Bardin CW, Benton L, Robbins A. Early pregnancy termination with mifepristone and misoprostol in the United States. *N Engl J Med* 1998;338:1241–1247.
- Aubeny E. A two-stage increase in the dose of misoprostol improves the efficacy of medical abortion with mifepristone and prostaglandins (letter). *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2001;6:54–55.
- World Health Organization Task Force on Post-ovulatory Methods for Fertility Regulation. Termination of pregnancy with reduced doses of mifepristone. *BMJ* 1993; 307:532–537.
- McKinley C, Thong KJ, Baird DT. The effect of dose of mifepristone and gestation on efficacy of medical abortion with mifepristone and misoprostol. *Hum Reprod* 1993; 8:1502–1505.
- World Health Organization Task Force on Post-ovulatory Methods for Fertility Regulation. Comparison of two-doses of mifepristone in combination with misoprostol for early medical abortion: a randomised trial. *BJOG* 2000;107:524–530.
- Schaff EA, Eisinger SH, Stadarius LS, Franks P, Gore BZ, Peppema S. Low-dose mifepristone 200 mg and vaginal misoprostol for abortion. *Contraception* 1999;59:1–6.
- Ashok P, Penney G, Flett G, Templeton A. An effective regimen for early medical abortion: a report of 2000 consecutive cases. *Hum Reprod* 1998;13:2962–2965.
- Schaff EA, Fielding SL, Eisinger SH, Stadarius LS, Fuller L. Low-dose mifepristone followed by vaginal misoprostol at 48 hours for abortion up to 63 days. *Contraception* 2000; 61:41–46.

31. Schaff EA, Fielding SL, Westhoff C, Ellertson C, Eisinger SH, Stadlius LS, Fuller L. Vaginal misoprostol administered 1, 2, or 3 days after mifepristone for early medical abortion: a randomized trial. *JAMA* 2000;284:1948-1953.
32. Ashok PW, Gilian F, Templeton A. Mifepristone versus vaginally administered misoprostol for cervical priming before first-trimester termination of pregnancy: a randomized, controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:998-1002.
33. Ngai SW, Yeung KC, Lao T, Ho PC. Oral misoprostol versus mifepristone for cervical dilatation before vacuum aspiration in first trimester nulliparous pregnancies: a double blind prospective randomized study. *BJOG* 1996;103:1120-1123.
34. Tang OS, Ho PC. Clinical applications of mifepristone. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:655-659.
35. Westley E, von Herten H, Faundes A. Expanding access to emergency contraception. *Int J Gynaecol Obstet* 2007;97: 235-237.
36. Creinin MD, Schleff W, Archer DF, Wan L, Frezieres R, Thomas M, Rosenberg M, Higgins J. Progesterone receptor modulator for emergency contraception: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2006;108:1089-1097.
37. von Herten H, Piaggio G, Ding J, Chen J, Song S, Bartfai G, Ng E, Gemzell-Sarielsson K, Oyunbileg A, Wu S. Low dose mifepristone and two regimens of levonorgestrel for emergency contraception: a WHO multicentre randomised trial. *Lancet* 2002;360:1803-1810.
38. Comparison of three single doses of mifepristone as emergency contraception: a randomized trial. Task force on post-ovulatory methods of fertility regulation. *Lancet* 1999;353: 697-702.
39. Kulier R, Gulmezoglu AM, Hofmeyr GJ, Cheng LN, Campana A. Medical methods for first trimester abortion (review). *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1:CD002855.
40. Jin J, Weisberg E, Fraser IS. Comparison of three single doses of mifepristone as emergency contraception: a randomised controlled trial. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2005;45:489-494.
41. Roblero LS, Croxatto HB. Effects of RU 486 on development and implantation of rat embryos. *Mol Reprod Dev* 1991;29:342-346.
42. Pisarska MD, Carson SA, Buster JE. Ectopic pregnancy. *Lancet* 1998;351:1115-1120.
43. Spitz IM. Progesterone receptor antagonists. *Curr Opin Investig Drugs* 2006;7:882-890 (review).
44. Lalitkumar PGL, Lalitkumar S, Meng CX, Stavreus-Evers A, Hambillif K, Bentin-Ley U, Gemzell-Danielsson K. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an *in vitro* endometrial three-dimensional cell culture model. *Hum Reprod* 2007;22:3031-3037.
45. Croxatto HB, Salvatierra AM, Fuentealba B, Leiva L. Follicle stimulating hormone-granulosa cell axis involvement in the anti-folliculotrophic effect of low dose mifepristone (RU486). *Hum Reprod* 1995;10:1987-1991.
46. Marions L, Viski S, Danielsson KG, Resch BA, Swahn ML, Bygdeman M, Kovacs L. Contraceptive efficacy of daily administration of 0.5 mg mifepristone. *Hum Reprod* 1999; 14:2788-2790.
47. Bygdeman M, Danielsson KG, Marions L, Swahn ML. Contraceptive use of antiprogestin. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 1999;4:103-107 (review).
48. Spitz IM, Chwalisz K. Progesterone receptor modulators and progesterone antagonists in women's health. *Steroids* 2000; 65:807-815 (review).
49. Swahn ML, Bygdeman M, Chen JK, Gemzell-Danielsson K, Song S, Yang QY, Yang PJ, Qian ML, Chang WF. Once-a-month treatment with a combination of mifepristone and the prostaglandin analogue misoprostol. *Hum Reprod* 1999; 14:485-488.
50. Gainer EE, Ullmann A. Pharmacologic properties of CDB(VA)-2914. *Steroids* 2003;68:1005-1011.
51. Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR. *In vitro* anti-progestational/anti-glucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;88:277-288.
52. Reel JR, Hild-Petito S, Blye RP. Anti-ovulatory and post-coital antifertility activity of the antiprogestin CDB-2914 when administered as single, multiple, or continuous doses to rats. *Contraception* 1998;58:129-136.
53. Chabbert-Buffet N, Pintiaux-Kairis A, Bouchard P, VA2914 Study Group. Effects of the progesterone receptor modulator VA2914 in a continuous low dose on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and endometrium in normal women: a prospective, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3582-3589.
54. Ravet S, Munaut C, Blacher S, Brichant G, Labied S, Beliard A, Chabbert-Buffet N, Bouchard P, Foidart J-M, Pintiaux A. Persistence of an intact endometrial matrix and vessels structure in women exposed to VA-2914, a selective progesterone receptor modulator. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4525-4531. Epub 2008 Aug.
55. Whiteman MK, Hillis SD, Jamieson DJ, Morrow B, Podgornik MN, Brett KM, Marchbanks PA. Inpatient hysterectomy surveillance in the United States, 2000-2004. *AM J Obstet Gynecol* 2008;198:34.e1-e7.
56. Dodin S, Lemay A, Maheux R, Dumont M, Turcot-Lemay L. Bone mass in endometriosis patients treated with GnRH agonist implant or denazol. *Obstet Gynecol* 1991;77:410-415.
57. Wang PH, Yang AH, Yuan CC, Lee WL, Chao HT. Uterine myoma after cessation of gonadotropin-releasing hormone agonist: ultrasound and histopathologic findings. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1998;61:625-629.
58. Pavlovich SV, Volkov NI, Buriev VA. Proliferative activity and level of steroid hormone receptors in the myometrium and myoma nodes in different phases of menstrual cycle. *Bull Exp Biol Med* 2003;136:396-398.
59. Nisolle M, Gillerot S, Casanas-Roux F, Squifflet J, Berliere M, Donnez J. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod* 1999;14:2844-2850.
60. Brandon DD, Bethea CL, Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Harrington MS, Erickson TE, Warner C, Keenan EJ, Clinton GM. Progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein are over expressed in human uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:78-85.
61. Harrison-Woolrych ML, Charnock-Jones DS, Smith SK. Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1179-1184.
62. Matsuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:293-299.
63. Carr BR, Marshburn PB, Weatherall PT, Bradshaw KD, Breslau NA, Byrd W, Roark M, Steinkampf MP. An evaluation of the effect of gonadotropin-releasing hormone analogues and medroxyprogesterone acetate on uterine leiomyomata volume by magnetic resonance imaging: a prospective, randomized, double blind, placebo-controlled, crossover trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1217-1223.
64. Zeng C, Gu M, Huang H. [A clinical control study on the treatment of uterine leiomyoma with gonadotrophin releasing hormone agonist or mifepristone] *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 1998;33:490-492.

65. Mizutani T, Sugihara A, Honma H, Komura H, Nakamuro K, Terada N. Effect of steroid add-back therapy on the proliferative activity of uterine leiomyoma cells under gonadotropin-releasing hormone agonist therapy. *Gynecol Endocrinol* 2005;20:80–83.
66. Murphy AA, Morales AJ, Kettel LM, Yen SS. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogestrone RU486: dose-response effect. *Fertil Steril* 1995;64:187–190.
67. Ohara N, Morikawa A, Chen W, Wang J, DeManno DA, Chwalisz K, Maruo T. Comparative effects of SPRM asoprisnil (J867) on proliferation, apoptosis, and the expression of growth factors in cultured uterine leiomyoma cells and normal myometrial cells. *Reprod Sci* 2007;14(8 Suppl):20–27.
68. Xu Q, Ohara N, Chen W, Liu J, Sasaki H, Morikawa A, Sitruk-Ware R, Johansson ED, Maruo T. Progesterone receptor modulator CDB-2914 down-regulates vascular endothelial growth factor, adrenomedullin and their receptors and modulates progesterone receptor content in cultured human uterine leiomyoma cells. *Hum Reprod* 2006;21:2408–2416.
69. Steinauer J, Pritts EA, Jackson R, Jacoby AF. Systematic review of mifepristone for the treatment of uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 2004;103:1331–1336 (review).
70. Chwalisz K, Perez MC, Demanno D, Winkel C, Schubert G, Eiger W. Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr Rev* 2005;26:423–438 (review). Erratum in: *Endocr Rev* 2005;26:703.
71. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004;364:1789–1799 (review).
72. Kyama CM, Mihalyi A, Simska P, Mwenda JM, Tomassetti C, Meuleman C, D'Hooghe TM. Non-steroidal targets in the diagnosis and treatment of endometriosis. *Curr Med Chem* 2008;15:1006–1017 (review).
73. Rodgers AK, Falcone T. Treatment strategies for endometriosis. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9:243–255 (review).
74. Han S, Sidell N. RU486-induced growth inhibition of human endometrial cells involves the nuclear factor- κ B signaling pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:713–719.
75. Kettel LM, Murphy AA, Morales AJ, Ullmann A, Baulieu EE, Yen SS. Treatment of endometriosis with the anti-progesterone mifepristone (RU486). *Fertil Steril* 1996;65:23–28.
76. Elger W, Bartley J, Schneider B, Kaufmann G, Schubert G, Chwalisz K. Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity. *Steroids* 2000;65:713–723 (review).
77. Mutter GL, Bergeron C, Deligdisch L, Ferenczy A, Glant M, Merino M, Williams AR, Blithe DL. The spectrum of endometrial pathology induced by progesterone receptor modulators. *Mod Pathol* 2008;21:591–598.

**B. OBJECTIFS
DE LA
RECHERCHE**

Les estroprogestatifs utilisés en contraception présentent des limitations d'utilisation en raison de leurs effets secondaires cardiovasculaires. L'utilisation des progestatifs seuls en contraception est alors souvent l'alternative proposée lorsque les moyens mécaniques ne sont pas souhaités. Les progestatifs utilisés seuls, que ce soit par voie orale ou non orale, sont souvent accompagnés de saignements fonctionnels indésirables qui altèrent la compliance à la contraception. Les modulateurs du récepteur de la progesterone et les antagonistes du récepteur, comme la mifépristone, possèdent des propriétés antigonadotropes, inhibitrices de l'ovulation et induisent des modifications endométriales permettant d'obtenir un effet contraceptif. Le VA2914, SPRM stéroïdien que nous étudions, présente des effets anti-ovulatoires chez l'animal (Reel *et al.* 1998)

Un des objectifs de notre étude est d'évaluer l'action antigonadotrope éventuelle du VA2914 dans l'espèce humaine et d'autre part, d'évaluer si cette action antigonadotrope potentielle est dose dépendante.

Le profil de saignement sous cette molécule n'est pas connu. Celui-ci sera donc observé ainsi que la tolérance clinique à la molécule.

L'impact endométrial des antagonistes du récepteur de la progesterone et des SPRMs est loin d'être complètement éclairci.

La caractérisation de l'endomètre sous VA2914 fait partie de nos objectifs.

Différents éléments impliqués dans le contrôle de l'intégrité endométriale et dans l'angiogenèse endométriale seront étudiés.

Ainsi, l'expression des récepteurs hormonaux ER, PR, AR, sera évaluée avant et en fin de traitement par VA2914 dans l'endomètre.

Les effets sur la vascularisation endométriale de cette molécule ne sont pas connus. L'étude de la vascularisation endométriale comprenant des aspects qualitatifs et quantitatifs, sera réalisée en cycle témoin et sous VA2914. L'intégrité de la MEC sera observée. Certains facteurs moléculaires impliqués dans la régulation des saignements endométriaux seront évalués (MMPs et TIMPs).

Les systèmes assurant le contrôle de la vascularisation endométriale et de sa maturation seront également examinés (VEGF et récepteur, angiopoïétines et récepteur).

**C. RESULTS
ET
PUBLICATIONS**

1. *Evaluation de l'administration continue de VA 2914 sur l'axe gonadotrope et sur l'endomètre : étude prospective randomisée portant sur 3 dosages différents versus placebo.*

Résumé de l'étude clinique (les détails figurent dans les articles ci-dessous) :

- *Méthode*

Nous avons réalisé une étude de phase II (test sur volontaires sains) multicentrique en double aveugle dont les objectifs principaux sont l'évaluation des effets sur l'axe gonadotrope et sur l'endomètre du VA2914, SPRM stéroïdien.

Cette étude porte sur 46 patientes présentant des cycles réguliers et ovulatoires.

Trois dosages de la substance sont étudiés : 2,5 ou 5 ou 10 mg sont administrés quotidiennement par voie orale versus placebo durant 3 mois.

Avant la randomisation, les patientes sont évaluées pendant 1 mois (cycle témoin). Une échographie pelvienne par voie vaginale est organisée au 11^{ème} jour du cycle témoin évaluant l'épaisseur de l'endomètre et son aspect, 3 dimensions ovariennes, le nombre de follicules et leurs dimensions, 3 dimensions utérines. Une biopsie endométriale est réalisée 6 à 8 jours après le pic de la LH et une biologie est réalisée aux 2^{ème} (biologie générale et évaluation hormonale) et 21^{ème} jours du cycle (dosage de la progestérone).

Au cours du 3^{ème} mois de traitement versus placebo, l'échographie est réalisée au 11^{ème} jour du cycle ainsi que le jour de la biopsie endométriale, c'est-à-dire 6 à 8 jours après le pic de la LH ou au 21^{ème} jour en l'absence de pic. Des prélèvements sanguins sont réalisés 2 fois par semaine, du 3^{ème} au 24^{ème} jour du troisième cycle de traitement.

Le pic de la LH est détecté au moyen d'un dosage urinaire.

Le critère d'anovulation est défini par un taux de progestérone inférieur à 3 ng/ml.

Un recueil quotidien de données est réalisé par la patiente concernant d'éventuels saignements ou effets secondaires.

Après randomisation des 46 patientes, 11 constituent le groupe placebo, 12 le groupe traité par 2,5 mg de VA2914, 12 le groupe sous 5 mg et 11 le groupe sous 10 mg de VA2914.

Figure 19 : Résumé du Calendrier de l'Etude Clinique

| STUDY SCHEDULE | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|--------------------------|----------|-------------|--------------------------|---|--|-------------|----------------------|-----------------------------|
| Study Procedure | Screening Visit | Baseline Cycle (28 days) | | | Randomization Visit | Treatment Cycles (3 x 28 days) | | | Post-Treatment Cycle | |
| | | D2 (±1) | D11 (±1) | Day LH +6/8 | | Cycles 1 & 2 | Cycle 3 | | | |
| Cycle Day | | | | | D1 or D2 of Cycle 1 (±1) | | D11 (±1) | Day LH +6/8 | D24 (±1) | D30/45 (End-of-Study Visit) |
| Visit Name | S | B1 | B2 | R | | DB1 | DB2 | | ES | |
| Study Medication | | | | | Allocation | 1 tab every morning starting at D2 of cycle 1 | | | | |
| Home Diary | | <----> | | | <----> | <----> | | | <----> | |
| Home Urine LH Monitoring | | <----> (up to D20) | | | | <----> (up to D20) | | | | |
| Informed Consent | X | | | | | | | | | |
| Ancillary Protocol Consent | X | | | | | | | | | |
| Eligibility | X | | | | X | | | | | |
| Demographics | X | | | | | | | | | |
| Medical/Surgical & Gynecological History | X | | | | | | | | | |
| Vital Signs (a) | X | | | | | X | | | X | |
| Physical Examination | X | | | | | X | | | X | |
| Gynecological Examination | | X | | | | X | | | X | |
| Cervical Mucus Sample | | X | | | | X | | | | |
| Pap Smear (if last pap smear > 1 year ago) | | X | | | | | | | | |
| Transvaginal Ultrasound | | X | | | | X | X | | X | |
| Blood Sample (b) | Laboratory Exams (c) | X | | | | | X | | X | |
| | Hormone Analysis (d) | X | | | | | D3, D7, D11, D14, D18, D21, D24, D28 (f) | | | |
| | Progesterone | | X | | | | | | X | |
| | Drug Assay | | | | | | D3 | | | |
| Endometrial Biopsy (Ancillary Protocol for cycle 3) | | | X | | | | | X | | |
| Urine Pregnancy Test (hCG) (e) | | | | X | | | | | | |
| Prior and Concomitant Medication | X | X | X | X | | X | X | | X | |
| Bleeding & Menstrual Cycle Length | | X | | | | X | | | X | |
| Adverse Event reporting | | X | X | X | | X | X | | X | |
| Study Medication reporting | | | | | | X | X | | X | |
| Subject Status | | | | X | | | | | X | |
| Return of fertility follow-up | | | | | | | | | X | |

Notes:

(a) Blood pressure, heart rate and temperature

(b) Fasting conditions

(c) Liver and renal function, CBC, cholesterol, fasting glucose, triglycerides, electrolyte profile

(d) For Baseline (Day 2): E2, progesterone, LH, FSH, cortisol, testosterone, TSH and prolactin.

For Cycle 3 (at Day 3): Cortisol and testosterone

For Cycle 3 (2 times a week): E2, progesterone, LH, FSH

(e) If pregnancy suspected, blood sample will be done for pregnancy test

(f) If day LH +6/8 doesn't fall in the mentioned days (e.g. D20), blood sample will be done at this day (D20 instead of D21)

Une analyse histologique classique sera réalisée pour toutes les biopsies endométriales. La prolifération sera estimée par la recherche de l'antigène Ki 67, corrélé à l'index mitotique mais sans spécificité par rapport à la phase du cycle cellulaire et par l'utilisation d'anticorps antihistone H3 phosphorylée, marqueur de prolifération spécifique de la mitose (utilisation d'un anticorps marquant l'histone H3 lorsqu'elle devient phosphorylée sur la sérine 10 en début de prophase de mitose et ceci jusqu'en fin de télophase). La corrélation du marquage histone phosphorylée/index mitotique est supérieure à la corrélation Ki 67/index mitotique (Brenner *et al.* 2003).

- *Résultats de l'Etude Clinique*

a) Effets sur l'axe gonadotrope

L'inhibition de l'ovulation définie par un taux de progestérone inférieur à 3 ng/ml est obtenue chez 81,8 % des patientes sous 5 mg de VA2914 administré quotidiennement et chez 80 % des patientes sous 10 mg/j. Dans le groupe des patientes traitées par 2,5 mg, seulement 9,1% présentent une inhibition de l'ovulation. Si durant le 3^{ème} cycle de traitement, les taux de la FSH sont en moyenne plus bas dans les groupes 5 et 10 mg et chez les patientes anovulatoires sous 2,5 mg, ils ne présentent pas une inhibition importante comme observée lors de l'utilisation de progestatifs antigenadotropes. Le taux d'estriadiol est maintenu durant toute l'étude dans des valeurs de phase folliculaire physiologique et ce dans les différents groupes traités. Les taux de la LH sont maintenus dans le même ordre de valeur dans les différents groupes traités. Néanmoins, il existe une élévation temporaire de la LH chez 4 patientes sous 5 ou 10 mg qui ne présenteront pas d'augmentation du taux de progestérone.

b) Profil des saignements et tolérance clinique

Une aménorrhée est observée chez 90 %, 81 % et 36,4 % des patientes sous 10 mg, 5 mg et 2,5 mg de VA2914 respectivement. Chez les patientes traitées conservant des cycles, le nombre de jours de saignement décroît au cours du traitement et cela de façon dose dépendante. Des effets secondaires tels que céphalée, acné, mastodynies, douleur pelvienne apparaissent un peu plus fréquemment sous la thérapeutique par rapport au groupe placebo.

c) Aspects échographiques

L'épaisseur endométriale n'apparaît pas modifiée significativement au cours du traitement par rapport à l'endomètre mesuré en phase folliculaire. Chez les patientes sous 2,5 ou 5 mg de VA2914, qui présentent des cycles ovulatoires, l'évolution échographique de l'endomètre au cours du 3^{ème} mois de traitement est semblable à celle observée sous placebo (aspect en grain de café en phase folliculaire et aspect hyperéchogène en phase lutéale). Chez les patientes présentant un cycle anovulatoire, l'aspect typique de la phase folliculaire est observé de façon constante. Chez les patientes sous 10 mg de VA2914 quotidiennement, l'aspect endométrial échographique ne dépend pas du statut ovulatoire du cycle et présente un aspect typique de phase folliculaire. Chez 8 patientes traitées sur 20, il est décrit un aspect particulier comportant 2 couches endométriales hyperéchogènes séparées par une lame hypoéchogène (relecture rétrospective des échographies de 3 centres sur 4).

Le développement folliculaire observé échographiquement n'apparaît pas inhibé sous la thérapeutique. 54,5 % des patientes sous 2,5 mg de VA2914 présentent au moins 1 follicule de diamètre supérieur à 14 mm, 63,6 % des patientes sous 5 mg et 60 % dans le groupe sous 10 mg également. Des kystes ovariens ont aussi été observés au cours de l'étude (supérieurs à 30 mm : 1 patiente dans le groupe placebo, 1 patiente sous 2,5 mg de VA2914, 4 patientes sous 5 mg et 3 patientes sous 10 mg). Tous les kystes, à l'exception d'un, vont spontanément disparaître alors que le traitement est maintenu. Le kyste persistant s'avérera être une lésion endométiotique après résection cœlioscopique.

d) Histologie endométriale

L'aspect histologique de l'endomètre, après 3 mois de traitement par 2,5 ou 5 ou 10 mg de VA2914 quotidiennement, apparaît le plus souvent sécrétoire. Un aspect de dilatation glandulaire kystique est observé chez 1 patiente sous 2,5 mg et chez 1 patiente sous 10 mg présentant un cycle anovulatoire (3^{ème} mois de traitement). Un polype a été décrit chez une patiente sous 2,5 mg de VA2914 au 3^{ème} cycle de traitement. Aucune atypie n'a été mentionnée. La dilatation kystique observée a été qualifiée d'"aspect kystique inactif" comportant un stroma dense, des glandes dilatées, un épithélium glandulaire cubique, non sécrétoire ou d'aspect sécrétoire précoce comportant des mitoses.

La prolifération cellulaire estimée après marquage de l'antigène Ki67 et de l'histone H3 phosphorylée est observée de façon persistante dans le stroma quelle que soit la phase du

cycle physiologique et le traitement. Au cours du cycle physiologique, la prolifération cellulaire s'annule dans l'épithélium glandulaire en phase lutéale tardive. Chez les patientes traitées par VA2914, la prolifération s'annule en phase lutéale en cas d'ovulation mais persiste de façon minime en cas d'anovulation (Chabbert-Buffet 2006)(Chabbert-Buffet N , 2006).

En conclusion : cette étude, évaluant pour la 1^{ère} fois les effets du VA2914 (administré par voie orale et quotidiennement) sur l'axe gonadotrope dans l'espèce humaine, montre dans 80 % des cas, un effet anovulatoire à partir de 5 mg, sans modification significative des taux de base des gonadotrophines et sans inhibition du taux d'oestradiol.

L'aménorrhée est obtenue chez plus de 90% des patientes sous 5 ou 10 mg. Le développement folliculaire n'est pas inhibé. L'épaisseur endométriale échographique n'apparaît pas augmentée mais ne présente pas d'aspect linéaire typique de l'atrophie observé sous progestatif seul. L'histologie endométriale est en faveur d'un aspect sécrétoire dans la majorité des cas. Néanmoins, un endomètre kystique inactif est décrit chez 2 patientes.

Aucun effet indésirable important aux doses testées à court terme n'est apparu.

Cette étude a fait l'objet d'une publication.

Effects of the Progesterone Receptor Modulator VA2914 in a Continuous Low Dose on the Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Endometrium in Normal Women: A Prospective, Randomized, Placebo-Controlled Trial

Nathalie Chabbert-Buffet, Axelle Pintiaux-Kairis, and Philippe Bouchard, on behalf of the VA2914 Study Group*

Department of Obstetrics, Gynecology, Reproductive Medicine, and Public Health (N.C.-B.), Hospital Tenon, 75020 Paris, France; Equipe d'Accueil 1533 (N.C.-B., P.B.), Institut Fédératif de Recherche and University Pierre and Marie Curie, 75005 Paris, France; Department of Obstetrics and Gynecology (A.P.-K.), University of Liege, 4000 Liege, Belgium; and Endocrinology Unit (P.B.), Hospital Saint Antoine, 75012 Paris, France

Context: Progestin-only pills, the main hormonal alternative to ethynodiol-containing pills in women bearing vascular risk factors, are poorly tolerated due to irregular bleeding. In contrast, progesterone receptor modulators can inhibit ovulation, alter endometrial receptivity, and improve cycle control.

Objective: We evaluated the effects of a new progesterone receptor modulator, VA2914, administered continuously for 3 months, on ovulation and endometrial maturation.

Design, Settings, and Patients: Forty-six normal women were included in a prospective, placebo-controlled, randomized trial, conducted in four referral centers.

Intervention: VA2914 (2.5, 5, or 10 mg/d) was administered continuously for 84 d. Pelvic ultrasound (treatment d 67 and 77), hormonal monitoring (FSH, LH, estradiol, and progesterone on treatment d 59, 63, 67, 70, 74, 77, 80, and 84), and endometrial biopsy (treatment d 77) were performed.

Main Outcome Measure: Ovulation inhibition was assessed by the absence of progesterone values above 3 ng/ml at any time during treatment month 3.

Results: Anovulation was observed in 81.8% women in the 5-mg group and 80% in the 10-mg group, and amenorrhea occurred in 81.2 and 90% of cases in the 5- and 10-mg groups. We did not detect any cases of endometrial hyperplasia despite estradiol levels that remained in the physiological follicular phase range throughout treatment cycle 3.

Conclusions: Continuous low-dose VA2914 can induce amenorrhea and inhibit ovulation without down-regulating estradiol levels or inducing endometrial hyperplasia in normal women. Long-term studies with a larger population are required to confirm the contraceptive efficacy of this regimen. (*J Clin Endocrinol Metab* 92: 3582-3589, 2007)

UNTIL RECENTLY TWO main hormonal concepts have been used for the development of hormonal birth control: combined oral contraceptives (COCs), containing ethynodiol (EE), and progestin-only contraceptive methods. COCs suppress gonadotropins by a dual-blockade mechanism, with progestin acting via the hypothalamus, and EE at the pituitary level. Secondarily, follicular development does not occur beyond the small antral follicle stage. Because of the vascular and metabolic side effects of EE, COCs cannot be used in women with vascular risk factors. Progestin-only contraceptive methods are devoid of vascular and metabolic side effects. Their contraceptive effect is due to suppression of the LH surge (although not observed with all compounds), endometrial desynchronization, and alteration of cervical

mucus. Progestin-only contraceptive use is associated with high discontinuation rates [up to 25% of women (1)] due to irregular bleeding. Because the prevalence of women with increased vascular risk is expected to increase in the coming decades, the development of effective, vascular risk-free (*i.e.* estrogen free), well-tolerated contraceptive methods is crucial.

Progesterone receptor modulators (PRMs) with mild or potent antiprogestin activity are a class of progesterone receptor ligands that may exert contraceptive activity by different mechanisms, including blockade of ovulation and endometrial desynchronization (2-4). Mifepristone (5) was the first PRM to be used in women and has been evaluated for contraceptive use (6-9). Low doses (up to 2 mg/d) cause a delay in ovulation and/or disturb the endometrial maturation without marked effects on follicular development (10). Its use is associated with good contraceptive efficacy although there is limited experience reported. Higher doses usually suppress follicular development (6, 11, 12). Finally, long-term use of RU 486 has been associated with increased endometrial thickness, in part due to excessive gland development without hyperplasia (13).

First Published Online June 19, 2007

* See Acknowledgments for members of the VA2914 Study Group.

Abbreviations: COC, Combined oral contraceptive; CV, coefficient of variation; E2, estradiol; EE, ethynodiol; P, progesterone; PRM, progesterone receptor modulator; US, ultrasound.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

VA2914 is an orally active steroid PRM initially developed by the National Institutes of Health (Contraceptive Development Branch) under the name of CDB-2914. VA2914 demonstrates potent progestrone antagonist activity *in vitro* and *in vivo* (14). However, its binding and antagonist potency with respect to the glucocorticoid receptor is significantly reduced, compared with that of mifepristone, indicating that VA2914 belongs to a new class of dissociated PRMs that have reduced antiglucocorticoid activity (15, 16). The pharmacological effects of VA2914 have been examined in a variety of animal models, and the compound has been shown to exhibit antifertility activity during continuous low-dose administration (17–19). This compound is currently being evaluated for treatment of uterine leiomyoma and contraception.

We report the first prospective, randomized, controlled trial using VA2914 for ovulation inhibition. Three doses of VA2914 (2.5, 5, 10 mg/d) were administered continuously for 3 month and compared with placebo.

Subjects and Methods

Subjects studied

Women in good general health, aged 18–35 yr, were eligible for enrollment if they had regular menstrual cycles of 25–32 d in length, accepted the use of condoms, or were not sexually active. Exclusion criteria included pregnancy; use of oral contraception, intrauterine device, or other hormonal treatment (including herbal and homeopathic medication); use of agents known to induce hepatic P450, cardiovascular, hepatic, renal, or gastrointestinal disorder; metrorrhagia; cancer; depression; mental illness; epilepsy; migraines; and overweight or underweight women (body mass index < 16 or > 28 kg/m²).

Study design

This prospective, randomized, double-blind study was conducted at the Endocrine Unit of Hospital Saint Antoine and the Department of Obstetrics and Gynecology at Hospital Antoine Béclère (Clamart, France) as well as two clinical sites within the Department of Obstetrics and Gynecology at Liege University (Belgium) from October 2004 to April 2005.

The study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki, and the ethics committees of St. Antoine Hospital and Liege University approved the study protocol. Participants were recruited by community advertisements and primary care providers.

Due to the exploratory objectives of the study, the sample size was not based on statistical considerations but on usual practices in similar exploratory phase II studies. To obtain complete data from 10 women for each arm of the study, we set out to enroll 12 subjects per treatment group, thus a total inclusion of 48 subjects. Randomization was performed in blocks of four and stratified by study site to ensure even distribution of the treatment groups.

HRA Pharma (Paris, France) provided VA2914 (2.5, 5, and 10 mg) and placebo formulated in matching tablets in identical packaging, and funded all study-related expenses.

After having provided informed consent, participants were included in a pretreatment cycle designed to document normally ovulating spontaneous cycles and screen for exclusion criteria. Each participant received a home study card to complete daily with information on vaginal bleeding, side effects, treatment intake, concomitant treatments, and home urinary LH surge monitoring (Dectra Pharm, Strasbourg, France). Bleeding episodes were recorded as lighter than, similar to, or heavier than a normal period, with light bleeding within 2 d of an endometrial biopsy disregarded for analysis purposes.

Volunteers exhibiting an ovulatory baseline cycle (luteal phase $P > 3$ ng/ml on d 21) and normal transvaginal ultrasound (on d 21), normal laboratory exams, and negative urinary human chorionic gonadotropin were randomized. Treatment was started on the first or second day of menstrual bleeding after the baseline cycle and taken daily in a contin-

uous fashion for 84 d. Participants were instructed to return their treatment packs at the end of the study to confirm compliance.

To determine the effects of the compound on cervical mucus, the Insler score (composite score of volume, elasticity, and Spinnbarkheit or ability to fern) was evaluated on treatment d 67 and compared with baseline (cycle d 11).

Endometrial biopsies were performed using a pipelle (CCD) and a cervical dilatator (Os Finder, Medsys SA, Gembloux, Belgium). Endometrial biopsies were scheduled 6–8 d after the LH surge during the baseline cycle as well as on treatment d 77 in the absence of a detectable urinary LH surge or 6–8 d after the LH surge between treatment d 57 and 84.

Pelvic ultrasounds were performed twice during treatment (d 67 and 77 or on the day of the endometrial biopsy) to determine ovarian size and structure, number and size of follicles, and endometrial thickness.

Blood samples were collected for the baseline cycle and treatment d 59 to determine biochemical and hematological markers as well as concentrations of serum cortisol, TSH, and prolactin. Blood samples were taken on d 3 and 21 of the baseline cycle and on treatment d 59, 63, 67, 70, 74, 77, 80, and 84 to measure serum estradiol (E2), FSH, LH, and progesterone (P). Concentrations of VA2914 and its principal metabolite (VA 3877A) were measured on treatment d 59 and 80. Samples were collected between 0800 and 0900 h before drug intake.

Hormonal analysis

Serum FSH and LH concentrations were measured by sensitive fluoroimmunoassays (AutoDelphia; Wallac, Inc., Turku, Finland). FSH, within- and between-assay coefficients of variation (CVs) were 1.3 and 1.5%, respectively, at the level of 2 IU/liter. The detection limit was 0.01 IU/liter. For LH at the level of 0.3 IU/liter, CVs were 6.7 and 1.8%, respectively. The detection limit was 0.01 IU/liter.

E2 was measured by a direct RIA using Diasorin reagents (Anthony, France). The cross-reactivity of estrone and estriol was only 0.6%. CVs at the level of 50 pmol/liter were 3.6 and 10.4, respectively, and at the level of 260 pmol/liter, 2.9 and 6.8%, respectively.

P was measured by RIA using CIS Biointernational reagents (Gif sur Yvette, France). The only significant cross-reacting steroids were: deoxycorticosterone, 6.2%; 20 α -dihydroprogesterone, 2.2%; and 6 β -dihydroprogesterone, 2.1%. CVs at the level of 10 ng/ml were 3.5 and 4.5, respectively, and at the level of 18.8 ng/ml, 4.4 and 4%, respectively.

Plasma concentrations of VA2914 and VA3877A, the compound's main monodemethylated biologically active metabolite (16), were determined by Aster-Cephal (St. Benoit, France) using a fully validated bioanalytical method that couples HPLC with tandem mass spectrometry (20).

Endometrial samples analysis

Endometrial biopsy samples were fixed in formalin and processed for routine light microscopy. Specimens were evaluated in a blinded fashion by two independent pathologists who dated by standard criteria (21, 22) and classified them as proliferative or early (d 17–19), mid- (d 20–22), or late (d 24–26) secretory according to the Noyes criteria (21, 22). When difficulties in biopsy dating were noted, unusual findings were written by pathologists in a specific comments section.

Data analysis and statistical methods

The primary outcome measure for this pilot trial was the absence of P levels above 3 ng/ml (23) at any time between treatment d 57 and 84 (absence of luteal function).

Secondary outcome measures included the following clinical and biological parameters measured after 84 d of treatment, analyzed in comparison with control cycles: cycle length, menstrual bleeding patterns, follicular and luteal phase levels of plasma E2 and P, diameter of the dominant follicle (ultrasound), endometrial maturation based on ultrasound (endometrial thickness and echo pattern), and biopsy.

Finally, this trial also aimed to characterize the steady-state pharmacokinetics of VA2914 on chronic administration.

Analyses of the treatment effect were performed for all randomized subjects that completed the study (84 d of treatment) for whom primary efficacy data were available (efficacy valuable population). Analyses

were repeated for the per-protocol population after exclusion of major protocol deviations. Analyses of safety data were performed for all randomized and treated subjects that received at least one dose of study medication (safety valuable population).

A pair-wise comparison of the proportion of subjects without ovulation was performed between each of the three VA2914 treatment groups vs. placebo using a Fisher's exact test, after a Hochberg procedure for multiplicity to maintain the overall type I error to 0.05. In addition, a Jonckheere-Terpstra trend test was used to evaluate whether the treatment effect was correlated with the dose of VA2914 administered. Comparison of the secondary outcome criteria and safety parameters were performed between treatment groups using a Fisher exact test for categorical variables and a Kruskall-Wallis test for continuous variables. All statistical analyses were performed using two-tailed tests at a 5% significance level. Data management and statistical analyses was performed by Altizem (Nanterre, France) using Oracle Clintrial (SAS, Cary, NC).

Results

Demographic data and treatment compliance

Forty-six healthy women participated in the study, and the four groups were evenly balanced (Table 1).

Pharmacokinetics

Plasma levels of VA2914 and its metabolite VA 3877A increased in a dose-dependent manner as shown in Table 2.

Effects on the pituitary ovarian axis

The threshold dose for inhibition of ovulation was 5 mg/d group (Table 3). A statistically significant dose-dependent trend was observed ($P < 0.001$).

E2 levels remained in the physiological follicular phase range in all groups and were not down-regulated (Fig. 1A). FSH levels were normal (Fig. 1B). No statistical difference between groups was observed.

LH levels were not low (Fig. 1C). Persistently low levels of progesterone (*i.e.* <3 ng/ml) were observed in most subjects in the 5- and 10-mg groups, although a temporary rise in LH levels was observed in four women (Fig. 1D).

No statistically significant impairment of follicular growth was observed on ultrasound (US) scan. In fact, at least one growing follicle (diameter > 14 mm) was observed on treatment d 67 and 77 in 54.5% women in the 2.5-mg group, 63.6% women in the 5-mg group, and 60% women in the 10-mg group ($P = \text{ns}$ vs. placebo for each treatment group). Ovarian cysts (>30 mm) occurred in one patient in the placebo group, one patient in the 2.5-mg/d group, four patients in the 5-mg/d group, and three patients in the 10-mg/d group. All cysts but one spontaneously resolved, whereas treatment was maintained. In one patient, who became pregnant shortly afterward, the cyst was still present at the end-of-

study visit. It was subsequently diagnosed as an endometrioma during laparoscopy performed after delivery.

Cervical and endometrial effects

No significant modification of the Insler score was observed in treated women, compared with baseline (data not shown).

Amenorrhea rates and mean bleeding days per month for each treatment group are presented in Table 3. Bleeding days decreased with successive month of treatment, with amenorrhea in nearly all subjects in the 5- and 10-mg groups by treatment months 2 and 3. Breakthrough bleeding was reported in four women in the placebo group, four women in the 2.5-mg group, three women in the 5-mg group, and one woman in the 10-mg group.

Endometrial appearance on US did not show any polyps or thickening, compared with baseline, and there was no significant difference between treatment groups in terms of endometrial thickness (Table 3). In terms of echo pattern, a constant three-layer appearance was associated with inhibition of ovulation in treated women. This specific three-layer pattern included two hyperechogenic layers delineating a hypoestrogenic pattern, reminiscent of secretions in the uterine cavity.

Endometrial histology is summarized in Table 3. The degree of concordance between the two pathologists was 75%. The biopsies predominantly showed usual patterns of a secretory endometrium in the 2.5-, 5-, and 10-mg treatment groups, even in women with progesterone levels consistently less than 3 ng/ml throughout the treatment d 57–84 period. The glands exhibited cystic glandular dilatation for one patient in the 10-mg group and one in the 2.5-mg group (Fig. 2). Both of these individuals had persistently low levels of progesterone. Polyps were diagnosed in one woman at baseline and in one woman in the 2.5-mg group during treatment, but neither of them was detectable on US nor showed any atypia.

Safety

Reported physical side effects are shown in Table 4. There were no blood pressure changes or weight gain.

Laboratory exams (liver function, electrolyte profile, creatinine, blood sugar, total cholesterol, and triglycerides) as well as serum cortisol, prolactin, and testosterone values showed no appreciable variation between baseline and after 84 d of treatment (data not shown).

Two cases of hyperthyroidism were reported during the trial, both in the 5-mg group. Both women were subsequently found to have had a subclinical disease (abnormal TSH and thyroid antibodies) before enrollment.

Discussion

VA2914 provided a high level of anovulation (*i.e.* absence of luteal function) in the 5- and 10-mg groups (81.8 and 80%, respectively) without suppression of gonadotropin secretion as shown in Fig. 1. This PRM effect comes in contrast with what is commonly observed with progestins (24–26). Within the limits of our study, and in particular with the sampling

TABLE 1. Patient characteristics

| | Placebo (n = 11) | 2.5 mg (n = 11) | 5 mg (n = 11) | 10 mg (n = 10) |
|--------------------------------|---------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Origin | | | | |
| Caucasian (n) | 11 | 11 | 11 | 9 |
| Other (n) | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Age (yr, mean) | 26.1 | 23.8 | 27.6 | 26.4 |
| BMI (kg/m ² , mean) | 20.7 | 21.9 | 20.5 | 22.3 |
| Cycle length (d) | 28.8 | 28.8 | 28.2 | 28.4 |

BMI, Body mass index.

TABLE 2. Compound pharmacokinetics during treatment month 3

| | Placebo (n = 11) | 2.5 mg (n = 11) | 5 mg (n = 11) | 10 mg (n = 10) |
|-----------------------|---------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| Treatment d 59 | | | | |
| VA 2914 (ng/ml) | | | | |
| Mean (± SD) | 0 | 6.9 (11.8) | 7.9 (6.6) | 15.9 (21.9) |
| Range | | 0.7–38.8 | 0.4–19.9 | 4.0–66.8 |
| VA2914 +3877A (ng/ml) | | | | |
| Mean (± SD) | 0 | 8.9 (14.9) | 11.1 (9.3) | 21.1 (28.4) |
| Range | | 0.8–49.3 | 0.7–29.6 | 5.4–87.5 |
| Treatment d 80 | | | | |
| VA 2914 (ng/ml) | | | | |
| Mean (± SD) | 0 | 4.7 (5.8) | 15.3 (24.2) | 18.7 (21.2) |
| Range | | 0.8–19.3 | 1.0–71.9 | 4.1–39.7 |
| VA2914 +3877A (ng/ml) | | | | |
| Mean (± SD) | 0 | 6.3 (7.4) | 18.3 (28.1) | 25.6 (28.6) |
| Range | | 0.9–24.2 | 1.1–87.1 | 2.7–76.7 |

Concentrations of VA 2914 and its main metabolite 3877A are indicated.

protocol, transient increases in LH levels were observed in four women, in whom increases in P were absent (Fig. 1E). These LH increases may be inappropriate, in duration, kinetics, or timing in relation to follicular maturation, and are suggestive of an out-of-phase low LH response that has been associated with anovulation or luteinized unruptured follicle (27). The absence of a follicular response to an LH increase may also be related to a direct ovarian effect already described in the rat (28) as well as in women. In normal volunteers, mifepristone seems to act on FSH action, oocyte maturation, and granulosa cell function (29–32).

One of the key features of our study is the maintenance of follicular phase levels of E2 in treated women. This is indeed a significant advantage as far as clinical tolerance and bone fractures are concerned. This is in contrast to the consequences of using high-dose progestins (33).

The contraceptive effects of PRMs have been evaluated in several studies. The effects of mifepristone appear to be dose dependent: daily doses of 2–10 mg mifepristone suppress follicular development, block the LH surge, and delay ovulation (10,34), with no pregnancies reported after 200 months in 50 women who received either 2 or 5 mg mifepristone daily as their only contraceptive method (8), whereas lower doses are usually inefficient (35). Administration of daily doses of 10–100 mg asoprisnil for 28 d (36) resulted in an increase in cycles length that was proportional to the dose of asoprisnil. In contrast with mifepristone, the effects on ovulation were inconsistent and lacked dose dependency. This is also in contrast with the results observed for VA2914.

Endometrial effects of PRMs are still a subject of contention because of the potential unopposed effect of persistent follicular phase levels of E2. Amenorrhea is induced in most

TABLE 3. Effects of VA 2914 on luteal function and endometrial maturation

| | Placebo (n = 11) | 2.5 mg (n = 11) | 5 mg (n = 11) | 10 mg (n = 10) |
|-------------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Anovulation rate, % (P vs. placebo) | 0 | 9.1 (NS) | 81.8 (P < 0.001) | 80.0 (P < 0.001) |
| Amenorrhea (%) | | | | |
| M1 | 0 | 3 (27.3) | 7 (63.3) | 8 (80) |
| M2 | 0 | 4 (36.4) | 9 (81.8) | 9 (90) |
| M3 | 0 | 2 (18.2) | 9 (81.8) | 9 (90) |
| Mean duration of bleeding (d) | | | | |
| M 1 | 5.6 | 4.8 | 5 | 3.9 |
| M 2 | 5.6 | 4.7 | 1.4 | 1.4 |
| M 3 | 6.4 | 4.2 | 1.25 | 0.3 |
| Endometrial thickness (mm) | | | | |
| Mean (± SD) | | | | |
| Baseline | 5.2 (1.9) | 5.8 (1.8) | 6.7 (3.8) | 6.7 (1.7) |
| Treatment d 67 | 5.8 (2.3) | 4.8 (2.7) | 6.7 (1.6) | 5.5 (2.0) |
| Treatment d 77 | 6.3 (2.5) | 5.7 (3.4) | 6.3 (2.3) | 5.4 (1.8) |
| Histology (treatment d 77), n (%) | Total | P < 3 ng/ml | Total | P < 3 ng/ml |
| Proliferative | 2 (18.2) | 2 | 3 (27.3) | 2 |
| Secretory | 6 (54.6) | 0 | 4 (36.3) | 3 |
| Atrophic | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Polyp | 0 | 0 | 1 (9.1) | 1 |
| No tissue | 3 (27.3) | 2 | 3 (27.2) | 2 |
| Histology (treatment d 77), n (%) | Total | P < 3 ng/ml | Total | P < 3 ng/ml |
| Proliferative | 1 (9.1) | 1 | 0 | 0 |
| Secretory | 10 (90.9) | 8 | 4 (40.0) | 3 |
| Atrophic | 0 | 0 | 2 (20.0) | 2 |
| Polyp | 0 | 0 | 0 | 0 |
| No tissue | 0 | 0 | 4 (40.0) | 3 |

Amenorrhea rates and mean duration of bleeding were determined according to the study card reports. Mild bleeding within 2 d of an endometrial biopsy was not included. Endometrial thickness was determined from transvaginal US scans performed on d 11 of the baseline cycle and treatment d 67 and 77. Histological analysis of endometrial biopsy samples was performed on d 6–8 after urinary LH surge for baseline cycle (data not shown) and on treatment month 3 (or on treatment d 77 in the absence of a urinary LH surge). M, Treatment month.

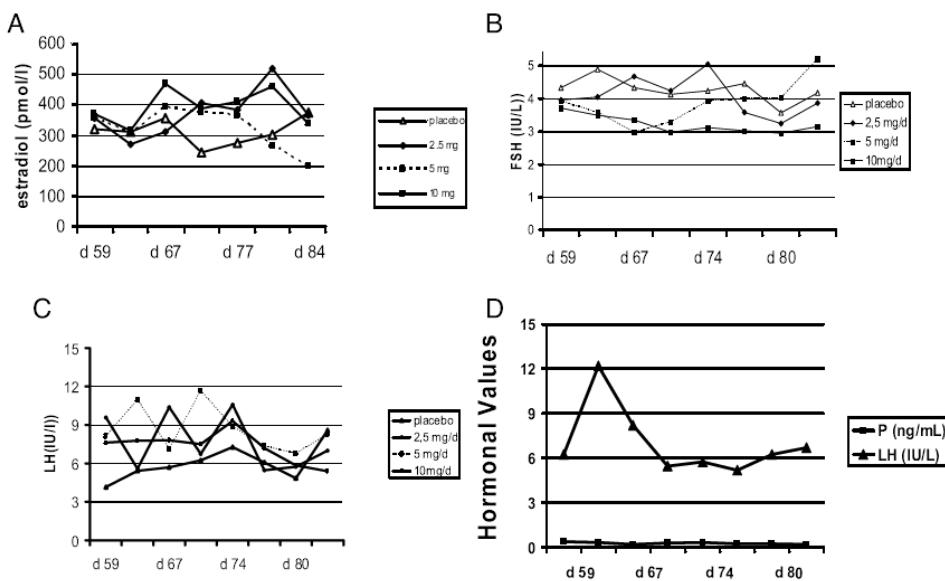


FIG. 1. Hormonal profiles during the third treatment month. Hormone assays were performed twice a week during treatment month 3 to determine E2 (A), FSH (B), and LH (C) levels. Comparison of mean hormone levels at treatment d 59, 63, 67, 70, 74, 77, 80, and 84 for all treatment groups *vs.* placebo did not show any statistically significant difference. D, Representative profile of persistently low P levels, despite the occurrence of a transient increase in LH levels during treatment month 3 in a subject receiving 5 mg VA2914.

studies, but histological data are controversial. In our study, bleeding patterns were excellent because 80 and 90% women were amenorrheic in the 5- and 10-mg/d groups, respectively, by treatment month 2. Very few days of spotting were reported by the participants. This may be a significant clinical advantage because once informed about the expected occurrence of amenorrhea during treatment, women may reach a high compliance rate (37).

The histological patterns were those of a normal cyclic endometrium and could be easily classified as proliferative, secretory, or atrophic endometrium, except for two subjects exhibiting cystic dilated glands. This aspect, which is specific to PRMs, has never been described before except during a trial with mifepristone (38) and very recently in a trial with asoprisnil (39). Secretory endometrium was also reported in women exhibiting low progesterone levels on the day of the endometrial biopsy, suggesting that the compound may also exert an agonistic action on the endometrium. The same aspects have been described with other PRMs [asoprisnil, the prototype of the so-called mesoprogesterins (39) and mifepristone at high dose as reported by Gravanis *et al.* (40) in women with inactive ovaries]. The impact of such a finding on the contraceptive efficacy is probably mild because the main effect of PRMs is to block the LH surge. In most studies ovulation does not occur in 80–90% of volunteers. Finally, although anovulation does not occur in all patients, no pregnancy was observed in the Baird study (8), suggesting that the effects on the endometrium and the inhibition of ovulation are synergistic into producing efficient contraception. Obviously more studies are needed to assess this effect. Two women in the placebo group had proliferative endometrium, in both cases due to mistiming of their ovulation schedule,

as is often the case in clinical trials. Samples without material obtained during treatment may be related to endometrial atrophy, defined as an endometrial thickness measured on US scan on the day of the endometrial biopsy less than 5 mm, according to the European Medicines Agency (41), for one subject in the placebo group, two subjects in the 2.5-mg group, and one subject in the 10-mg group. In other cases the lack of material may be related to operator failure. No specific patterns such as disordered architecture or abnormal vessels were present. Polyps without atypia were diagnosed on endometrial biopsies for the baseline cycle in one patient and in one patient from the 2.5-mg/d group, *i.e.* without any correlation with the dose of VA2914. There were no signs of endometrial hyperplasia in any of the specimens studied.

Very low doses of mifepristone (0.5–1 mg/d) induce a delay in endometrial maturation (42–44). The endometrium is inactive in women treated with low doses (2 or 5 mg) (7). These low doses of mifepristone are associated with a decrease in menstrual bleeding or even amenorrhea. Amenorrhea is probably related, at least in part, to the inhibition of ovulation (7, 8, 42). In long-term studies with mifepristone, endometrial hyperplasia has occasionally been observed. Simple endometrial hyperplasia was observed in 25% of women receiving 10 mg mifepristone daily for 6 months (13, 45) for the treatment of myoma. Administration of 1 mg mifepristone daily for 5 months was associated with increased endometrial thickness and dilated glands in 25 and 43% of the monophasic cycles, respectively (35). Mifepristone's endometrial effects are incompletely understood but need to be compared with studies of the endometrium, using contraceptive methods that do not suppress E2 production in long-term studies. Endometrial samples in our study did not

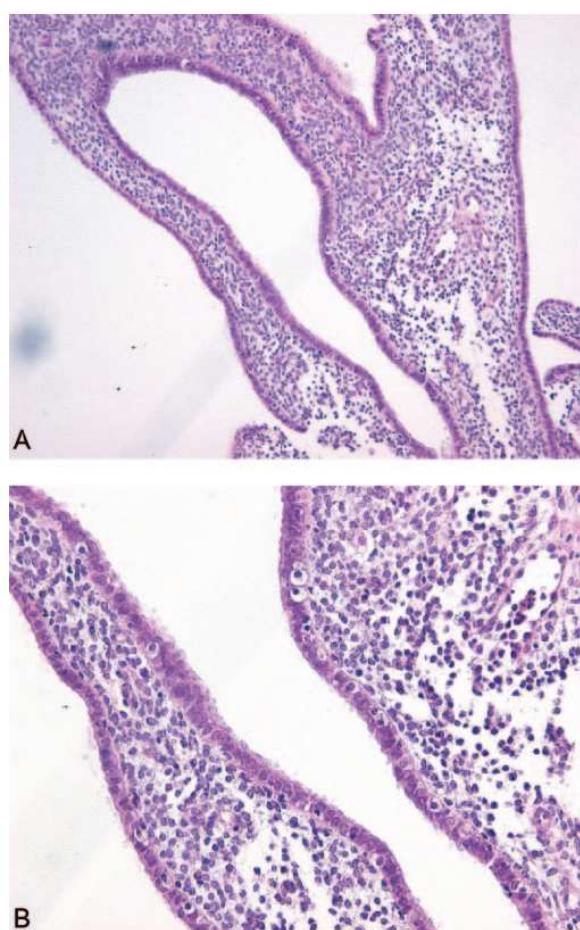


FIG. 2. Specific histological aspects observed during treatment with VA2914 for a HES-stained specimen. The cystic inactive aspect showing dilated glands with an inactive, nonpolarized epithelium was observed in two patients in this study. Magnification, $\times 100$ (A); $\times 200$ (B).

show the same appearance, but this may be related to the shorter treatment duration. Additionally the definition of a new histological classification may be useful to allow proper description of the aspects observed under PRM treatment. Such a modified classification has already been suggested (46) to allow a more accurate description of endometrial hyperplasia (47). In a recent expert meeting organized by the National Institutes of Health on the endometrial effects of PRMs, a panel of pathologists indicated that the current World Health Organization classification was not suitable to describe the nonphysiological secretory aspect observed during PRM treatment, including disordered architecture with desynchronization of glandular and stromal compartments, mixture of proliferative and secretory endometria with association of mitotic and apoptotic figures, mitotic and secretory aspects, and cystic glandular dilatation (McFarland, H., and D. Blithe, submitted for publication). In our study, nonphysiological secretory aspects were observed,

with a discrepancy between a compact stroma and glands with morphological characteristics of an early secretory phase. Occasionally, rare mitoses could be observed in these glands.

General side effects were those usually observed with oral contraceptives. Pelvic pain was reported to be moderate or mild in this study. It was associated with ovarian cysts larger than 30 mm in two women. All of the cysts had disappeared on treatment d 77 except for one, subsequently diagnosed as endometriotic. Functional cysts have been described with progestins and in a study using continuous mifepristone 1 mg/d (35) for inhibition of ovulation. In this study recording incomplete inhibition of ovulation, cysts occurred in 22% women and may be due to the incomplete suppression of gonadotropins. No clear relationship between gonadotropin levels and the occurrence of cysts was identified.

Acne was reported by 18 and 25% of women in the 5- and 10-mg/d groups, respectively. Although the lesions were considered to be mild, this frequency is significant. None of the patients in the placebo or 2.5-mg/d group reported acne. Interestingly none of the patients had a significant increase in testosterone levels, although LH levels were not low as previously mentioned. In addition, the affinity of VA2914 for the androgen receptor is very low, compared with other androgen receptor ligands (relative binding affinity, 15%, compared with dihydrotestosterone; Blye, R., unpublished data).

In this preliminary study, we clearly demonstrate that the threshold dose for ovulation inhibition with continuous low-dose VA2914 is 5 mg/d. This dose induces amenorrhea in more than 80% of women after 2 months of treatment, whereas E2 levels remain in the physiological follicular phase range. Importantly, endometrial biopsies always showed an absence of hyperplasia, although longer studies are necessary. General and gynecological safety data were satisfactory. Further studies with long-term follow-up are required to evaluate the contraceptive potential of low doses of VA2914 and their endometrial impact. Because of their excellent tolerance and their capacity to inhibit ovulation without suppressing endogenous E2, PRMs are leading candidates for EE-free contraception.

Acknowledgments

The VA2914 Study Group included: Axelle Pintiaux, Jean Michel Foidart, Crina Buicu, and Ulysse Gaspard, Department of Obstetrics and Gynecology, University of Liège, Liège, Belgium; Nathalie Bourcigau and René Frydman, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Antoine Béclère, Clamart, France; Nathalie Chabbert-Buffet, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Tenon, Paris, France; Lætitia Jacquesson and Philippe Bouchard, Endocrinology Unit, Hospital Saint Antoine, Paris, France; Najiba Lahou, Hormonology Unit, Hospital Saint Vincent de Paul, Paris, France; Christine Bergeron, Pasteur Cerba, Saint Ouen L'aumone, France; A. Williams, Department of Pathology, University of Edinburgh, Edinburgh, UK; Erin Gainer, HRA Pharma, Paris, France.

Received December 19, 2006. Accepted June 13, 2007.

Address all correspondence and requests for reprints to: Nathalie Chabbert-Buffet, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital Tenon, 4 Rue de la Chine, 75020 Paris, France. E-mail: nathalie.chabbert-buffet@tnn.aphp.fr.

This work was supported by HRA Pharma.

The study was registered (www.clinicaltrials.gov; ID NCT00456924).

TABLE 4. Adverse events (safety population)

| | Placebo (n = 11) | 2.5 mg (n = 12) | 5 mg (n = 12) | 10 mg (n = 11) | P (all groups vs. placebo) |
|--------------|---------------------|--------------------|------------------|-------------------|----------------------------|
| Headache | 2 (18.2) | 6 (50.0) | 5 (41.7) | 4 (36.6) | NS |
| Dysmenorrhea | 2 (18.2) | 3 (25.0) | 2 (16.7) | 1 (9.1) | NS |
| Acne | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 3 (25.0) | 2 (18.2) | 0.037 |
| Mastodynia | 0 (0.0) | 2 (16.7) | 1 (8.3) | 1 (9.1) | NS |
| Pelvic pain | 0 (0.0) | 1 (8.3) | 2 (16.7) | 1 (9.1) | NS |
| Leucorrhea | 1 (9.1) | 0 (0.0) | 1 (8.3) | 1 (9.1) | NS |
| Seborrhea | 0 (0.0) | 1 (8.3) | 1 (8.3) | 1 (9.1) | NS |
| Nausea | 1 (9.1) | 0 (0.0) | 2 (16.7) | 0 (0.0) | NS |
| Vomiting | 0 (0.0) | 2 (16.7) | 0 (0.0) | 1 (9.1) | NS |

NS, Not significant.

Disclosure Summary: E.G., a member of the VA2914 Study Group, is an employee of HRA Pharma, the pharmaceutical company that is developing VA2914 and sponsored this study. None of the other authors has any commercial relationship with HRA Pharma besides the funding of the study.

References

- Kovacs G 1996 Progestin-only pills and bleeding disturbances. *Hum Reprod* 11(Suppl 2):20-23
- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz IM 2005 Selective progestin receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Update* 11:293-307
- Spitz IM 2003 Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. *Steroids* 68:981-993
- Spitz IM, Chwalsz K 2000 Progesterone receptor modulators and progesterone antagonists in women's health. *Steroids* 65:807-815
- Philibert D, Deraedt R, Teutsch G, RU 38486: a potent antiglucocorticoid *in vivo*. Proc VII International Congress of Pharmacology, Tokyo, Japan, 1981, 668
- Baird DT, Brown A, Cheng L, Critchley HO, Lin S, Narvekar N, Williams AR 2003 Mifepristone: a novel estrogen-free daily contraceptive pill. *Steroids* 68:1099-1105
- Baird DT, Brown A, Critchley HO, Williams AR, Lin S, Cheng L 2003 Effect of long-term treatment with low-dose mifepristone on the endometrium. *Hum Reprod* 18:61-68
- Brown A, Cheng L, Lin S, Baird DT 2002 Daily low-dose mifepristone has contraceptive potential by suppressing ovulation and menstruation: a double-blind randomized control trial of 2 and 5 mg per day for 120 days. *J Clin Endocrinol Metab* 87:63-70
- von Herten H, Honkanen H, Piaggio G, Bartfai G, Erdenetungalag R, Gemzell Danielsson K, Gopalan S, Horgia M, Jerve F, Mittal S, Ngoc NT, Peregoousov A, Prasad RN, Pretnar Darovec A, Shah RS, Song S, Tang OS, Wu SC 2003 WHO multinational study of three misoprostol regimens after mifepristone for early medical abortion. I: Efficacy. *BJOG* 110:808-818
- Cameron ST, Critchley HO, Thong KJ, Buckley CH, Williams AR, Baird DT 1996 Effects of daily low dose mifepristone on endometrial maturation and proliferation. *Hum Reprod* 11:2518-2526
- Batista MC, Cartledge TP, Zellmer AW, Merino MJ, Axiotis C, Loriaux DL, Nieman LK 1992 Delayed endometrial maturation induced by daily administration of the antiprogestin RU 486: a potential new contraceptive strategy. *Am J Obstet Gynecol* 167:60-65
- Liu JH, Garzo G, Morris S, Stuenkel C, Ulmann A, Yen SS 1987 Disruption of follicular maturation and delay of ovulation after administration of the antiprogestrone RU486. *J Clin Endocrinol Metab* 65:1135-1140
- Steinauer J, Pritts EA, Jackson R, Jacoby AF 2004 Systematic review of mifepristone for the treatment of uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 103:1331-1336
- Gainer EE, Ulmann A 2003 Pharmacologic properties of CDB(VA)-2914. *Steroids* 68:1005-1011
- Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR 2004 *In vitro* antiprogestational/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 88:277-288
- Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR, Blye RP 2002 CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogestins with reduced antiglucocorticoid activity: *in vitro* comparison to mifepristone and CDB-2914. *Mol Cell Endocrinol* 188:111-123
- Hild SA, Reel JR, Hoffman LH, Blye RP 2000 CDB-2914: anti-progestational/anti-glucocorticoid profile and post-coital anti-fertility activity in rats and rabbits. *Hum Reprod* 15:822-829
- Larner JM, Reel JR, Blye RP 2000 Circulating concentrations of the antiprogestins CDB-2914 and mifepristone in the female rhesus monkey following various routes of administration. *Hum Reprod* 15:1100-1106
- Reel JR, Hild-Petito S, Blye RP 1998 Antiovulatory and postcoital antifertility activity of the antiprogestin CDB-2914 when administered as single, multiple, or continuous doses to rats. *Contraception* 58:129-136
- Gorog S, Babjak M, Balogh G, Brlik J, Dravecz F, Gazdag M, Horvath P, Lauko A, Varga K 1998 Estimation of impurity profiles of drugs and related materials: part 19: theme with variations. Identification of impurities in 3-oxosteroids. *J Pharm Biomed Anal* 18:511-525
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J 1950 Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1:3-25
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J 1975 Dating the endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 122:262-263
- Schwartz JL, Creinin MD, Pyman HC, Reid I 2002 Predicting risk of ovulation in new start oral contraceptive users. *Obstet Gynecol* 99:177-182
- Chwalsz K, Elger W, McCrary K, Beckman P, Larsen L 2002 Reversible suppression of menstruation in normal women irrespective of the effect on ovulation with the novel selective progesterone receptor modulator (SPRM) J 867. *J Soc Gynecol Investig* 9(Suppl 1):[abstract 49]
- Heikinheimo O, Gordon K, Williams RF, Hodgen GD 1996 Inhibition of ovulation by progestin analogs (agonists vs antagonists): preliminary evidence for different sites and mechanisms of actions. *Contraception* 53:55-64
- Spitz IM, Van Look PF, Coelingh Bennink HJ 2000 The use of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in contraception. *Steroids* 65:817-823
- Lewinthal D, Furman A, Blankstein J, Corenblum B, Shalev J, Lunenfeld B 1986 Subtle abnormalities in follicular development and hormonal profile in women with unexplained infertility. *Fertil Steril* 46:833-839
- Donath J, Michna H, Nishino Y 1997 Antiovulatory effect of the antiprogestin Onapristone could be related to down regulation of intraovarian progesterone receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62:107-118
- Heikinheimo O, Gordon K, Lahteenmaki P, Williams RF, Hodgen GD 1995 Antiovulatory actions of RU 486: the pituitary is not the primary site of action *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1859-1868
- Kazem R, Messinis IE, Fowler P, Groomie NP, Knight PG, Templeton AA 1996 Endocrinology: effect of mifepristone (RU486) on the pituitary response to gonadotrophin releasing hormone in women. *Br J Obstet Gynaecol* 93:592-595
- Messinis IE, Krishnan M, Kazem R, Khadilkar S, Templeton AA 1997 Effect of mifepristone on folliculogenesis in women treated with recombinant FSH. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:309-314
- Messinis IE, Templeton A 1988 The effect of the antiprogestin mifepristone (RU 486) on maturation and *in vitro* fertilization of human oocytes. *Br J Obstet Gynaecol* 95:592-595
- Spitz IM, Grunberg SM, Chabbert-Buffet N, Lindenbergh T, Gelber H, Sitruk-Ware R 2005 Management of patients receiving long-term treatment with mifepristone. *Fertil Steril* 84:1719-1726
- Croxatto HB, Salvatierra AM, Croxatto HD, Fuentealba B 1993 Effects of continuous treatment with low dose mifepristone throughout one menstrual cycle. *Hum Reprod* 8:201-207
- Croxatto HB, Salvatierra AM, Fuentealba B, Massai R 1998 Contraceptive potential of a mifepristone-nomegestrol acetate sequential regimen in women. *Hum Reprod* 13:3297-3302
- Chwalsz K, Elger W, Stickler T, Mattia-Goldberg C, Larsen L 2005 The effects of 1-month administration of asoprisnil (J867), a selective progesterone receptor modulator, in healthy premenopausal women. *Hum Reprod* 20:1090-1099
- Glasier AF, Smith KB, van der Spuy ZM, Ho PC, Cheng L, Dada K, Wellings K, Baird DT 2003 Amenorrhea associated with contraception-an international study on acceptability. *Contraception* 67:1-8
- Murphy AA, Kettell LM, Morales AJ, Roberts V, Parmley T, Yen SS 1995 Endometrial effects of long-term low-dose administration of RU486. *Fertil Steril* 63:761-766

39. Williams AR, Critchley HO, Osei J, Ingamells S, Cameron IT, Han C, Chwalisz K 2007 The effects of the selective progesterone receptor modulator asoprisnil on the morphology of uterine tissues after 3 months treatment in patients with symptomatic uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 22:1696–1704
40. Gravanis A, Schaison G, George M, de Brux J, Satyashwaroop PG, Baulieu EE, Robel P 1985 Endometrial and pituitary responses to the steroid antiprogestin RU 486 in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 60:156–163
41. EMEA 2005 Guideline on clinical investigation of medical products for hormone replacement therapy of estrogen deficiency symptoms in postmenopausal women. <http://wwwemeaeu.int/pdfs/human/ewp/002197en.pdf>
42. Bygdeman M, Danielsson KG, Marions L, Swahn ML 1999 Contraceptive use of antiprogestin. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 4:103–107
43. Marions L, Danielsson KG, Swahn ML, Bygdeman M 1998 Contraceptive efficacy of low doses of mifepristone. *Fertil Steril* 70:813–816
44. Marions L, Viski S, Danielsson KG, Resch BA, Swahn ML, Bygdeman M, Kovacs I 1999 Contraceptive efficacy of daily administration of 0.5 mg mifepristone. *Hum Reprod* 14:2788–2790
45. Eisinger SH, Meldrum S, Fiscella K, le Roux HD, Guzick DS 2003 Low-dose mifepristone for uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 101:243–250
46. Bergeron C, Nogales FF, Masseroli M, Abeler V, Duvillard P, Muller-Holzner E, Pickartz H, Wells M 1999 A multicentric European study testing the reproducibility of the WHO classification of endometrial hyperplasia with a proposal of a simplified working classification for biopsy and curettage specimens. *Am J Surg Pathol* 23:1102–1108
47. Scully R, Bonfiglio T, Kurman R, Silverberg S, Wilkinson D 1994 Histological typing of female genital tract tumours. New York: Springer-Verlag

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

2. Effet du VA2914 sur la matrice extra-cellulaire et la vascularisation endométriales *in vivo*

A partir de 46 patientes recrutées lors de l'étude clinique de phase II, des biopsies d'endomètre issues de 41 patientes ont été obtenues pour cette étude sur la MEC et la vascularisation endométriales (critères d'inclusion des patientes, caractéristiques des patientes, analyses hormonales, histologie endométriale : se référer à la première étude).

- *Analyse de la vascularisation*

- a) Méthode

La vascularisation endométriale est étudiée par un système d'analyse d'images informatisées. Les vaisseaux endométriaux sont marqués par 2 anticorps sur coupe en paraffine. Le 1^{er}, l'anti- α -SMA, marque les VSMCs. Le second, l'anti-vWF marque les cellules endothéliales. Les VSMCs immunoréactives pour l' α -SMA sont marquées en rouge alors que les cellules endothéliales immunoréactives pour le vWF apparaissent en brun. Le tissu endométrial marqué est observé au microscope au grossissement 400X. Selon l'intensité du marquage α -SMA (méthode décrite par Rogers, Plumkett, Affandi 2000) (Rogers *et al.* 2000), un score de 0, 1 ou 2 est attribué aux vaisseaux sanguins, le score 0 correspondant à l'absence de marquage α -SMA, le score 1 représentant un marquage distribué de façon irrégulière et incomplète autour de la circonférence d'un vaisseau, le score 2 décrit un marquage comprenant toute la circonférence du vaisseau. Le comptage des vaisseaux aux 3 scores différents est effectué sur l'entièreté du tissu endométrial.

Le contour de chaque vaisseau est ensuite souligné en différentes couleurs selon le score, le turquoise étant utilisé pour les vaisseaux de score 0, le bleu pour le score 1 et le rouge pour le score 2. Le contour de la surface totale du tissu analysé est souligné en vert (programme Adobe Photoshop). L'analyse d'images informatisées consiste à décomposer l'image colorée en composants rouge, vert et bleu. Chacun des composants est analysé indépendamment afin d'obtenir une image binaire dans laquelle est attribuée une valeur 1 aux pixels appartenant aux vaisseaux et une valeur 0 appartenant au bruit de fond. Chaque image binaire permet de déterminer un nombre de sections de vaisseaux, la surface des sections de vaisseaux (μm^2) et

la surface totale du tissu à analyser (μm^2). L'analyse d'images et ses mesures sont réalisées à l'aide du programme Aphelion 3.2 (Adsis, France) sur Personal Computer.

Les capillaires sont caractérisés par la présence isolée de cellules endothéliales immunoréactives pour le facteur de vWF tandis que les artéries et les veinules sont caractérisées par des cellules musculaires immunoréactives pour l' α -SMA formant une couche continue autour des cellules endothéliales marquées par le vWF.

Cette étude endométriale a été réalisée sur les biopsies prélevées durant le cycle témoin et après 3 mois de traitement sous les différents dosages de VA2914.

b) Résultats de l'analyse de la vascularisation

Dans tous les groupes analysés, la surface relative des vaisseaux dont la paroi est constituée uniquement de cellules endothéliales (vWF) apparaît nettement inférieure à celle occupée par les vaisseaux plus matures (vWF+ α -SMA).

80 % de la surface vasculaire est occupée par les artéries et les veinules (vWF + α -SMA) à la fois dans les endomètres prélevés au cours du cycle témoin et après 3 mois de traitement. Avant traitement, les vaisseaux entourés de cellules musculaires lisses sont de plus grande taille que les capillaires.

La taille des vaisseaux n'est pas modifiée suite aux traitements par le VA2914.

- *Mise en évidence du réseau fibrillaire de collagène dans l'endomètre et du VEGF*

a) Méthode

La coloration argentique permet de mettre en évidence les réseaux de fibres réticulées composées principalement de collagène de type I, III et IV. Cette technique est réalisée selon un protocole décrit par Gordon JR et Sweets HH, 1936 (Gordon & Sweets Jr HH 1936) et est appliquée aux biopsies endométriales incluses en paraffine et montées sur lames silanées.

Un marquage en immunohistochimie du VEGFA sera également réalisé sur ces biopsies d'endomètre. Les coupes sont d'abord traitées afin de démasquer les sites antigéniques, bloquer les peroxydases endogènes et empêcher les sites de liaison non spécifiques des anticorps. Elles sont ensuite incubées successivement avec les anticorps primaires et secondaires. La révélation est réalisée par un chromogène. Les coupes sont ensuite contre-

colorées par l'hématoxyline. La disposition et l'intensité de l'immunomarquage sont alors observées.

L'expression de l'ARNm du VEGFA, sera recherchée après amplification par RT-PCR après l'extraction de l'ARN sur tissus congelés et broyés.

b) Résultats

L'intégrité de la matrice extra-cellulaire marquée par la coloration argentique n'est pas altérée par le VA2914 aux différents dosages.

L'immunomarquage du VEGFA, dont l'intensité est mesurée par le système semi-quantitatif décrit par (Narvekar *et al.* 2006), montre une distribution similaire du VEGFA dans les différents compartiments endométriaux au cours du cycle témoin et après 3 mois de traitement avec les différentes doses de VA2914. Le marquage pour le VEGFA montre une forte intensité dans la portion apicale du cytoplasme des cellules épithéliales de surface et glandulaires. Il apparaît de plus faible intensité au niveau du stroma et des cellules endothéliales. L'expression de l'ARNm du VEGFA n'est pas modifiée par le VA2914.

En conclusion : le VA2914 n'altère ni la matrice extra-cellulaire endométriale ni le réseau vasculaire et ne modifie pas l'expression de la principale cytokine angiogénique que constitue le VEGFA, maintenant ainsi un endomètre stable similaire à celui observé en phase sécrétoire lors des cycles ovulatoires.

Les détails de cette étude sont exposés dans l'article suivant qui a bénéficié d'une publication.

Persistence of an Intact Endometrial Matrix and Vessels Structure in Women Exposed to VA-2914, a Selective Progesterone Receptor Modulator

S. Ravet, C. Munaut, S. Blacher, G. Brichant, S. Labied, A. Beliard, N. Chabbert-Buffet, P. Bouchard, J.-M. Foidart, and A. Pintiaux

Department of Gynecology (S.R., G.B., A.B., J.-M.F., A.P.), Centre Hospitalier Universitaire, and Laboratory of Tumor and Development Biology (C.M., S.B., S.L., A.B., J.-M.F., A.P.), University of Liège, Tour de Pathologie (B23), Center of Experimental Cancer Research, 'GIGA-R', B-4000 Liège, Belgium; Department of Obstetrics, Gynecology, Reproductive Medicine and Public Health (N.C.-B.), Hospital Tenon, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris 75020, France; Equipe d' Accueil 1533 Université Pierre et Marie Curie Université Paris 06 (N.C.-B., P.B.), 75005 Paris, France; and Endocrinology Unit (P.B.), Hospital Saint-Antoine, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75012 Paris, France

Background: VA-2914 is a selective progesterone receptor modulator with potential contraceptive activity that induces amenorrhea, whereas progestins cause endometrial spotting and bleeding. This abnormal bleeding due to progestins is a consequence of focal stromal proteolysis by an increase in naked vessel size and density.

Objective: Our objective was to quantify the effects of VA-2914 on endometrial vascularization, fibrillar matrix, and vascular endothelial growth factor (VEGF)-A expression in endometrial biopsies from 41 women before and after 12 wk daily treatment with a placebo, or 2.5, 5, or 10 mg VA-2914.

Methods: Collagen fibrillar network was stained by silver impregnation. Vessel area, density, and structure were quantified with a computer-assisted image analysis system after double immunostaining using an anti-von Willebrand factor (endothelial cells) and an anti- α smooth muscle actin (vascular smooth muscle cells) marker antibody. VEGF-A mRNAs were quantified by RT-PCR and localized by immunohistochemistry.

Results: The endometrial vessels, collagen network, and mRNA levels of VEGF-A were identical during the luteal phase at baseline and in VA-2914 treated women. VEGF-A distribution was unchanged.

Conclusions: VA-2914 does not alter the endometrial matrix and cells, and does not modify the endometrial vessel morphology as compared with baseline biopsies. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 4525–4531, 2008)

Ovarian estrogens induce endometrial proliferation during the proliferative phase of the menstrual cycle. After ovulation, progesterone induces glandular secretion and stromal (pre-)decidualization. In the absence of embryo implantation, the decrease of both ovarian steroids in the late secretory phase triggers a cascade of events leading to vascular damage, proteolytic breakdown, shedding of the functional layer, and menstrual bleeding. Irregular extracellular matrix breakdown and bleeding between menstruations are common disorders that occur in diverse endometrial pathologies or upon progestin treatment (1).

Progesterin administration causes endometrial vessel remodeling characterized by an increased number of dilated and "naked" vessels devoid of pericytes that are associated with endometrial bleeding (2).

Progesterone receptor ligands include not only pure agonists or antagonists but also compounds with mixed activity. They all belong to the class of selective progesterone receptor modulators (PRMs). Many PRMs display direct antiproliferative effects in the endometrium, justifying their possible use in the treatment of endometriosis and myoma-associated bleeding. They also sup-

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-0731 Received April 2, 2008. Accepted August 18, 2008.

First Published Online August 26, 2008

Abbreviations: Ab, Antibody; DABt, 3'3'-diaminobenzidine HC1; E2, estradiol; LNG, levonorgestrel; PRM, progesterone receptor modulator; SMA, smooth muscle actin; VEGF, vascular endothelial growth factor; vWF, von Willebrand factor.

press late follicular development, block the LH surge, and retard endometrial maturation, which renders them potential estrogen-free contraceptive drugs (3).

VA-2914 is a steroid derived from 19-norprogesterone with potent *in vitro* and *in vivo* progesterone antagonist activity (4,5). Acute and chronic toxicology studies in animals indicate a satisfactory safety profile, with considerably less antiglucocorticoid activity in cell culture (4) and in the rat (6) than that of mifepristone. It inhibits ovulation in rats in a dose-dependent manner upon single-dose oral administration and exhibits, by a decrease in implantation sites, an antifertility activity during continuous low-dose administration (7). VA-2914 is also effective as post-coital contraception in animal models (6,7) and women (8).

A series of phase I clinical studies has been performed to determine the effects of VA-2914 on ovulation and endometrial maturation in women (9). We recently evaluated the effects of VA-2914, administrated continuously for 3 months, on ovulation and endometrial maturation in 46 normal women. Anovulation was observed in 80% of women in the 5 and 10 mg groups. Plasma estradiol (E2) levels remained in the physiological follicular phase range throughout treatment. No endometrial hyperplasia was noted. Amenorrhea occurred in 82 and 90% of women in the 5 and 10 mg groups (10).

In this study we evaluate the effects of low-dose VA-2914 on the degradation of the endometrial matrix, as well as on endometrial vessel characteristics and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, an angiogenic cytokine known to play a key role on blood vessel growth and maturation (11).

Patients and Methods

Patients

The study was approved by the Ethics Committees at the University of Liege and Saint-Antoine Hospital of Paris. Written informed consent was obtained from each subject. There were 46 women, aged 18–35 yr, with documented regular ovulatory menstrual cycles (25–32 d), within 20% of ideal body weight, not currently using an intrauterine device, and not having used reproductive hormonal medications or glucocorticoids for at least 12 wk before the study, randomly assigned to either a placebo or one of the three treatment groups (2.5, 5, or 10 mg/d VA-2914; HRA Pharma, Paris, France). The therapy was started on the first or second day of menstrual bleeding after a baseline observational cycle and taken daily for 12 wk. Women agreed to prevent pregnancy by abstinence or use of barrier contraception, or they were protected by tubal ligation or partner vasectomy. An endometrial biopsy was performed on d 6–8 after the LH surge determined by a urinary test during baseline cycle and treatment month 3. Endometrial biopsy was performed on treatment d 77 in the absence of detectable urinary LH surge during treatment month 3.

Hormonal analysis

E2 was measured by a direct RIA using Diasorin reagents (Anthony, France). The cross-reactivity of estrone and estriol was only 0.6%. Coefficients of variation at the level of 50 pmol/liter were 3.6 and 10.4%, respectively, and at the level of 260 pmol/liter, 2.9 and 6.8%, respectively.

Progesterone was measured by RIA using CIS Bio International reagents (Gif sur Yvette, France). The only significant cross-reacting steroids were: deoxycorticosterone 6.2%, 20 α -dihydroprogesterone 2.2%, and 6 β -dihydroprogesterone 2.1%. Coefficients of variation at the level

of 10 ng/ml were 3.5 and 4.5%, respectively, and at the level of 18.8 ng/ml, 4.4 and 4%, respectively (10).

Endometrial tissues

Human endometrial biopsies were obtained from 41 women who completed the study with a Cornier Pipelle suction curette (C.C.D. International, Paris, France). A fragment was immediately snap frozen and stored in liquid nitrogen until analysis. The other part of the biopsy was fixed in 4% formaldehyde solution in PBS and embedded in paraffin. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin. Specimens were evaluated in a blinded fashion by two independent pathologists who classified them as proliferative or early (d 17–19), mid (d 20–22), or late (d 24–26) secretory according to classical criteria (12). The immunohistochemistry and quantitative analysis were performed on an entire tissue section (5 μ m thick) with a mean size of 25 mm² and a mean number of gland sections of 100.

von Willebrand factor (vWF)/ α -smooth muscle actin (SMA) double immunostaining

Serial sections were mounted on silanized slides and used for immunohistochemistry. Endometrial vessels were identified by double immunostaining of endothelial cells and smooth muscle cells. The primary antibodies (Abs) used were a rabbit polyclonal antihuman vWF (A082; Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) and a mouse monoclonal anti-SMA (clone 1A4, A2547; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). Slides were washed in Tris-HCl (pH 7.6) between all steps unless otherwise stated. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 20 min at room temperature. Slides were incubated with normal sheep serum (Hormonology Laboratory, Marloie, Belgium) for 30 min at room temperature, directly followed by vWF Ab (1:500 in normal sheep serum/Tris 10%) overnight at 4°C. A swine antirabbit Ig conjugated to peroxidase (P0217; Dako Denmark A/S) was used as a secondary Ab. 3'3'-diaminobenzidine HCl (DAB+) (Liquid DAB+ substrate chromogen system, K3468; Dako Denmark A/S) was applied for 15 min at room temperature in the dark as a chromogen, and sections were rinsed in H₂O. Slides were incubated with normal goat serum (Hormonology Laboratory) before incubation with the second primary Ab, α SMA (1:400 in normal goat serum/Tris 10%), for 90 min at 37°C. A goat anti-mouse Ab conjugated to biotin (E 0433; Dako Denmark A/S) diluted 1:400 in Tris buffer for 30 min at room temperature was used as a secondary Ab, followed by an incubation for 30 min at room temperature with streptavidin-alkaline phosphatase (D 0396; Dako Denmark A/S) diluted 1:500. Finally, Fast Red chromogen system (K4016; Dako Denmark A/S) was applied for 10 min at room temperature in the dark. Sections were rinsed in H₂O and mounted in Aqua Polymount (Polysciences, Inc., Warrington, PA). Negative control was performed by replacing each primary Ab with normal serum.

VEGF-A immunohistochemistry

VEGF-A protein was localized in sections of paraffin-embedded endometrial biopsies. Sections were stained with VEGF-A Ab by the following steps. After dewaxing and rehydrating, tissue sections were subjected to antigen retrieval in pressure cook at 1.4 bar and 126°C for 11 min using citrate buffer, and were then allowed to cool for 20 min. Endogenous peroxidases were blocked in 3% H₂O₂ for 20 min at room temperature, and nonspecific binding of the primary Ab was blocked with 10% BSA. Incubation with rabbit polyclonal antihuman VEGF-A Ab (A-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) diluted 1:50 was conducted 60 min at room temperature. Sections were washed in PBS (5 \times 5 min) before incubation with the secondary Ab (goat antirabbit EnVision/HRP, K4003; Dako Denmark A/S) for 30 min at room temperature. Finally, staining was revealed with the 3'3'-diaminobenzidine HCl system, and sections were counterstained with hematoxylin.

Location and intensity of immunostaining were measured using a semiquantitative scoring system. This scoring system is a standard method used in previous studies (13–16), and a high correlation has been

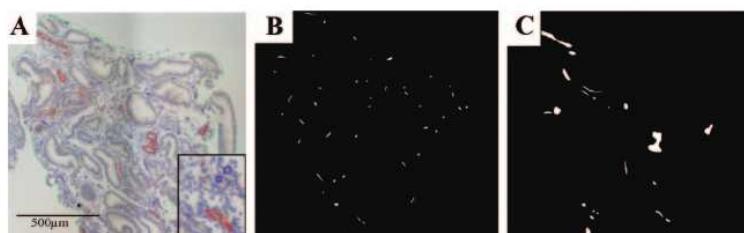


FIG. 1. Image analysis and vessel quantification. A, The contour of each type of vessel was drawn manually in the original image by the following different colors: blue for vessels scored zero and red for vessels scored one (inset). Green delineates the area of tissue in which measurements are performed. Binary images of score 0 vessels (B) and binary image of score 1 vessels (C) contained in the original image.

demonstrated between objectively measured immunoreactivity (image analysis) and semiquantitative scoring of immunostaining patterns (16). Immunostaining intensity and distribution of epitopes in all tissue sections were assessed on a four-point scale: 0 = no staining, 1 = mild staining, 2 = moderate staining, and 3 = intense staining, and expressed as a mean score and range.

VEGF-A mRNA expression

Frozen tissue was pulverized using a Dismembrator (B. Braun Biotech International, GmbH, Melsungen, Germany) and suspended in lysis buffer [5 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 17 mM N-lauroylsarcosine, and 0.1 M 2-mercaptoethanol (pH 7)]. Total RNA was purified by the QIAGEN method (QIAGEN Benelux B.V., Venlo, The Netherlands). The concentration and purity of RNA were determined by spectrophotometry. RT-PCR amplification was performed using the GeneAmp Thermostable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR Kit (PerkinElmer, Branchburg, NJ), and the following specific pair of primers: VEGF-A, 5'-TCTACCTCACCATGCCAGT-3' and 5'-GCTGCGCTGATAGACATCCA-3' (104 bp product); and 28S, 5'-GTTCACCCACTAATGGAACGTGA-3' and 5'-GATTCTGACTTAGAGGCGTTAGT-3' (212 bp product). Reverse transcription was performed from 10 ng RNA total at 70°C for 15 min, followed by 2 min at 95°C to denature DNA. PCR amplification was run as follows: 15 sec at 94°C, 30 sec at 60°C, and 15 sec at 72°C during 31 cycles for VEGF-A; and 15 sec at 94°C, 20 sec at 68°C, and 10 sec at 72°C during 15 cycles for 28S and followed by a final 2-min extension step at 72°C. RT-PCR products were resolved on 10% polyacrylamide gels and analyzed using a Fluor-S Multilaser (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) after staining with Gelstar dye (FMC BioProducts, Rockland, ME). Products were quantified by normalization with respect to 28S rRNA. The levels of expression were compared at baseline and in a combined group of women exposed to various doses of VA-2914.

Staining of the argyrophilic fibrillar network

Silver impregnation of histological sections was performed as previously described (17).

Image analysis and measurement

Slides were observed with an Olympus microscope (Omnilab, Aartselaar, Belgium), and the entire section (mean area 25 mm²) was analyzed at magnification of ×400. Vessels were identified by positive vWF staining, and the presence of pericytes was documented according to the αSMA staining as previously described in detail (2). Briefly, a coating of the endothelial cells with αSMA positive cells (pericytes) was considered as terminal venules or arterioles, whereas “naked” vessels were considered to be capillaries. A score (zero or one) was attributed to blood vessels according to the absence or presence of αSMA staining. Vessels were counted in the entire biopsy.

The contour of each vessel type was drawn manually at 400× magnification using Photoshop software (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA) by two different colors: blue for αSMA negative vessels (score 0), and red for αSMA stained vessels (score 1). Tissue boundaries were delineated in green and (Fig. 1A). The color image was then decomposed into its three components: red, green, and blue (18). Figure 1, B and C, shows binary images of vessels scored zero and one, respectively.

The area of each vessel section and the relative vascular area, defined as the ratio of vessel section surface to total tissue area, were measured in each binary image. Image processing and measurements were performed with the software Aphelion 3.2 from ADCIS S.A. (Normandy, France) on a personal computer.

Statistical analysis

The parameters were expressed in terms of the mean ± se. Analyses for statistical significance were evaluated by the Kruskal-Wallis test with Dunn's correction for multiple comparisons. Then, for comparison between two groups, the Mann-Whitney *U* test and paired Wilcoxon were used. Statistical significance was set at *P* < 0.05.

Results

Patients and endometrial histology

Patient's characteristics and endometrial histology are described in Table 1 and have been reported in detail elsewhere (10). Briefly, all women in the placebo group and most patients (nine of 11) exposed to VA-2914 2.5 mg/d experienced normal menstrual cycles, whereas amenorrhea was observed in the majority of women receiving 5 or 10 mg/d (Table 1). During the baseline cycle, 32 biopsies showed typical features of the midsecretory phase, and one showed a polyp. No tissue could be obtained from eight women. After 12 wk treatment with VA-2914, 17 biopsies were classified as a secretory pattern, and one as proliferative.

TABLE 1. Patient's characteristics and endometrial histology at baseline cycle and during the third treatment cycle

| | Baseline cycle | Placebo | VA-2914 (2.5 mg/d) | VA-2914 (5 mg/d) | VA-2914 (10 mg/d) |
|----------------------------|----------------|------------|--------------------|------------------|-------------------|
| No. of patients | 41 | 9 | 11 | 12 | 9 |
| Mean age ± sd (yr) | 26.0 ± 5.2 | 26.1 ± 3.9 | 23.8 ± 5.4 | 27.6 ± 5.2 | 26.4 ± 6.0 |
| No. with amenorrhea | 0 | 0 | 2 | 9 | 9 |
| Histology | | | | | |
| No. with proliferative | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| No. with secretory | 32 | 5 | 5 | 10 | 2 |
| No. with polyps | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| No. with atrophic | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| No. with absence of tissue | 8 | 0 | 5 | 1 | 5 |

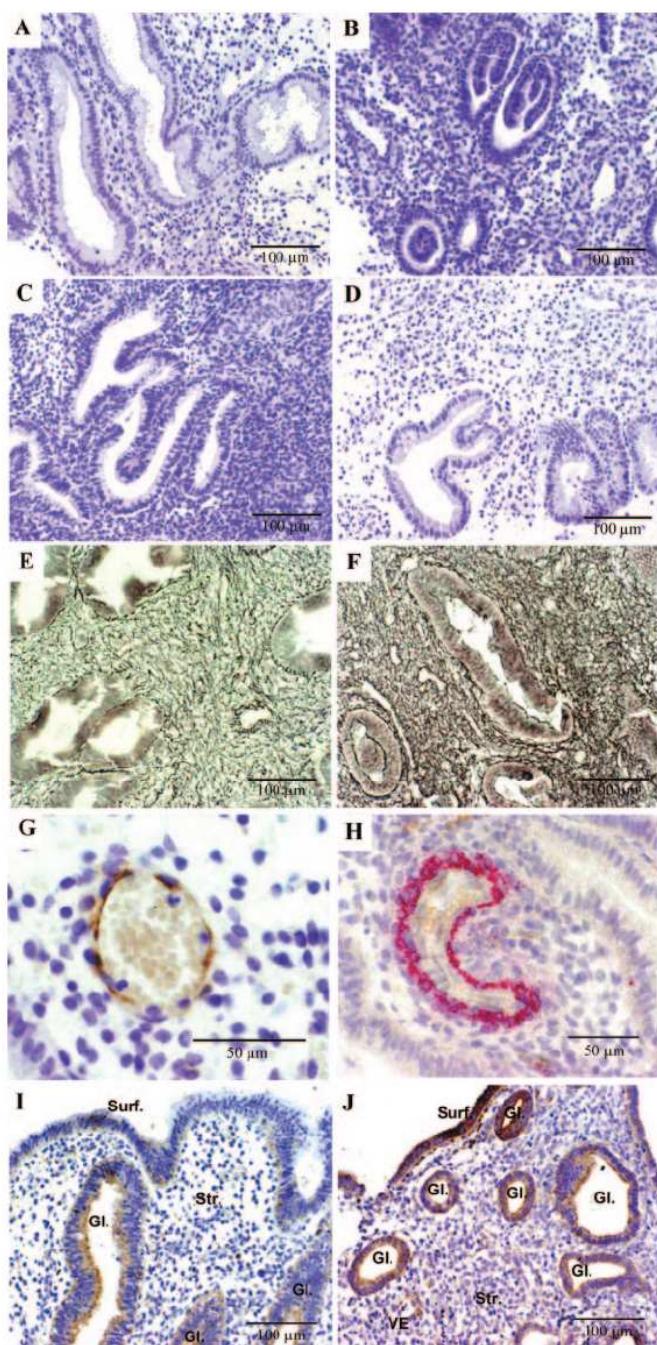


FIG. 2. A–D, Representative fields of hematoxylin-eosin-stained histological sections of secretory endometrium during baseline cycle (A) and after 12 wk with 2.5 mg/d (B), 5 mg/d (C), and 10 mg/d VA-2914. Original magnification, $\times 200$. E and F, Stromal collagen-rich argyrophilic fibrillar network using silver impregnation. Endometrium after 12 wk treatment with placebo (E) and 10 mg/d VA-2914 (F). Original magnification, $\times 200$. G and H, Immunolocalization of α SMA, vWF, and VEGF in endometrium. In the double immunostaining, α SMA positive cells (pericytes) were labeled in red, and vWF positive cells (endothelial cells) were stained in brown. α SMA negative vessels (G), vessels with a continuous layer of α SMA positive perivascular cells (H). Original magnification, $\times 400$. I and J, Immunolocalization of VEGF-A in endometrial glands (Gl.), stroma (Str.), surface epithelium (Surf.), and vascular endothelium (VE) during the baseline cycle (I) and after treatment with 10 mg/d VA-2914 (J). The VEGF-A distribution was identical in the endometrium of women treated with 2.5 or 5 mg/d VA-2914 (data not shown). Original magnification, $\times 200$.

No tissue was obtained from 11 patients. Patients with polyps were excluded for further analysis.

The histological features of endometria in women at baseline during the midsecretory phase (Fig. 2A) and after 12 wk continuous treatment with VA-2914 (2.5–10 mg/d) (Fig. 2, B–D) were similar.

E2 and progesterone plasma levels during the third treatment month are described in Table 2. All women in the placebo-treated group exhibited an endometrial secretory pattern with E2 and progesterone plasma levels typical of a midluteal phase. Among the six women exposed to VA-2914 2.5 mg/d, three had progesterone plasma levels above 6 ng/ml, indicative of an ovulation, and their endometrium also showed the expected secretory pattern. Three other women in that group had progesterone plasma levels below the range of an ovulatory cycle (0, 0, and 2 ng/ml, respectively). In two of them, an endometrial pattern of a secretory phase was documented. Among the 13 women exposed to VA-2914 5 or 10 mg/d, only three had progesterone plasma levels above 6 ng/ml (24, 16, and 13 ng/ml, respectively). In the 10 other women, progesterone plasma levels were below the detection limit. Therefore, the histological demonstration of a secretory pattern in these women should be ascribed to a VA-2914 injury. In all women, the E2 plasma levels were in the range of a spontaneous midfollicular phase. Altogether, these data suggest that exposure to 5–10 mg/d VA-2914 blocks ovulation but does not induce the histological changes classically elicited by antagonadotropic progestins.

Stromal breakdown and fiber lysis

Staining of argyrophilic fibrillar network documented the integrity of the collagen-rich fibrillar network in all biopsies at baseline and after treatment with placebo or all doses of VA-2914 (Fig. 2, E and F). This is in sharp contrast with the stromal breakdown and extensive endometrial matrix proteolysis in women with progestin-only contraceptives (1, 19). This indicates that VA-2914 does not elicit the extensive endometrial stromal breakdown observed after progestin exposure.

Microvessel density and area

Altogether, more than 12,000 vessel sections were counted and characterized. Capillaries were identified by the isolated presence of vWF positive endothelial cells

TABLE 2. E2 and progesterone plasma levels during the third treatment month with placebo or 2.5, 5, and 10 mg/d VA-2914

| Treatment groups | Patient nos. | Endometrial characteristics | E2 (pg/ml) | Progesterone (ng/ml) |
|------------------|--------------|-----------------------------|------------|----------------------|
| Placebo | 1 | Early secretory (d 24) | 80 | 20 |
| | 2 | Early secretory (d 18) | 180 | 18 |
| | 3 | Midsecretory (d 20) | 70 | 14 |
| | 4 | Midsecretory (d 0) | 60 | 21 |
| | 5 | Early secretory (d 18) | 120 | 10 |
| 2.5 mg/d VA-2914 | 1 | Midsecretory (d 20) | 160 | 18 |
| | 2 | Early secretory (d 8) | 100 | 9 |
| | 3 | Proliferative | 200 | 0 |
| | 4 | Early secretory (d 18) | 120 | 10 |
| | 5 | Midsecretory (d 0) | 40 | 0 |
| 5 mg/d VA-2914 | 6 | Midsecretory (d 20) | 100 | 2 |
| | 1 | Early secretory (d 18) | 280 | 24 |
| | 2 | Midsecretory (d 20) | 150 | 1 |
| | 3 | Midsecretory (d 20) | 90 | 0 |
| | 4 | Midsecretory (d 20) | 30 | 0 |
| 10 mg/d VA-2914 | 5 | Late secretory (d 25) | 50 | 0 |
| | 6 | Late secretory (d 25) | 40 | 0 |
| | 7 | Late secretory (d 28) | 30 | 16 |
| | 8 | Late secretory (d 23) | 110 | 0 |
| | 9 | Late secretory (d 25) | 260 | 0 |
| 10 mg/d VA-2914 | 10 | Midsecretory (d 20) | 40 | 0 |
| | 1 | Midsecretory (d 20) | 200 | 0 |
| | 2 | Midsecretory (d 20) | 160 | 13 |
| | 3 | Midsecretory (d 20) | 40 | 0 |

(Fig. 2G), whereas a continuous layer of α SMA positive cells coating the endothelial cells characterized small arterioles and venules (Fig. 2H).

The relative vascular area (ratio of vessel section surface to total tissue area) was determined in endometrial biopsies of 32 women at baseline during the midsecretory phase and after treatment with VA2914 (Fig. 3, A and B). At baseline, about 80% of the vascular areas were occupied by vessels coated with α SMA positive cells. After 12 wk treatment with various doses of VA-2914, this proportion remained unchanged (Fig. 3B).

The mean vessel section areas were determined by a computer-assisted method (Fig. 3C). Vessels coated with smooth muscle cells were larger than "naked" capillaries in all groups. Their respective sizes were identical at baseline and during treatment with VA-2914. No difference in vessels counts, density, and size was observed with a Mann-Whitney *U* test. The comparison of values from each individual woman at baseline and after treatment by a paired Wilcoxon test failed also to show a significant difference.

VEGF-A immunolocalization

During the baseline cycle, VEGF-A was strongly localized in the apical part of the cytoplasm of the surface epithelium [score 2.5 (range 1–3)] and of glandular epithelial cells [score 2.9 (range 2–3)]. Mild expression was also found in the stroma [score 0.8 (range 0–1)] and endothelial cells [score 0.8 (range 0–1)] (Table 3 and Fig. 2I). VEGF-A localization remained unchanged in all cellular compartments after 12 wk treatment with placebo or VA-2914 (Table 3 and Fig. 2J).

VEGF-A expression

The mRNA expression of VEGF-A was analyzed by RT-PCR in endometrial tissue from 11 women at baseline and from eight

women treated with various doses of VA-2914. The VEGF-A mRNA levels remained unchanged (data not shown).

Discussion

VA-2914 is a new PRM that is undergoing clinical testing. Endometrial changes associated with a minimum of 3 month chronic treatment with PRMs, including VA-2914, were recently evaluated by a panel of pathologists. Biopsies exhibited an unusual architecture characterized as glandular dilatation and little evidence of mitosis, consistent with the proposed antiproliferative effect of PRMs (20). The specific aspect observed in endometrial biopsies during PRM treatment is now described as PRMs Associated Endometrial Changes (21). In our study the endometria were mostly secretory at doses of 2.5 and 5 mg VA-2914 independently of E2 and progesterone levels (Table 2). Atrophy has been described at 10 mg dosage (Table 1). In this study, 82 and 90%, respectively, of women became amenorrheic during the 12 wk daily treatment with 5 or 10 mg (see also Ref. 10). Although a comparison between endometria after treatment with oral VA-2914 and after treatment with an oral progestin such as oral levonorgestrel (LNG) is an appropriate design for a subsequent clinical study, this phase II protocol aimed at evaluating in a limited set of women the impact of VA-2914 upon the endometrial histology, ovulation, and endocrine ovarian activity in women with documented spontaneous ovulatory cycle. This first clinical study indicates that a 12-wk exposure to VA-2914 5 or 10 mg/d causes anovulation, amenorrhea, and a persistent E2 secretion with an endometrial pattern that closely resembles that of a spontaneous ovulatory cycle during the midluteal phase. This pattern is strikingly distinct from that observed with other PRMs that

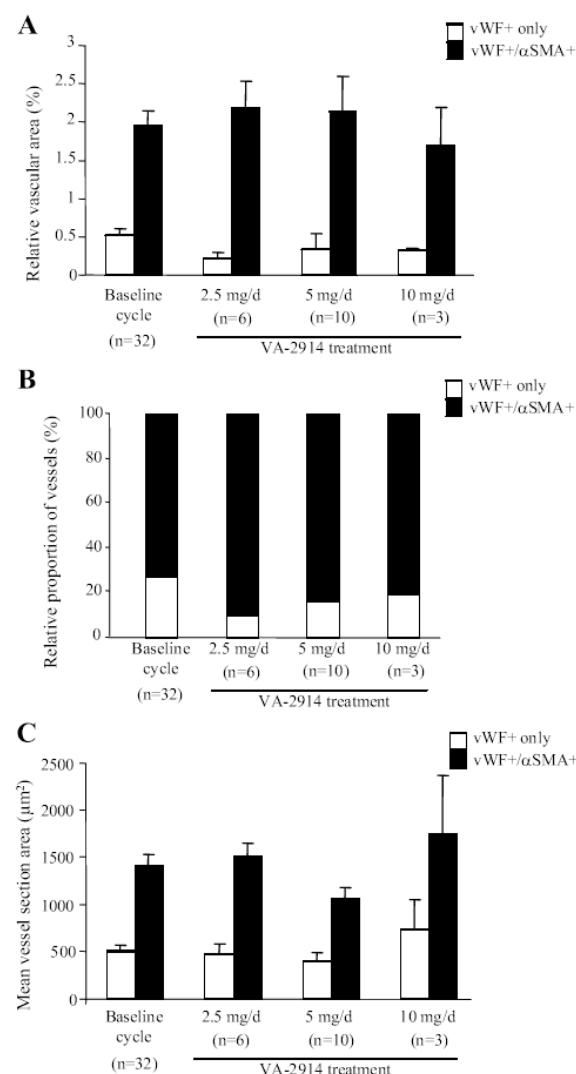


FIG. 3. Quantification of vessel types in endometrium at baseline or after 12 wk treatment with VA-2914. A, The relative vascular area represents the percentage of total tissue area occupied by vessels. It is calculated as the ratio between the vessel section surfaces $\times 100$ to total tissue area. B, The relative proportion of vessel types refers to the percentage of naked and pericyte-coated vessels. C, The mean vessel section area (μm^2) represents the mean absolute area occupied by both types of vessels. These parameters were determined by computer-assisted method for “naked” capillaries (vWF+ only) and smooth muscle cell-coated vessels (vWF+ and α SMA+) in endometrium collected during baseline cycle ($n = 32$) and after 12 wk treatment with VA-2914 at doses of 2.5 mg ($n = 6$), 5 mg ($n = 10$), and 10 mg ($n = 3$) ($P > 0.05$). The vessel parameters of endometrium from women exposed to placebo ($n = 5$) were identical to those of the baseline group ($n = 32$) (data not shown).

cause endometrial hyperplastic changes that are worrisome for chronic administration (22).

Argyrophilic staining of the collagen fibrillar network showed no evidence of endometrial matrix degradation during the midsecretory phase of spontaneous ovulatory cycle (control) or in women exposed to VA-2914. Focal stromal breakdown, *i.e.* menstrual-like tissue collapse and fragmentation, and lysis of the

collagen-rich argyrophilic fibrillar network are classically observed in endometrial biopsies performed at menstruation or at the start of a bleeding episode in women receiving sc or intrauterine LNG as progestin (1). Such focal and stromal breakdown and collagen fiber lysis are evidenced in bleeding endometria, and associated with higher activities of collagenase-1 and gelatinases A and B together with lower tissue inhibitor of metalloproteinase-1 than in nonbleeding endometria (1, 19). The absence of matrix remodeling and collagen lysis in normal secretory endometria and in women receiving VA-2914 suggests that the endometrial changes elicited by menstruation and/or prolonged progestin exposure are absent in our patients.

We have shown previously that extensive endometrial remodeling was induced by exogenous LNG administration in the form of an intrauterine system (2). Endometrial samples obtained in eight women exposed for 1 month to the LNG-releasing intrauterine system displayed an 11.5-fold increase in small naked vessel number and a 6-fold increase in pericyte-coated vessels. In women using the long-term LNG-releasing intrauterine system, a 4-fold increase in the number and size of fragile capillaries was observed (2). We hypothesized that such an increased number of fragile “naked” capillaries could easily be injured and responsible for bleeding. Therefore, we compared in this study the impact of VA-2914 or of endogenous progesterone during the midsecretory phase of spontaneous ovulatory cycle (baseline cycle) on the pattern of endometrial vessels. Endometrial VA-2914 exposed women exhibited identical blood vessel number, area, density, and maturation in comparison to the pattern of normal spontaneous secretory endometrium under the influence of endogenous E2 plus progesterone. This pattern of endometrial vessels was observed independently of the endogenous levels of E2 and progesterone (Table 2). In the same patients, we documented previously the persistence of physiological E2 levels (10). The similarity of pattern in the presence of endogenous progesterone or of VA-2914 is somewhat surprising because VA-2914 is not a progestin but a selective modulator of the progesterone receptor. This pattern may contribute to explain the high level of amenorrhea observed in our patients. Additional clinical study comparing the impact of orally given synthetic progestin in the presence or absence of VA-2914 will be necessary to delimit more precisely the impact of this new drug on the endometrial physiology.

The presence of VEGF-A mRNA and protein have been demonstrated in the human endometrium throughout the menstrual cycle (23). Most studies, including ours, have shown predominant localization of VEGF-A in the apical part of surface and glandular epithelial cells compared with the stroma (24). In this study, VA-2914 did not modify the VEGF-A distribution or its relative staining intensity. Thus, this PRM acts in a way distinct from that of mifepristone, which increases microvessel density and decreases stromal VEGF in endometria of women exposed for 120 d to mifepristone (13).

Altogether, this preliminary phase II study performed on a limited number (46) of women confirms that the PRM VA-2914 maintains matrix and vessel stability, does not impair the expression of the angiogenic cytokine, VEGF-A, and allows the maintenance of a stable vascular network that closely resembles

TABLE 3. Semiquantitative evaluation of VEGF-A immunolocalization in endometrium during baseline and treatment cycles

| Baseline cycle (n = 32) | Third treatment cycle | | |
|----------------------------|-----------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | Placebo (n = 5) | VA-2914 2.5 mg/d (n = 6) | VA-2914 5 mg/d (n = 10) |
| Surface epithelium | 2.5 (3) | 1.8 (2) | 3 (3) |
| Glands | 2.9 (3) | 2 (2) | 3 (3) |
| Stroma | 0.8 (1) | 0.5 (0.5) | 0.7 (1) |
| Endothelium | 0.8 (1) | 0.6 (1) | 0.7 (1) |
| | | | 0.5 (0.5) |
| | | | 1 (1) |
| | | | 1 (1) |

Mean score (median) ($P > 0.05$). 0, Absence of staining; 1, staining of less than 25% of the surface epithelium, or glands, stroma, or endothelium; 2, staining between 25 and 50% of the specific structures; 3, strong more than 50% of the structures studied.

that observed during the secretory phase of spontaneous ovulatory cycle despite anovulation and amenorrhea. This drug could, in this way, be associated with an improved clinical tolerance profile because it is devoid of the endometrial matrix and vascular remodeling associated with menstruation or with the bleeding conveyed by withdrawal of progesterone.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Jean-Michel Foidart, Département de Gynécologie et Obstétrique, Boulevard 12^e de Ligne, 1, B-4000 Liège, Belgium. E-mail: jmfoi@ulg.ac.be.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

References

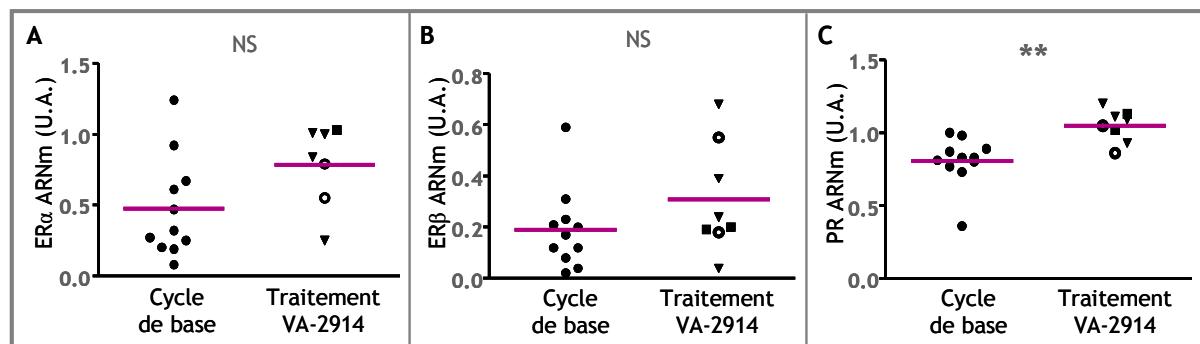
- Galant C, Vekemans M, Lemoine P, Kokorine I, Twagirayezu P, Henriet P, Picquet C, Rigot V, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E 2000 Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4827–4834
- Stephanie R, Labied S, Blacher S, Frankenne F, Munaut C, Friedman V, Beliard A, Foidart JM, Nisolle M 2007 Endometrial vessel maturation in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time. *Hum Reprod* 22:3084–3091
- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz IM 2005 Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Update* 11:293–307
- Wagner BL, Pollio G, Giangrande P, Webster JC, Breslin M, Mais DE, Cook CE, Vedeckis WV, Cidlowski JA, McDonnell DP 1999 The novel progesterone receptor antagonist RTI 3021–012 and RTI 3021–022 exhibit complex glucocorticoid receptor antagonist activities: implications for the development of dissociated antiprogestins. *Endocrinology* 140:1449–1458
- Larner JM, Reel JR, Blye RP 2000 Circulating concentrations of the antiprogestins CDB-2914 and mifepristone in the female rhesus monkey following various routes of administration. *Hum Reprod* 15:1100–1106
- Hild SA, Reel JR, Hoffman LH, Blye RP 2000 CDB-2914: anti-progestational/anti-glucocorticoid profile and post-coital anti-fertility activity in rats and rabbits. *Hum Reprod* 15:822–829
- Reel JR, Hild-Petito S, Blye RP 1998 Antiovulatory and postcoital antifertility activity of the antiprogestin CDB-2914 when administered as single, multiple, or continuous doses to rats. *Contraception* 58:129–136
- Creinin MD, Schlaif W, Archer DF, Wan L, Frezieres R, Thomas M, Rosenberg M, Higgins J 2006 Progesterone receptor modulator for emergency contraception: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 108:1089–1097
- Stratton P, Hartog B, Hajizadeh N, Piquion J, Sutherland D, Merino M, Lee YJ, Nieman LK 2000 A single mid-follicular dose of CDB-2914, a new anti-progestin, inhibits folliculogenesis and endometrial differentiation in normally cycling women. *Hum Reprod* 15:1092–1099
- Chabbert-Buffet N, Pintiaux-Kairis A, Bouchard P, VA2914 Study Group 2007 Effects of the progesterone receptor modulator VA2914 in a continuous low dose on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and endometrium in normal women: a prospective, randomized, placebo controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3582–3589
- Smith SK 2001 Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 12:147–151
- Noyes RW, Hertig AT, Rock J 1950 Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1:3–25
- Narvekar N, Critchley HO, Cheng L, Baird DT 2006 Mifepristone-induced amenorrhoea is associated with an increase in microvessel density and glucocorticoid receptor and a decrease in stromal vascular endothelial growth factor. *Hum Reprod* 21:2312–2318
- Narvekar N, Cameron S, Critchley HO, Lin S, Cheng L, Baird DT 2004 Low-dose mifepristone inhibits endometrial proliferation and up-regulates androgen receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2491–2497
- Critchley HO, Brenner RM, Henderson TA, Williams K, Nayak NR, Slayden OD, Millar MR, Saunders PT 2001 Estrogen receptor β , but not estrogen receptor α , is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1370–1378
- Wang H, Critchley HO, Kelly RW, Shen D, Baird DT 1998 Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 4:407–412
- Gordon H, Sweets Jr HH 1936 A simple method for the silver impregnation of reticulum. *Am J Pathol* 12:545–551
- Russ JC 1999 Processing binary images. In: *The image processing handbook*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC press; 431–508
- Galant C, Berliere M, Dubois D, Veroustraete JC, Charles A, Lemoine P, Kokorine I, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E 2004 Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding. *Am J Pathol* 165:83–94
- Horne FM, Blithe DL 2007 Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences. *Hum Reprod Update* 13:567–580
- Mutter G, Bergeron C, Deligdisch L, Ferenczy A, Glant M, Merino M, Williams AR, Blithe DL 2008 The spectrum of endometrial pathology induced by progesterone receptor modulators. *Mod Pathol* 21:591–598
- Williams AR, Critchley HO, Osei J, Ingamells S, Cameron IT, Han C, Chwalsz K 2007 The effects of the selective progesterone receptor modulator asoprisnil on the morphology of uterine tissues after 3 months treatment in patients with symptomatic uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 22:1696–1704
- Sugino N, Kashida S, Karube-Harada A, Takiguchi S, Kato H 2002 Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reproduction* 123:379–387
- Gargett CE, Lederman FL, Lau TM, Taylor NH, Rogers PA 1999 Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. *Hum Reprod* 14:2080–2088

3. Etudes expérimentales complémentaires réalisées sur les endomètres de patientes soumises au VA2914 et sur les endomètres prélevés lors du cycle témoin

a) Expression de ER et PR

L'expression des récepteurs hormonaux ER, PR, AR, a été évaluée avant et en fin de traitement par le VA2914 dans l'endomètre.

L'expression des ARNm des récepteurs stéroïdiens a été analysée par RT-PCR. Le taux d'expression des ARNm de ER α et ER β n'est pas modifié suite au traitement par le VA2914. Par contre, l'expression de PR augmente significativement dans l'endomètre des patientes sous VA2914 par rapport au cycle témoin.

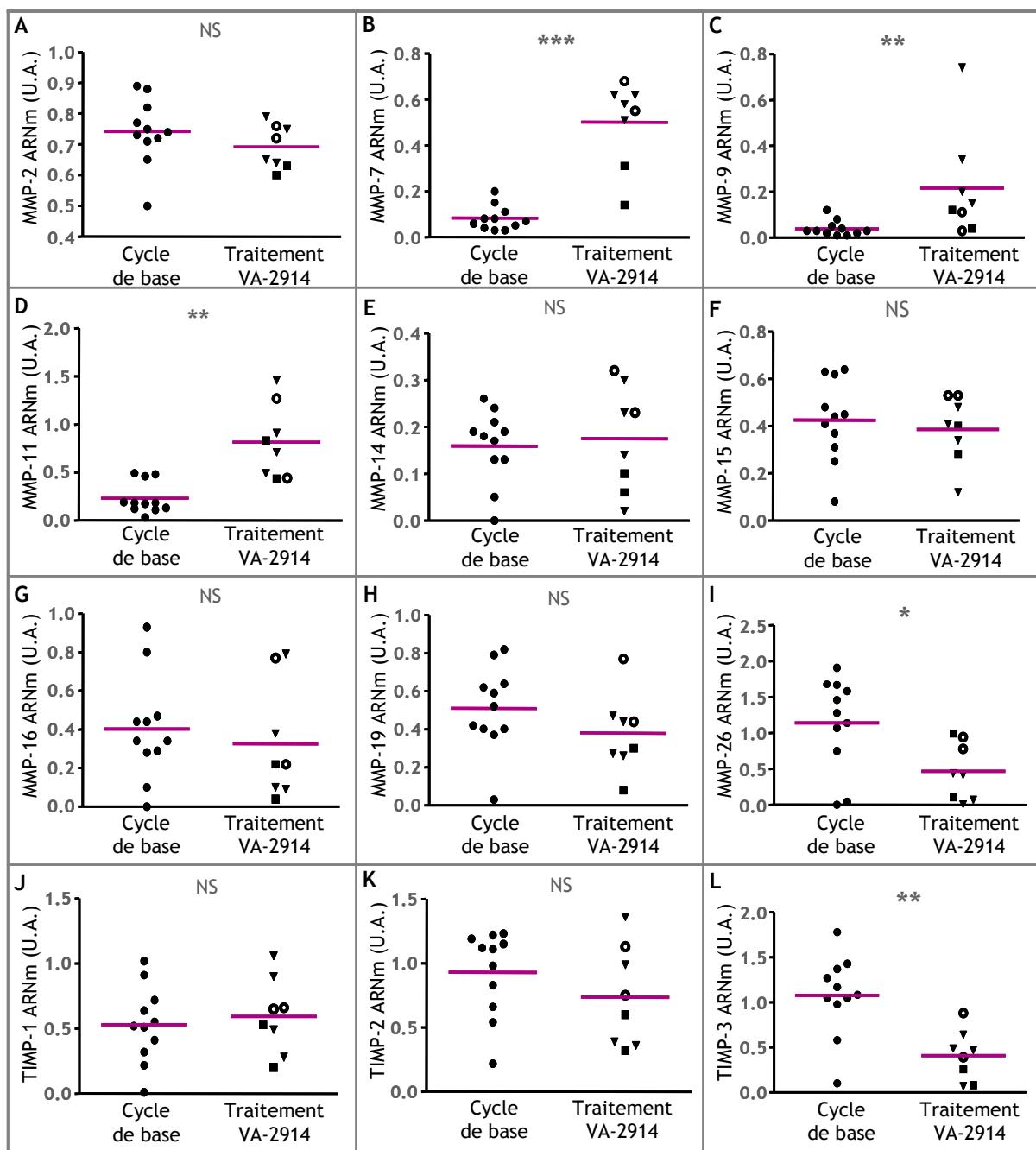


Expression en ARNm des récepteurs stéroïdiens dans l'endomètre durant le cycle de base (●) ($n=11$) et après 3 mois de traitement avec les différentes doses de VA2914 (○ 2,5 mg/j ; ▽ 5 mg/j ; ■ 10 mg/j) (U.A.=unité arbitraire) (NS=non significatif ; ** $p \leq 0,005$).

L'étude de l'expression des récepteurs ER, PR, PRB et AR par immunohistochimie dans les endomètres a permis de montrer la persistance à un niveau élevé de ER et PR sous VA2914. Une réduction de l'immunodétection est observée pour ER et PR dans les glandes en phase lutéale chez les patientes sous VA2914 ayant présenté une ovulation ou chez les patientes sous placebo biopsiées en phase lutéale tardive. L'immunodétection spécifique de PRB est intense au niveau des glandes des patientes traitées par VA2914 mais anovulatoires par rapport aux patientes traitées ovulatoires et aux patientes sous placebo en phase lutéale tardive. L'immunodétection de AR n'est pas accrue sous VA -2914 (Chabbert-Buffet 2006).

b) Impact du VA2914 sur l'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs

Le taux d'expression des MMPs et de leurs inhibiteurs physiologiques les TIMPs 1-3 a été analysé par RT-PCR. Pour réaliser cette analyse, nous avons disposé d'endomètres prélevés chez 11 patientes durant le cycle de base et chez 8 patientes traitées par VA2914. L'expression de l'ARNm des MMPs- 7, 9 et 11 est augmentée de façon significative tandis que celle de l'ARNm de la MMP-26 et du TIMP-3 est significativement réduite sous traitement par VA2914. L'expression de l'ARNm des MMPs -2, 14, 15, 16 et 19 et des TIMPs- 1 et 2 n'apparaît pas modulée par le VA2914. L'ARNm des MMPs- 1 et 3 n'a pu être détecté.



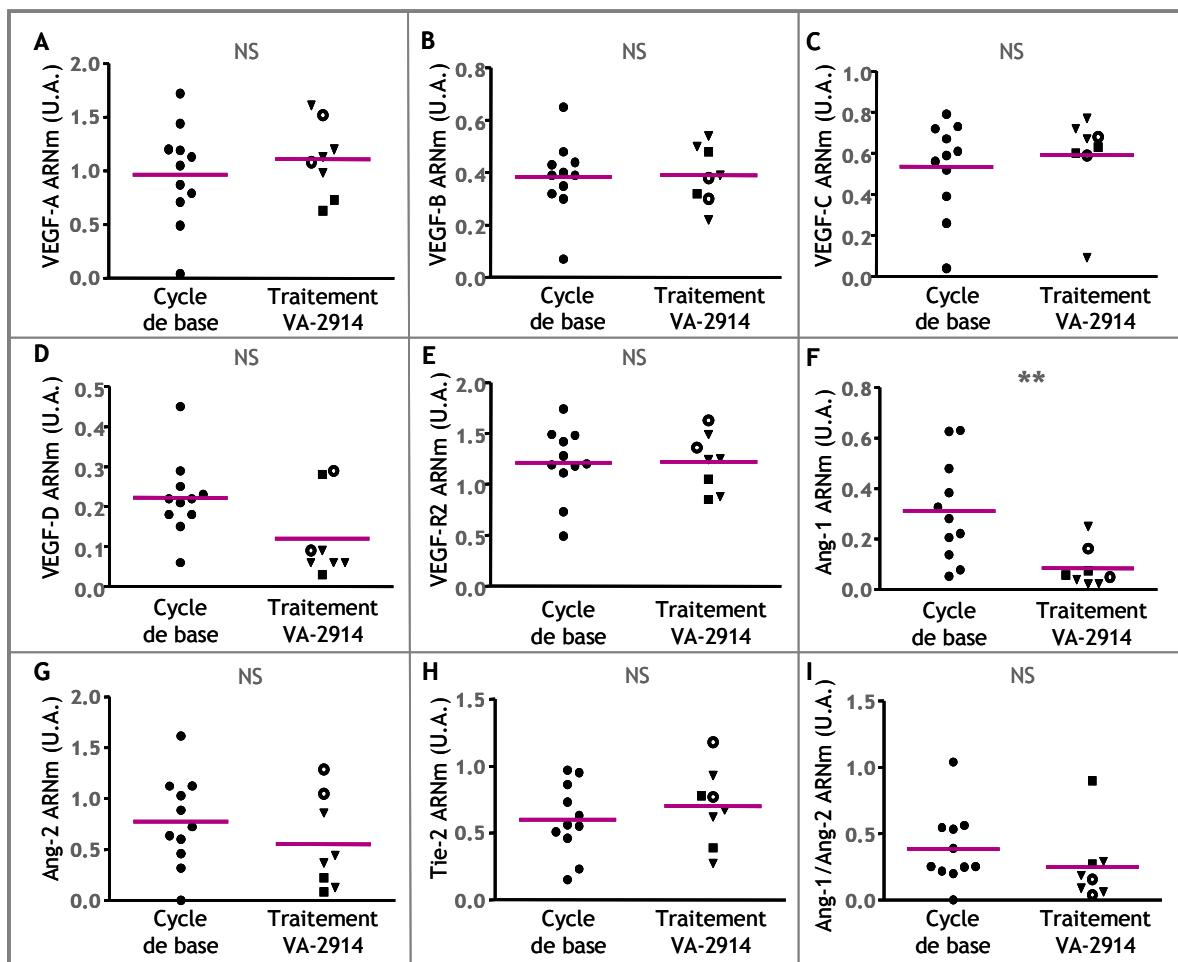
Expression en ARNm des métalloprotéinases matricielles et leurs inhibiteurs dans l'endomètre durant le cycle de base (●) ($n=11$) et après 3 mois de traitement avec les différentes doses de VA2914 (○ 2,5 mg/j ; ▼ 5 mg/j ; ■ 10 mg/j) (U.A.=unité arbitraire) (NS=non significatif ; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$).

c) Effet du VA2914 sur l'expression des facteurs angiogènes

Outre l'expression du VEGFA exposée ci-dessus, celle des ARNm des VEGFB, C, D et de leurs récepteurs, VEGF-R1 et 2, des angiopoïétines 1 et 2 et du récepteur Tie-2 a également été recherchée. Cette analyse a été réalisée par RT-PCR sur les tissus endométriaux recueillis chez 11 patientes en cycle témoin et 8 patientes sous VA2914.

L'ARNm du VEGF-R1 n'a pu être détecté dans nos échantillons.

Le rapport ARNm Ang-1 sur ARNm Ang-2 n'apparaît pas modifié par la thérapeutique. L'expression des autres facteurs angiogènes analysés n'est pas modifiée lors du traitement par VA2914. Ces différentes données n'ont pas été publiées.



Expression en ARNm des cytokines angiogènes (VEGF-A,-B,-C,-D, VEGFR2 et Ang-1, -2, Tie-2) dans l'endomètre durant le cycle de base (●) ($n=11$) et après 3 mois de traitement avec les différentes doses de VA2914 (○ 2,5 mg/j ; ▼ 5 mg/j ; ■ 10 mg/j) (U.A.=unité arbitraire) (NS=non significatif ; ** $p \leq 0,005$).

D. DISCUSSION GÉNÉRALE

Nous avons réalisé la première étude évaluant le potentiel antigonadotrope éventuel du VA2914 dans l'espèce humaine.

Celui-ci permet d'inhiber l'ovulation à partir de 5 mg en prise quotidienne orale. Cette inhibition gonadotrope observée peut être attribuée à un effet agoniste de la molécule. Néanmoins, par rapport aux progestatifs antigonadotropes utilisés classiquement en clinique, le VA2914 aux doses étudiées n'exerce pas un effet freinateur des gonadotrophines aussi puissant et ne s'accompagne pas d'une réduction du taux d'estradiol plasmatique. Ses effets moins intenses sur l'axe gonadotrope que ceux observés sous progestatif sont néanmoins dose dépendante et ne seraient pas attribuables à la classe médicamenteuse.

Il a été rapporté très récemment une freinatation des gonadotrophines et du taux d'estradiol par un composé proche, le CBD-4124 administré à des doses allant de 12,5 mg quotidiennement à 50 mg dans le cadre d'une étude de phase II concernant l'efficacité éventuelle de la molécule sur l'endométriose ou sur les fibromes utérins (Ioffe *et al.* 2009). L'inhibition gonadotrope plus importante à haut dosage permet d'obtenir également une freinatation du taux de FSH et de l'induction de l'aromatase.

Les doses de 5 et 10 mg de VA2914, utilisées lors de notre protocole ont l'avantage de permettre l'obtention d'un effet anti-ovulatoire sans altérer le taux d'estradiol endogène, évitant les potentiels effets secondaires à long terme de la carence estrogénique. Chez 4 patientes sous 5 ou 10 mg de VA2914, une élévation temporaire de la LH a été observée. D'autre part, une ovulation a été observée chez certaines patientes témoignant d'une variabilité individuelle de la freinabilité de l'axe gonadotrope et de l'insuffisance des dosages utilisés pour obtenir une reproductibilité parfaite chez toutes les patientes. Néanmoins, l'effet contraceptif potentiel de cette molécule n'étant pas uniquement déterminé par son impact gonadotrope, les dosages de 5 et 10 mg pourraient s'avérer non seulement suffisants mais aussi les plus intéressants afin d'éviter la carence estrogénique éventuelle induite par un dosage supérieur.

Les mécanismes exacts par lesquels le VA2914 exerce son activité antigonadotrope ne sont pas connus. A la lumière des mécanismes décrits pour les progestatifs et la mifépristone, il est possible de suspecter un rôle à la fois hypothalamique et hypophysaire. Il est logique également de faire le rapprochement avec le mécanisme d'action de la mifépristone qui, au niveau pituitaire, inhibe la sécrétion des gonadotrophines, permettant à faible dose d'inhiber le pic de la LH sans réduire le taux d'estradiol (Heikinheimo *et al.* 1996; Sarkar 2002). L'absence de modification de réponse pituitaire à l'administration de la GnRH en présence de

mifépristone permet également d'envisager un rôle hypothalamique important dans le contrôle antigonadotrope exercé par les PAs et les SPRMs (Heikinheimo *et al.* 1995)

Contrairement à la mifépristone qui inhibe le développement folliculaire (Croxatto *et al.* 1993), nous n'avons pas observé d'inhibition de la croissance folliculaire. De plus, nous avons observé des kystes fonctionnels qui se sont résolus spontanément. Ceux-ci sont probablement favorisés par l'absence de freination des gonadotrophines mais également par l'absence de pic de LH qui ne permet pas la rupture folliculaire, favorisant ainsi les follicules persistants. Il est à remarquer que nous avons observé un kyste non fonctionnel dans l'étude qui s'est avéré être de l'endométriose non inhibée par la thérapeutique alors que d'autres SPRMs sont en développement dans cette indication (Chwalisz *et al.* 2005).

Au cours de l'étude, les stéroïdes sexuels ont présenté des valeurs stables ne permettant pas de réaliser une activité d'interrupteur neuro-endocrinien, de déclencher le pic de la LH et l'ovulation (Clarke 1995; Leyendecker *et al.* 1972). L'élévation temporaire de la LH chez 4 patientes ne s'accompagne pas de sécrétion de progestérone. Il est possible que la chronologie du pic de la LH soit inadéquate par rapport à la maturation folliculaire.

A la lumière des données actuelles, nous ne sommes pas en mesure d'envisager un rôle intra-ovarien spécifique du VA2914. Un effet ovarien direct de la mifépristone a été suggéré. En effet, sous cette molécule administrée à dose unique de 10 mg chez des femmes présentant des follicules de 11 mm de diamètre maximum, on observe une inhibition des taux d'inhibine sans modification des taux de la FSH (Heikinheimo *et al.* 2005). L'onapristone présente également un rôle intra-ovarien inhibant la production de progestérone et réprimant l'expression de PR dans les cellules de la granulosa (Donath *et al.* 1997).

Nous n'avons pas observé de compaction de la glaire cervicale sous VA2914. Au contraire, des pertes physiologiques transparentes abondantes ont été constatées fréquemment tout au long de l'étude chez des patientes sous traitement. Néanmoins, cet effet n'a pu être quantifié valablement par le design de l'étude. On peut admettre que sur ce paramètre le VA2914 n'exerce pas un effet agoniste.

De l'acné a été observé chez 18 et 25 % des patientes sous 5 et 10 mg de VA2914 quotidiennement. Cet effet secondaire significativement augmenté sous la thérapeutique, est probablement le reflet de la non-inhibition gonadotrope. Si les taux de testostérone totale sont restés dans les valeurs normales, il est possible que le taux de la testostérone libre ait été modifié. Une origine ovarienne de cet effet secondaire est vraisemblable. En effet, le VA2914 a une très faible affinité pour AR (affinité de liaison relative de 15 % par rapport à la dihydrotestostérone) (Chabbert-Buffet 2006).

L'observation du profil de saignement montre un très haut taux d'aménorrhée atteignant 81,2 % chez les patientes soumises à 5 mg de VA2914 et 90 % chez des patientes soumises à 10 mg. La durée moyenne du saignement diminue en cours de traitement pour atteindre 1,25 jour au troisième mois de traitement sous 5 mg de VA2914 et 0,3 jour sous 10 mg. Cet effet clinique n'est pas superposable à celui observé sous progestatif seul sous lequel les saignements indésirables représentent un tel inconfort que 25 % des patientes suspendent leur thérapeutique (Vekemans *et al.* 1997). Une angiogenèse aberrante est observée sous progestatif. Une modification de la densité vasculaire endométriale et une altération de la maturation de la paroi des vaisseaux, déficiente en péricytes et en cellules musculaires lisses ont été décrites (Hickey *et al.* 1999b; Hickey *et al.* 2000; Jondet *et al.* 2005; Rogers *et al.* 1993; Stephanie *et al.* 2007). Des altérations de la membrane basale sous progestatif sont également constatées (Hickey *et al.* 1999a) ainsi que des altérations de la MEC (Galant *et al.* 2000).

Les observations échographiques ne montrent pas de modifications d'épaisseur de l'endomètre sous VA2914 par rapport au cycle contrôle. L'épaisseur endométriale moyenne observée au troisième cycle sous VA2914 (de 4,8 mm sous 2,5 mg, 6,7 mm sous 5 mg et 5,5 mm sous 10 mg) et l'aspect endométrial échographique ne correspondent pas aux éléments échographiques habituels visualisés en phase sécrétoire. D'autre part, si cette épaisseur n'est pas celle d'une phase lutéale normale, elle n'est pas non plus représentative d'une imprégnation par progestatif seul. Dans ce cas, l'endomètre est généralement fin, linéaire. Un aspect échographique particulier a été observé chez 8 patientes sur 20 comprenant 2 couches hyperéchogènes séparées par une lame hypoéchogène suggérant la présence de liquide ou de glaire entre les 2 feuillets. Ces effets ne sont pas classiques d'une imprégnation progestative endométriale. Selon l'étude rapportée récemment par Ioffe et als, un accroissement échographique de l'épaisseur endométriale non relié à la dose est observé sous CDB4124 de 12,5 à 50 mg administré quotidiennement dans un contexte d'endométirose ou de fibromatose utérine. Une aménorrhée est décrite chez ces patientes. L'échogénicité endométriale n'est pas rapportée (Ioffe *et al.* 2009).

Les caractéristiques histologiques observées au sein de l'endomètre au cours du cycle menstruel sont bien établies. Les effets mitogéniques des estrogènes dominent la phase folliculaire et les modifications sécrétaires induites par la progestérone caractérisent la phase lutéale {Noyes, 1950 389 /id}.

Si la mifépristone est utilisée largement dans de nombreux pays à court terme dans l'indication des interruptions de grossesse, actuellement aucun SPRM ne possède d'indication

clinique à long terme. Les répercussions endométriales de cette nouvelle famille de stéroïdes sont à l'étude. Certains paramètres histologiques pourraient s'avérer inquiétants pour un usage à long terme. L'utilisation d'asoprisnil ou de mifépristone, pour des durées de 2-3 mois, est accompagnée d'un épaississement endométrial et de dilatation kystique des glandes (Baird *et al.* 2003b; Williams *et al.* 2007). Cet aspect kystique de l'endomètre apparaît très important sous le nouveau composé étudié, le CDB-4124, à hautes doses et à plus long terme. Dans les endomètres sous CDB-4124, les formations kystiques présentent des parois fines. Le stroma endométrial apparaît fortement réduit (Ioffe *et al.* 2009) .

L'objection principale de l'utilisation à long terme des SPRMs est constituée par leurs propriétés antagonistes de PR au niveau de l'endomètre permettant ainsi une stimulation estrogénique non opposée par une molécule à action progestative. L'absence d'imprégnation progestative accroît de 2 à 10 fois le risque de cancer endométrial (Shapiro *et al.* 1985; Zeleniuch-Jacquotte *et al.* 2001).

Les anomalies endométriales décrites sous SPRMs ne se limitent pas aux glandes endométriales mais également aux vaisseaux. Sous asoprisnil, les parois vasculaires paraissent épaissies comme classiquement dans les polypes endométriaux. Cet aspect vasculaire apparaît distribué à travers tout l'endomètre.

La présence de dilatations glandulaires kystiques au sein de l'endomètre est habituellement observée chez les patientes en anovulation.

L'activité mitotique endométriale en présence de signes de différentiation sécrétoire a soulevé suffisamment d'inquiétudes pour qu'un panel d'experts anatomopathologistes de l'endomètre examinent en aveugle des biopsies d'endomètre soumis à différents SPRMs émettant conclusions et réserves et aboutissant à une nouvelle classification anatomopathologique.

Les modifications particulières observées dans les endomètres soumis aux SPRMs sont regroupées sous le terme PAEC, c'est-à-dire « PRM Associated Endometrial Changes » (Mutter *et al.* 2008). Ces modifications regroupent les anomalies architecturales de l'endomètre (kystes), les anomalies épithéliales et vasculaires. Jusqu'à présent, aucune lésion atypique ou néoplasique de l'endomètre n'a été observée sous SPRMs.

Les caractéristiques endométriales observées ne rentrent dans aucune catégorie classiquement décrite par l'OMS, permettant un diagnostic précis. Il existe une combinaison non physiologique de caractéristiques histologiques non observées de concert dans un endomètre normal à un moment du cycle. Des glandes inactives ou apoptotiques apparaissent au sein d'un stroma intact. Une métaplasie tubaire ciliée apparaissant normalement sous un climat

estrogénique est présente au sein d'un endomètre présentant des caractéristiques sécrétoires ou d'inactivité. Les glandes peuvent présenter une activité mitotique au sein de modifications sécrétoires ou en présence de cellules apoptotiques. Les glandes kystiques présentent une activité mitotique faible ou une différentiation sécrétoire. Les glandes les plus dilatées sont entourées d'une paroi fine. Des modifications vasculaires sont également constatées comme les ectasies vasculaires dans le stroma et l'épaississement des parois vasculaires. Des thrombi n'ont pas été visualisés dans les vaisseaux ectasiques contrairement à la situation observée sous estrogènes non opposés. Le stroma ne présente pas de caractéristiques attribuables à une imprégnation progestative. Il apparaît fibreux et présente des figures mitotiques. Il est désynchronisé par rapport aux modifications glandulaires. En concordance avec les observations de la littérature récemment rapportées sur les modifications histologiques induites par les SPRMs, nous n'avons pas observé d'atypie endométriale. Une désynchronisation entre le stroma et les glandes a été observée, le stroma conservant un aspect de phase folliculaire par sa densité et sa prolifération cellulaire alors que les glandes présentent un aspect sécrétoire. Les glandes apparaissent plus larges qu'en phase folliculaire et polarisées avec des sécrétions. Des glandes kystiques ont été observées chez 2 patientes, l'une sous 2,5 mg de VA2914 et l'autre sous 10 mg, toutes 2 présentant un cycle anovulatoire. Les marqueurs de prolifération nous ont permis de montrer une persistance de celle-ci dans le stroma quelle que soit la phase du cycle physiologique et le traitement. Dans l'épithélium glandulaire, la prolifération persiste de façon minime en cas d'anovulation en faveur d'un effet antagoniste de la substance sur l'endomètre.

Les répercussions à long terme restent à évaluer.

Sous mifépristone, 2 à 5 mg durant 6 mois, la prolifération endométriale paraît abolie (Baird *et al.* 2003b). La prudence veut que chaque composé de cette nouvelle classe thérapeutique soit évalué séparément à longue échéance en terme de sécurité endométriale.

Dans une phase lutéale physiologique ou dans un endomètre soumis aux progestatifs, ER et PR sont réprimés. Concernant l'expression de ER et PR, le VA2914 ne se comporte pas comme un progestatif. L'expression de l'ARNm de ER α et de ER β n'est pas modifiée et l'expression de l'ARNm de PR est induite témoignant d'un effet antagoniste. Néanmoins, une régulation négative de ER et PR est décrite dans les glandes des patientes traitées mais ovulatoires. Une détection spécifique de PRB apparaît plus intense dans les glandes des patientes traitées par VA2914 et anovulatoires, par rapport aux patientes traitées ovulatoires.

L'immunodétection de AR ne présente pas d'augmentation sous VA2914 contrairement à ce qui est rapporté pour la mifépristone (Slayden *et al.* 2001). Par contre, l'expression de PRB est

exacerbée sous mifépristone 200 mg comme nous l'avons observé sous VA2914 chez les patientes anovulatoires (Sun *et al.* 2003).

Les effets du VA2914 sur l'endomètre sont donc modulés par la présence ou non de progestérone. L'expression de PRB dans l'endomètre humain sous VA2914 alors que la prolifération est réduite, suggère un rôle de PRB qui mérite d'être clarifié. En effet, il est classiquement admis suite aux expériences sur les murins que le contrôle de la prolifération cellulaire endométriale par les molécules progestatives est sous le contrôle de PRA et non de PRB (Conneely *et al.* 2003; Mulac-Jericevic & Conneely 2004). Néanmoins, très récemment une prolifération endométriale conduisant à l'hyperplasie a été observée chez des souris surexprimant naturellement PRA par rapport à PRB. Cette modification endométriale est inhibée par la mifépristone, démontrant un contrôle de la prolifération endométriale indépendant d'un mécanisme estrogénique. La régulation de la prolifération endométriale est soumise au rapport ER/PR mais également à celui des isoformes de PR (Fleisch *et al.* 2009).

Contrairement aux patientes soumises aux progestatifs seuls, les patientes sous VA2914 présentent un haut taux d'aménorrhée. Lors du saignement physiologique menstruel comme lors de l'administration du progestatif seul, la dégradation locale du stroma endométrial et une lyse du réseau fibrillaire riche en collagène sont classiquement observées (Galant *et al.* 2000). Sous VA2914, aucune dégradation de la MEC n'a été observée. Le rôle des MMPs dans les saignements normaux et pathologiques de l'endomètre humain est bien connu. La MEC de l'endomètre est constituée notamment de fibres de collagène de types I et III, de fibronectine, d'acide hyaluronique. Du collagène de type IV et de la laminine sont présents dans les lames basales des glandes et des vaisseaux sanguins. Les éléments matriciels sont la cible des MMPs. L'ARNm de ces MMPs est environ 1000 fois plus abondant dans l'endomètre menstruel que dans l'endomètre prolifératif ou sécrétoire. Les stéroïdes ovariens participent à la régulation des MMPs (Vassilev *et al.* 2005) Lors du saignement physiologique, la production endométriale de MMPs-1, 3, 8, 9 et 14 augmente (Goffin *et al.* 2003; Vassilev *et al.* 2005). Une augmentation de l'activité des MMPs1, 2, 3, 9 est observée au niveau des endomètres hémorragiques sous progestatif alors qu'une diminution de celle du TIMP-1 est constatée (Galant *et al.* 2000; Galant *et al.* 2004). L'expression des MMPs-1, 2, 3, 7, 9 et 12 apparaît plus importante lors des premiers mois d'utilisation du DIU-LNG suggérant leur rôle dans les altérations de la MEC et dans les saignements fonctionnels observés. Au cours du temps, la réduction du pourcentage des patientes exprimant la MMP-2 et 3 peut contribuer à expliquer la diminution des saignements indésirables observés à plus long terme sous ce

même dispositif (Labied *et al.* 2009). Sous VA2914, les ARNm de 2 MMPs prédominantes au moment des menstruations, à savoir la 1 et la 3, sont non détectables. La MMP-7, la matrilysine, est augmentée sous VA2914. Cette MMP est surtout exprimée en phase proliférative et réprimée par la progestérone. Les TIMPs de type 1 et 2 ne sont pas influencés par le VA2914, par contre l'expression du TIMP-3 apparaît diminuée. Le profil d'expression des MMPs dans l'endomètre des patientes traitées par VA2914 peut contribuer à la stabilité endométriale observée. La réduction du taux de saignement en début de traitement par dépôt de MPA est observée lors de l'adjonction de mifépristone et accompagnée d'une diminution de l'expression de la MMP-1 et 9 (Li *et al.* 2007; Li *et al.* 2007; Li *et al.* 2007; Li *et al.* 2007; Li *et al.* 2008).

L'administration de 50 mg de mifépristone tous les 14 jours chez les nouvelles utilisatrices du dépôt de MPA est accompagnée d'une augmentation de l'expression de ER α , PRA et PRB. Cette induction n'est plus visible après 10 semaines de traitement. Une atrophie endométriale est constatée en fin de traitement (Li *et al.* 2008). Sous mifépristone 2 ou 5 mg, administrée durant 120 jours, la densité vasculaire apparaît augmentée et l'expression du VEGF estimée de façon semi-quantitative par immunohistochimie paraît diminuée chez les patientes en aménorrhée (Narvekar *et al.* 2006). Sous VA2914, nous ne constatons pas de modification de l'expression du VEGFA ni de modification de sa distribution qui apparaît prédominante au niveau de la portion apicale des cellules épithéliales de surface et glandulaires. L'absence de modification de la distribution et de l'intensité du marquage du VEGFA et la stabilité du rapport Ang-1/Ang-2 avant et sous traitement par VA2914 n'est pas en faveur d'un remodelage vasculaire important. Un déséquilibre dans la production de l'Ang-1 et Ang-2 a été suggéré comme mécanisme participant aux saignements fonctionnels (Hewett *et al.* 2002). Chez les patientes sous progestatif, l'expression de l'Ang-1 est réduite alors que celle de l'Ang-2 est augmentée. Ce rapport modifié pourrait être à l'origine d'une anomalie de maturation des vaisseaux sanguins pouvant expliquer les saignements indésirables (Hewett *et al.* 2002).

L'observation de la vascularisation endométriale exposée au DIU-LNG durant 1 à 3 mois montre une augmentation très importante (11,5 fois) des petits vaisseaux non matures constitués exclusivement d'un endothélium. Le nombre de vaisseaux partiellement matures est augmenté de 6 fois. Au plus long cours, ces vaisseaux immatures ou partiellement matures restent néanmoins 4 fois plus fréquents que dans les endomètres non soumis à cette thérapeutique. La surface vasculaire et la densité augmentent au cours du temps sous le DIU-LNG (Stephanie *et al.* 2007). De telles modifications ne sont pas observées sous VA2914 et

peuvent contribuer l'absence de saignement. Au cours du cycle témoin, nous avons observé la présence de vaisseaux matures occupant 80 % de la surface vasculaire totale. Après 3 mois de traitement sous VA2914 aux différentes doses, aucun changement vasculaire n'est observé. Au niveau du réseau vasculaire endométrial, le VA2914 ne paraît donc pas se comporter comme un agoniste.

Nous assistons actuellement à l'émergence d'une nouvelle classe thérapeutique de stéroïdes : celle des SPRMs.

Des propriétés antigonadotropes peuvent être observées selon le dosage utilisé et permettent d'inhiber l'ovulation comme les progestatifs.

Les propriétés abortives du chef de file que constitue la mifépristone sont largement utilisées à travers le monde. L'administration ponctuelle de membres de cette famille est admise pour mettre fin à une grossesse (mifépristone) ou en contraception d'urgence (mifépristone et VA2914).

L'administration à plus long terme n'est réalisée actuellement qu'au cours d'études cliniques. Celles-ci concernent l'asoprisnil dans le traitement des léiomyomes utérins ou de l'endométriose en phase II et III, le VA2914 en phase II dans la thérapeutique préopératoire de léiomyome, le Proellex dans le traitement des léiomyomes et de l'endométriose et la mifépristone dans le domaine des léiomyomes et du cancer du sein.

La sécurité endométriale à long terme reste la préoccupation majeure du corps scientifique dans le développement de ces molécules. La définition d'une nouvelle entité anatomopathologique a émergé de la confrontation des observations endométriales sous SPRMs par un panel d'experts. Néanmoins, l'avenir devra nous dire s'il est raisonnable d'utiliser ces composants en administration continue ou séquentielle.

Si un certain nombre de critères histologiques apparaissent communs aux endomètres soumis aux SPRMs, selon l'agent, la dose et le schéma d'administration, les effets peuvent être variables. La sécurité de chaque molécule en particulier devra donc être évaluée à long terme. La stabilité du réseau vasculaire et de l'expression des molécules contrôlant l'angiogenèse, l'absence de caractéristiques histologiques spécifiques d'endomètres sous estrogènes non opposés par un progestatif sont néanmoins des éléments rassurants.

**E. CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

Dans le domaine extrêmement important de santé publique que constitue la pathologie mammaire, la place des SPRMs doit être définie.

En effet, ces molécules aux potentialités antagonistes de PR pourraient trouver une place à la fois dans le traitement et la prévention des néoplasies mammaires. Chez les souris déficientes en Brca1/p53, la mifépristone a montré des propriétés antitumorales sur la glande mammaire (Poole, 2006 science). Par contre, les progestatifs sont connus pour majorer le risque de cancer du sein (Beral 2003; Rossouw *et al.* 2002).

Dans un avenir proche, l'amélioration de la compliance au DIU-LNG durant les premiers mois de traitement, pourrait être une des premières applications des SPRMs. En effet, l'adjonction de mifépristone à un implant sous cutané au LNG a permis d'observer une diminution des saignements indésirables (Cheng *et al.* 2000).

Dans le développement de la contraception sans estrogène, la famille des SPRMs doit trouver sa place. La sécurité endométriale à long terme doit bien sûr être évaluée ainsi que les effets secondaires de chaque substance en développement. Le profil de saignement doit également être établi à plus long terme. En fonction de ces paramètres, des schémas d'administration avec ou sans progestatifs pourraient être dégagés.

Les progestatifs synthétiques associés aux estrogènes ont d'importantes conséquences cardiovasculaires. Actuellement, nous ne disposons pas de données des effets des SPRMs dans ce domaine qui reste un large champ d'exploration.

Les expérimentations sur les propriétés angiogènes ou non des SPRMs sont encore très limitées. Les premiers résultats ne sont pas en faveur de l'augmentation de l'expression des facteurs pro-angiogènes dans l'endomètre. Les propriétés exactes des membres de cette famille des SPRMs dans l'angiogenèse méritent d'être établies et ce de façon tissu dépendante afin d'évaluer un potentiel thérapeutique dans ce domaine.

Face aux différents champs d'action possibles des SPRMs en clinique, ces molécules nourriront encore longtemps la recherche fondamentale.

F. ANNEXES



Axelle Pintiaux

Nouveautés en contraception d'urgence

Axelle Pintiaux, Jean Michel Foidart

Département de Gynécologie-Obstétrique, CHR de la Citadelle, ULg Liège

KEYWORDS: EMERGENCY CONTRACEPTION – POST COITAL CONTRACEPTION – SELECTIVE PROGESTERONE RECEPTOR MODULATOR

La contraception d'urgence évolue vers des molécules de plus en plus efficaces et aux délais d'action prolongés. Les modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone sont en cours de développement dans ce domaine. La réduction des dosages permet la réduction des coûts et l'utilisation de la médication en une seule prise augmente la compliance. La diffusion large de l'information concernant la contraception post-coïtale doit bien sûr accompagner les progrès technologiques réalisés ces dernières années.

Introduction

La contraception d'urgence désigne un groupe de méthodes de prévention de la grossesse utilisées durant les premiers jours après un rapport sexuel non protégé (1): les estrogènes à haute dose, le danazol, le dispositif intra-utérin, la contraception estro-progestative à haute dose (régime de Yuzpe: 100µg d'éthinodiol combiné à 500µg de lévonorgestrel administrés dans les 72 heures suivant un rapport non protégé et répétés 12 heures plus tard), le progestatif seul (lévonorgestrel administré à la dose de 0,75mg dans les 72 heures suivant un rapport non protégé et répété 12 heures plus tard ou en une seule prise 1,5mg dans les 72 heures suivant un rapport non protégé) et les anti-progestérone ou modulateurs sélectifs du récepteur de la progestérone (SPRMs) (2).

L'utilisation de la contraception post-coïtale ou d'urgence devrait être diffusée davantage et être systématique lors de l'utilisation inappropriée de la contraception classique, lors d'accidents survenus durant cette utilisation (rupture du préservatif, oubli de 2 pilules ou plus...) ou dans un contexte de non-utilisation de la contraception ou d'agression sexuelle. Néanmoins, cette méthode ne doit pas se substituer à la méthode de contrôle des naissances mise en place préventivement, son efficacité étant plus grande que la contraception de «ratrapage». D'autre part, cette contraception d'urgence n'offre pas de protection vis-à-vis des maladies sexuellement transmissibles (3). Dans certains pays, où la diffusion de l'information concernant la contraception d'urgence est

large, l'utilisation de cette contraception permet de réduire les grossesses non désirées, notamment chez les adolescentes, et permet d'observer une réduction importante du taux d'avortement. Au contraire, aux Etats-Unis, où la diffusion de cette contraception est faible, approximativement la moitié des grossesses sont non programmées et la moitié de celles-ci se terminent par un avortement (4).

La contraception d'urgence utilisée après un seul rapport sexuel non protégé et dans les délais recommandés peut prévenir jusqu'à 89% du risque de grossesse. La possibilité de cette seconde chance doit donc être diffusée largement et l'accès à cette contraception d'urgence facilité. Placer des barrières pour accéder à cette contraception est une forme de violation des droits fondamentaux humains. Le lévonorgestrel, en tant que contraception d'urgence, fait partie de la liste des médicaments essentiels de la *World Health Organization* (WHO), enregistrée et reconnue dans plus de 100 pays.

La contraception d'urgence par lévonorgestrel, n'ayant pas de contre-indication et rencontrant les critères d'une molécule disponible sans prescription, doit pouvoir être obtenue dans un délai court nécessaire à son efficacité. Néanmoins, à l'heure actuelle, il existe encore de nombreux pays où l'obtention du lévonorgestrel en contraception d'urgence passe par la prescription d'un médecin, ce qui retarde, de façon injustifiée, la prise du traitement (5). Les réticences de prescription ou de diffusion peuvent provenir des médecins eux-mêmes, des pharmaciens ou des représentants gouvernementaux suite à la croyance non fondée d'un effet préventif du lévonorgestrel sur l'implantation de l'oeuf fertilisé. Le lévonorgestrel, molécule progestative, ne peut inhiber l'implantation de l'oeuf et n'affecte pas une grossesse existante. Par contre, le lévonorgestrel peut retarder ou prévenir l'ovulation. Il peut également interférer avec la fonction du sperme (6-12). Une autre réticence quant à la diffusion de la contraception d'urgence provient de la crainte d'une moindre utilisation de méthodes contraceptives préventives ou de protection contre les maladies sexuellement transmissibles (préservatif). Néanmoins, plusieurs études

ont montré que la disponibilité de la contraception d'urgence ne réduisait pas l'utilisation des préservatifs et ne modifiait pas le comportement contraceptif préventif (13, 14).

Une autre équipe a étudié l'effet d'une provision en contraception d'urgence. Celle-ci, néanmoins, n'a pu montrer une diminution du taux de grossesse. Par contre, elle n'a pas montré une augmentation du taux de maladies sexuellement transmises. Le taux d'utilisation du préservatif n'a pas été modifié chez ces patientes qui bénéficiaient de la contraception d'urgence prescrite à l'avance (15).

Un autre obstacle est le prix élevé de la contraception d'urgence dans certains pays. L'étude de la pharmacocinétique de la prise d'une dose unique d'1,5mg de lévonorgestrel comparée à l'administration de 50 mini-pilules à 30µg de lévonorgestrel a montré une biodisponibilité comparable dans les deux groupes. Lorsque la préparation de 1,5mg de lévonorgestrel n'est pas disponible, il est donc légitime de préconiser la prise des 50 mini-pilules de 30µg qui sont généralement largement diffusées et à bas prix dans la plupart des pharmacies, et même dans les régions rurales reculées (16).

Si l'insertion post-coïtale d'un dispositif intra-utérin au cuivre est une option efficace jusqu'au 5^{ème} jour après la date présumée de l'ovulation, néanmoins, cette méthode est plus contraignante que la prise d'un médicament par voie orale, nécessitant une équipe disponible et entraînée à la mise en place de ce dispositif (17).

Evolution de la contraception d'urgence au cours du temps

Si le régime de Yuzpe a été longtemps la seule méthode médicamenteuse dont nous disposions, celle-ci fut supplante par l'utilisation du lévonorgestrel. Deux études, une chinoise et une multinationale, ont comparé l'utilisation du lévonorgestrel à 0,75mg donné en deux fois à 12 heures d'intervalle avec le régime de Yuzpe. L'utilisation du lévonorgestrel s'est avérée plus efficace que le régime de Yuzpe (risque relatif 0,51). Les plaintes digestives étaient significativement réduites avec l'utilisation du lévonorgestrel. Le profil de saignement et le temps de réapparition des règles ne différaient pas entre les 2 traitements.

Ensuite, l'utilisation du lévonorgestrel en 2 administrations de 0,75mg à 12 heures d'intervalle a été comparée à l'utilisation du lévonorgestrel en une seule prise à la dose de 1,5mg. L'efficacité des 2 formes d'administration est similaire ainsi que les effets secondaires, à l'exception des maux de tête qui sont plus importants dans le groupe traité par l'administration de 1,5mg de lévonorgestrel en une prise (17).

Une autre famille de stéroïdes a également été étudiée dans le domaine de la contraception d'urgence. Il s'agit des modulateurs

du récepteur de la progestérone dont le chef de file, connu pour ses propriétés antagonistes du récepteur de la progestérone et ses capacités abortives, est la mifépristone.

La mifépristone a été étudiée en contraception d'urgence à la dose de 600mg, 50mg, 25mg et 10mg. Celle-ci peut être administrée jusqu'à 120 heures après le rapport sexuel non protégé. La réduction des doses de mifépristone et l'allongement du délai post-coital n'ont pas montré de réduction d'efficacité. Par contre, en réduisant la dose de mifépristone, la perturbation du cycle est moins importante et le retour des règles se fait plus précocement. Le délai observé dans le retour de règles est attribuable aux propriétés antagonistes du récepteur de la progestérone. Cette molécule administrée en phase pré-ovulatoire bloque l'ovulation et retarde les menstruations. Cet allongement est néfaste car une ovulation peut survenir plus tard au cours de ce cycle prolongé si aucune autre contraception n'est utilisée. D'autre part, l'allongement du cycle est un facteur d'anxiété pour les patientes (18, 19).

La mifépristone interfère avec la fonction folliculaire et l'ovulation, induit la lutéolyse et modifie l'endomètre en fonction du dosage et du schéma d'administration (20). La prise de mifépristone retardée entre la 72^{ème} et la 120^{ème} heure après un rapport sexuel non protégé ne semble pas diminuer son efficacité. Les effets secondaires de la mifépristone sont moindres que ceux observés lors de la prise du régime de Yuzpe et similaires à ceux observés sous lévonorgestrel. L'efficacité de la mifépristone est telle que les études comparant son efficacité au régime de Yuzpe ont été interrompues et le régime de Yuzpe abandonné. Peu d'informations existent sur l'utilisation de la mifépristone et du taux de grossesses extra-utérines. Les études sur les rats montrent un transport accéléré de l'oeuf fertilisé dans la trompe du rat sous antiprogestagène (21).

Si une patiente porte une grossesse extra-utérine, la mifépristone ne perturbera pas le développement de celle-ci (22). La proportion de grossesses extra-utérines observées dans les études sur la mifépristone ne montre pas d'incidence modifiée par rapport à la population générale (23).

Le VA 2914, modulateur sélectif du récepteur de la progestérone, a également été testé en contraception d'urgence en comparaison au lévonorgestrel administré en 2 fois dans les 72 heures suivant un rapport non protégé. Le VA 2914 permet de prévenir 85% des grossesses prévues en fonction du jour du cycle où est survenu le rapport non protégé, contre 69% dans le groupe sous lévonorgestrel. Les effets secondaires sont similaires dans les 2 groupes, à l'exception des nausées qui apparaissent augmentées dans le groupe sous VA 2914. Cet effet n'est néanmoins pas rapporté dans la littérature sous cette molécule à des dosages plus élevés (24, 25). Le VA 2914 est un modulateur du récepteur de la progestérone de seconde génération qui possède moins d'activité antiglucocorticoïde que la mifépristone et ne possède pas de propriétés abortives.

Dans cette étude, le lévonorgestrel montre une efficacité décroissante après les 48 heures de délai alors que sous VA 2914, l'efficacité ne semble pas décroître au cours du temps. Chez les patientes sous VA 2914 qui ont pris le traitement 4 jours ou plus après le jour supposé de l'ovulation, aucune grossesse n'est surveillée, contrairement aux patientes sous lévonorgestrel pris dans les mêmes conditions. Le retour des règles a lieu 2 jours plus tôt que les règles prévues chez les utilisatrices du lévonorgestrel et avec un retard de 2,6 jours chez les utilisatrices du VA 2914.

Cette nouvelle molécule que représente le VA 2914 semble prometteuse en contraception d'urgence avec une efficacité élevée et prolongée dans le temps.

En conclusion, la contraception d'urgence évolue vers des molécules de plus en plus efficaces et aux délais d'action prolongés. La réduction des dosages permet la réduction des coûts. L'utilisation de la médication en une seule prise augmente la compliance. La diffusion large de l'information concernant la contraception post-coïtale doit bien sûr accompagner les progrès technologiques réalisés ces dernières années.

Références

- Westley E, von Hertzen H, Faundes A. Expanding access to emergency contraception. *Int J Gynaecol Obstet*. 2007 Jun;97(3):235-7. Epub 2007 Apr 19.
- Creinin MD, Schaff W, Archer DF, Wan L, Frezires R, Thomas M, Rosenberg M, Higgins J. Progesterone receptor modulator for emergency contraception: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*. 2006 Nov;108(5):1089-97.
- World Health Organization. Levonorgestrel for emergency contraception- Fact sheet, accessed January 23, 2007 at www.who.int/reproductive-health/family_planning/e.htm.
- Haspels AA. Emergency contraception: a review. *Contraception* 1994; 50: 101-8.
- Task force on postovulatory methods of fertility regulation: randomized controlled trial of Levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. *Lancet* 1998; 352: 428-33.
- Novikova N, Weisberg E, Stanczyk FZ, Croxatto HB, Fraser IS. Effectiveness of levonorgestrel emergency contraception given before or after ovulation – a pilot study. *Contraception* 2007;75: 112-8.
- Marlins I, Hultenby K, Lindell I, et al. Emergency contraception with mifepristone and levonorgestrel: mechanism of action. *Obstet Gynecol* 2002;100:65-71.
- Durand M, del Carmen Cravotto M, Raymond EG, et al. On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception* 2001;64: 227-34.
- Ortiz ME, Ortiz RE, Fuentes MA, Parraguez VH, Croxatto HB. Post-coital administration of levonorgestrel does not interfere with post-fertilization events in the new-world monkey *Cebus apella*. *Hum Reprod* 2004;19:1352-6.
- Croxatto HB, Brache V, Ravez M, et al. Pituitary-ovarian function following the standard levonorgestrel emergency contraceptive dose or a single 0.75mg dose given on the days preceding ovulation. *Contraception* 2004;70:442-50.
- Kessner E, Larriaga A, Parada J. Postcoital contraception with D-norgestrel. *Contraception* 1973;7:367-79.
- Munuce MJ, Nascimento JAA, Rosano G, Faundes A, Bahamondes L. Dose of levonorgestrel comparable that delivered by the levonorgestrel-releasing intrauterine system can modify the in vitro expression of zona binding sites of human spermatozoa. *Contraception* 2006;73:97-101.
- Harper CC, Cheong M, Rocca CH, Darney PB, Raine TR. The effect of increased access to emergency contraception among young adolescents. *Obstet Gynecol* 2005;106:483-91.
- Walker DM, Torres P, Gutierrez JP, Flemming K, Bertozzi SM. Emergency contraception use is correlated with increased condom use among adolescents: results from Mexico. *J Adolesc Health* 2004;35:329-34.
- Polis C, Schaffer K, Blanchard K, Glasier A, Harper C, Grimes D. Advance provision of emergency contraception for pregnancy prevention. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Apr 18; 2: CD005497.
- Devoto I, Espinoza A, Muñoz A, Fuentes A, von Hertzen H. Pharmacokinetics of a single oral dose of 1.5-mg levonorgestrel when administered as 750-mug tablets or as 30-microg minipills. *Fertil Steril*. 2007 Oct;88(4):976-7. Epub 2007 May 4.
- Cheng L, Gülmезoglu AM, Flaggio G, Ezcurra E, Van Look PF. Interventions for emergency contraception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Apr 16; (2):CD001324.
- Comparison of three single doses of mifepristone as emergency contraception: a randomised trial. Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. *Lancet* 1999 Feb 27; 353 (9154):697-702.
- Jin J, Westley E, Fraser IS. Comparison of three single doses of mifepristone as emergency contraception: a randomised controlled trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2005 Dec;45(6):489-94.
- Ashok PW, Wagarakarchi PT, Flett GM, Templeton A. Mifepristone as a late post-coital contraceptive. *Hum Reprod* 2001; 16: 72-75.
- Roblero LS, Croxatto HB. Effects of RU 486 on development and implantation of rat embryos. *Mol Reprod Develop* 1991; 29: 342-46.
- Tulandi T. Medical and surgical treatments of ectopic pregnancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1994; 6: 149-52.
- 14 Pisarska MD, Carson SA, Buster JE. Ectopic pregnancy. *Lancet* 1998; 351: 1115-20.
- Stratton P, HArtog B, Hajizadeh N, Piquion J, Sutherland D, Merino M, et al. A single mid-follicular dose of CDB-2914, a new antiprogestin, inhibits folliculogenesis and endometrial differentiation in normally cycling women. *Hum Reprod* 2000; 15: 1092-9.
- Blithe DL, Nieman LK, Blye RP, Stratton P, Passaro M. Development of the selective progesterone receptor modulator CDB-2914 for clinical indications. *Steroids* 2003; 68: 1013-7.

REVIEW

Contraceptive applications of progesterone receptor modulators

Nathalie Chabbert-Buffet^{*†}, Sophie Ouzounian[‡], Axelle Pintiaux Kairis^{§†} and Philippe Bouchard^{†‡}

^{*}Obstetrics and Gynaecology Unit, Hôpital Tenon AP-HP, Paris, France, [†]EA1533 Human Reproduction Genetics and Pharmacology, UPMC Univ Paris 06, France, [‡]Endocrinology Unit, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France,

[§]Department of Obstetrics and Gynaecology, CHU Liège, Belgium, and [†]Laboratory of Tumour and Development Biology, University of Liège, Belgium

ABSTRACT

Currently developed progesterone receptor modulators (PRMs) are steroid-derived compounds with mild or potent antiprogestin activity. PRMs may exert a contraceptive activity by different mechanisms such as blockade of ovulation and endometrial desynchronization. Their potential clinical applications are manifold and are very promising in major public health areas, including emergency contraception, long term oestrogen-free contraception (administered alone, or in association with a progestin-only pill to improve bleeding patterns), endometriosis and myoma treatment. The mechanisms of their anti-ovulatory effects and of the endometrial modifications elicited during long term PRM treatment are still not fully elucidated. In future clinical applications, PRMs will be administered orally, via intrauterine systems or vaginal rings.

KEY WORDS Progestins, Progesterone receptor modulators, Contraception, Uterine bleeding, LH surge, Endometrium

INTRODUCTION

Progesterone (P) initiates and maintains pregnancy. This hormone also facilitates the LH surge, at least in murine species, transforms the proliferative endometrium into a secretory one and, together with oestradiol, maintains endometrial integrity. Subsequently, P keeps the uterus quiescent by inhibiting myometrial contractility. Progesterone receptor modulators (PRMs) antagonize all these actions. The first compound of this class, RU 486, has been described in an abstract by Philibert *et al.* in 1981, as an anti-glucocorticoid compound with anti-progestogenic activity. RU 486 was subsequently developed with

the scientific support of Professor EE Baulieu. The first clinical application of RU 486 (later renamed mifepristone) was termination of pregnancy, which has delayed the further development of this class of compounds due to the negative image of mifepristone related to abortion.

Until recently hormonal contraceptive methods either have combined an oestrogen and a progestin (as in combined oral contraceptives [COCs], containing ethinyl oestradiol [EE]), or consisted of the administration of only a progestin. COCs suppress gonadotropins by a dual blockade mechanism, at the

Correspondence: Nathalie Chabbert-Buffet, Obstetrics and Gynaecology Unit, Hôpital Tenon AP-HP, 4 rue de la Chine, F75020 Paris, France. Tel: + 33 1 56 01 60 07. Fax: + 33 1 56 01 73 17. E-mail: nathalie.chabbert-buffet@tnn.aphp.fr

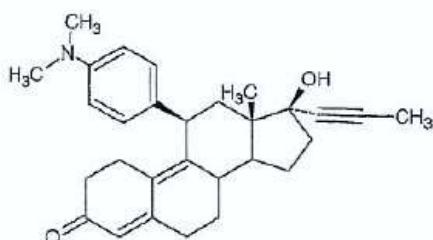
hypothalamic and pituitary level. Consequently, follicular development does not progress beyond the small antral follicle stage. Because of the vascular and metabolic side effects of EE, COCs cannot be used in women with vascular risk factors.

Progestin-only contraceptive methods are devoid of vascular and metabolic side effects because of the low dose that is delivered. Their contraceptive effect is due to suppression of the LH surge (although not observed with all compounds), endometrial desynchronization, and alteration of the cervical mucus. Progestin-only contraceptives use is associated with high discontinuation rates (up to 25% of the women¹) due to irregular bleeding. Since the prevalence of women with augmented vascular risk is expected to increase in the coming decades, the development of effective, vascular risk-free (i.e., oestrogen-free), well-tolerated contraceptive methods is crucial.

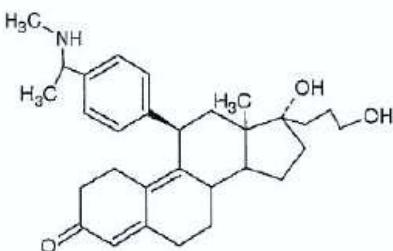
Currently developed PRMs are steroid derived compounds with a bulky radical substitution at carbon 11 (Figure 1). Interaction of these compounds with

progesterone receptors results in a specific alteration of the three-dimensional structure of the ligand binding domain of the receptor which does not allow the activation of the transcriptional machinery. This family of progesterone receptor ligands comprises molecules with mild or potent antiprogestin activity.

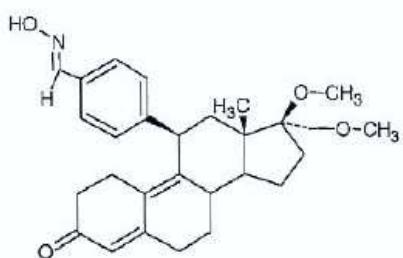
PRMs may exert a contraceptive activity by different mechanisms, including blockade of ovulation and endometrial desynchronization²; they may thus be considered as potential oestrogen-free contraceptive drugs (Figure 2). Interestingly, clinical data show that the treatment with these compounds is not associated with hypo-oestrogenism. The potential clinical applications of PRMs are very diverse and extremely promising in major public health areas (Table 1). They include emergency contraception (EC), and long term oestrogen-free contraception (whereby the PRM is administered alone, or in association with a progestin-only pill to improve bleeding patterns). In the future, PRMs will likely be administered orally, via intrauterine systems (IUS) or vaginal rings.



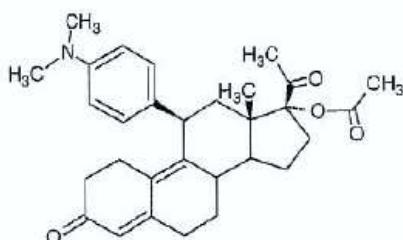
Mifepristone (RU 486)



Onapristone (ZK 98 299)



Asoprisnil (J 867)



Ulipristal (VA2914)

Figure 1 Chemical structure of some PRMs. Progesterone ligands with antagonist properties currently undergoing clinical development are steroid derivatives with the ketone function at carbon 3 and methyl radical at carbon 11 involved in ligand binding to the receptor. Substitution at carbon 17 leads to an increased bioactivity. Finally, a bulky radical at carbon 11 is responsible for the antagonistic potential

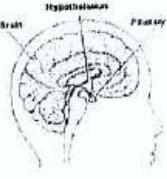
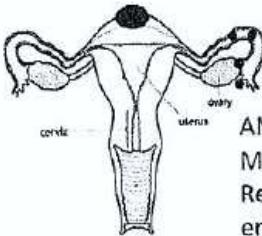
| Mechanism of action | Potential additional Advantages | Pending issues |
|--|--|-------------------------------------|
| LH surge blockade |  <p>Persistence of endogenous oestradiol secretion: OESTROGEN FREE CONTRACEPTION WITHOUT OESTRADIOL DEPLETION</p> | Mechanism(s) of LH surge blockade |
| Impaired endometrial maturation Ovarian antiovulatory effect? |  <p>AMENORRHOEA Myoma shrinkage Relief of endometriosis associated pain</p> | LONG TERM ENDOMETRIAL MODIFICATIONS |

Figure 2 Summary of the main issues in PRMs use for contraception: mechanism of action, main benefits expected from this application and pending issues

Table 1 Main PRMs undergoing clinical development

| Compound: ICD, trade name ^(*) (molecule code) (routes of administration) | Company | Trials: phase and field of application |
|---|---|---|
| Asoprisnil (J867) (oral) | TAP (USA) | Phase II-III: myomas |
| Ulipristal (CDB/VA 2914) (oral, IUS, VR) | HRA Pharma (France), NIH (USA), Praglom (Switzerland) | EC Phase II: oestrogen free contraception, myomas (oral, IUS, VR) |
| Mifepristone, Mifegyna ^(*) , (RU 486) (oral) | Exalgyn (France) | Medical abortion, EC. Phase I-III: contraception, metastatic breast cancer treatment (oral) |
| Proellex ^(*) (oral) | Repros (USA) | Phase II-III: myomas, endometriosis (oral) |
| ZK230211 (oral, IUS) | Schering (Germany) | Phase I-II: dysfunctional bleeding (IUS), breast cancer |
| OrgNN (oral) | Organon | Contraception, breast cancer |

ICD: international common denomination; EC: emergency contraception; IUS: intrauterine system, VR: vaginal ring.

EMERGENCY CONTRACEPTION

The current 'gold standard' for EC is the administration of a single dose of levonorgestrel as early as possible after the intercourse. Its efficacy is highest within the first 72 hours but, in accordance with the WHO recommendations, this option can be offered up to 120 h to women informed of the risk of failure. Levonorgestrel (LNG) delays or inhibits ovulation if administered early enough in the follicular phase. However, once fertilization has taken place, LNG can not prevent the establishment of an ongoing pregnancy. Ortiz recently showed that post-coital LNG does not interfere with post fertilization events in monkeys³. The same may not apply to PRMs, which block ovulation and affect implantation.

Antiprogestins were used for EC primarily because of the LH surge blockade they induce. The precise mechanism of this action is not fully elucidated and animal data suggest that, compared to levonorgestrel, mifepristone may exert a specific action⁴. Proof of concept studies in animals have shown that short term administration of PRMs could modulate the uterine environment and interfere with implantation and early pregnancy. Banaszak *et al.*⁵ have shown that the inhibition of progesterone action by the progesterone receptor antagonist ZK 137.316 in intact and ovariectomized baboons altered the action of human chorionic gonadotropin (hCG) on the endometrium at the time of uterine receptivity. This PRM reduced the epithelial plaque reaction, completely inhibited alpha-smooth muscle actin (alpha SMA) expression in stromal fibroblasts, and induced the reappearance of the progesterone (PR) and oestrogen (ERalpha) receptors in epithelial cells. However, short term treatment (ten days) had no effect on the expression of glycodelin in the glandular epithelium. These results indicate that blocking the action of progesterone on the endometrium even for a short period of time has a profound effect on the hCG-induced response in stromal fibroblasts. Using an *in vitro* model of human blastocyst adhesion to cultured human endometrial cells, Petersen *et al.*⁶ demonstrated that the antiprogestin Org 31710 has anti-attachment properties. The mechanism of this effect has to be determined since neither the morphology of endometrial cells (e.g., pinopodes developed normally) nor the expression of biochemical markers of implantation such as glycodelin A and Leukaemia Inhibiting Factor were modified.

Recently, Gemzell-Danielsson's team has shown that mifepristone, but not LNG, inhibits human blastocyst attachment to an *in vitro* endometrial three-dimensional cell culture model⁷. This body of evidence can be integrated in the potential use of mifepristone for EC, although some of these studies were not conducted with this initial purpose.

Several clinical trials have compared the effectiveness of mifepristone to that of other established methods of EC including danazol, LNG, an intrauterine contraceptive device and the classical Yuzpe method (ethinyl oestradiol 100 µg and LNG 500 µg, repeated after 12 h)⁸⁻¹². Different doses of mifepristone have also been compared^{13,14}. In all these studies the number of expected pregnancies has been determined by the probabilities of conception by cycle day from established conception rates^{15,16}. All methods (with the exception of danazol) achieved a marked decrease in the number of expected pregnancies. Mifepristone has the distinct advantage to be highly effective up to 120 hours after unprotected intercourse whereas, with the exception of IUDs, other methods must be applied during the initial 72 hours¹¹⁻¹⁴. Moreover, side effects such as nausea, vomiting, headache, and breast tenderness were significantly less frequent among women given mifepristone than with the other substances⁸⁻¹⁰. In one study, 19% of women taking mifepristone complained of excess bleeding as compared to 31% of the women taking LNG¹¹.

Women using PRMs for EC have more often a delay in the onset of their next menstrual period than women using other methods. This is a drawback since the onset of menses reassures the woman who has used EC on the successful prevention of pregnancy. The use of a barrier method of contraception is therefore required until the next menstruation. This delay is dose dependent; it is longer with doses of 600 and 100 mg mifepristone than with doses of 25 mg or 10 mg^{13,14}. Since the success rates are similar with all doses, the lowest dose of mifepristone is recommended. Currently, mifepristone is used for EC in China¹⁷; it will be authorized in other countries in the future. Ulipristal has also been evaluated for EC in a randomised trial comparing it with LNG¹⁸. Based on the estimated cycle day of unprotected intercourse, 85% and 69% of anticipated pregnancies, respectively, were averted in a group of 1500 women.

LONG TERM CONTRACEPTION

Mifepristone¹⁹, previously known under the denomination RU 486, was the first PRM to be used in women; it has been evaluated for contraceptive use^{11,20-23}. Low doses (2 mg/d or less) cause a delay in ovulation and/or disturb the endometrial maturation without marked effects on follicular development²⁴. When given daily in a dose of 5 mg, mifepristone displays good contraceptive efficacy although the experience reported is limited²³. Higher doses usually suppress follicular development^{20,25,26}. Finally, long term use of RU 486 has been associated with increased endometrial thickness, in part due to excessive gland development without atypia²⁷.

PRMs may act by several mechanisms including ovulation inhibition and endometrial effects. At a dose of 1 mg/day, mifepristone delays luteal-phase endometrial maturation without modification of the menstrual cycle in approximately four out of five cases⁶⁻⁸. It therefore appeared possible to dissociate the effects of treatment with such PRM drugs, which could lead to the development of a method of contraception that would act primarily on the endometrium without interfering with ovulation. However, mifepristone administered at a very low dose (0.5 mg/d or 5 mg once weekly) to women not using contraception, did not prevent pregnancy, notwithstanding a delay in endometrial maturation and in appearance of progesterone-dependent markers²⁸⁻³⁰.

The threshold daily dose of mifepristone capable of inhibiting ovulation is 2 mg and that of ulipristal 5 mg³¹. Available data on the impact of asoprisnil on ovulation show no dose response consistency³².

Daily doses of 2 to 10 mg mifepristone suppress follicular development, block the LH surge and delay ovulation^{33,34}. In a recent study no pregnancies were reported after 200 months of exposure in 50 women who received either 2 or 5 mg of mifepristone daily as their only method of contraception²². Weekly doses of 50 mg mifepristone were recently reported to be effective for long-term contraception³⁵. Higher doses of this compound can even block follicular maturation and induce follicular atresia. Mifepristone may also hinder tubal function, and eventually the ultimate steps of oocyte maturation and fertilization³⁶.

Amenorrhoea was observed in most studies. This may be seen as a benefit which is already aimed at in the extended or continuous administration of oral

contraceptives³⁷. Once informed of the expected occurrence of amenorrhoea during treatment, women may achieve a high compliance rate³⁸. However, the induction of amenorrhoea requires a high degree of endometrial safety. In the different studies reporting on hormonal profiles in women using low doses of PRMs persistent levels of oestradiol in the physiological follicular phase range have been described, resulting in a potential 'unopposed oestradiol' exposure. This effect, but also previous reports on ultrasound appearance and histological aspects of the endometrium in women receiving mifepristone²⁷ have raised the concern of its endometrial safety. A new histological classification may be needed to properly describe the aspects observed under PRM treatment. Such a modified classification has already been suggested to allow a more accurate description of endometrial hyperplasia³⁹. In a recent expert meeting on the endometrial effects of PRMs organized by the NIH^{40,41}, a panel of pathologists indicated that the current WHO classification is not suitable to describe the 'non physiological secretory aspect' observed during PRM treatment. One observes a disordered architecture with desynchronization of glandular and stromal compartments, a mixture of proliferative and secretory endometria associated with mitotic and apoptotic figures, secretory aspects, and cystic glandular dilatation. There were no signs of atypia. The observed dilated glands may account for the ultrasound findings of thickened endometrium.

Management of irregular bleeding induced by progestin-only contraceptive regimens

Mifepristone and other PRMs may be used to reduce the occurrence of bleeding irregularities induced by progestin-only contraceptive methods^{42,43}. Bleeding is indeed one of the main drawbacks of oestrogen-free contraception, and may lead to treatment discontinuation in 15 to 25% of women.

The PRM compound Org 31710, administered monthly (150 mg) to women using the desogestrel-only contraceptive pill (75 µg/day), restored a regular bleeding pattern, with a significantly lower frequency of irregular, prolonged, or frequent bleeding⁴³. Yet, the beneficial effect, which was evident at the beginning of the treatment, seemed to abate with time.

In women using progestin-releasing subdermal contraceptive implants, bleeding has been correlated

to vascular fragility, independently of oestradiol or progesterone circulating levels. In a double-blind placebo controlled study⁴⁴, women wearing a LNG-releasing contraceptive implant were treated with 50 mg mifepristone once every four weeks. Although the number of bleeding episodes tended to decrease independently of treatment in all women over the 360 days of the study, the duration of bleeding episodes decreased significantly more rapidly in the mifepristone group. Furthermore, women using mifepristone were more likely to comply with the treatment.

The precise mechanism of action of mifepristone in that context is not established; it might have a direct effect on the endometrium, less likely one on ovulation. This effect might hinder the contraceptive efficacy of progestogen-only contraception. However, no pregnancy occurred during the 300 cycles followed by Cheng *et al.* Although this limited body of evidence currently available⁴⁴ does not show a decrease in contraceptive efficacy, this point needs to be confirmed in large scale studies.

The cellular mechanism of this effect is still under evaluation. During the physiological menstrual cycle^{45,46}, progesterone withdrawal results in an up-regulation of inflammatory mediators, production of matrix metalloproteinases (MMPs), a leucocyte influx and expression of stromal vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in the upper endometrial zones. The potential mechanism(s) involved in abnormal bleeding during synthetic progestin use include⁴⁷ changes in the ratio of pro- versus anti-angiogenic factors; alterations in metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP); changes in tissue factor, a known haemostasis mediator in the endometrium; and increased endometrial leukocytes with a particular emphasis on uterine natural killer (uNK) cells. In women starting with a treatment with depot medroxyprogesterone acetate (DMPA)⁴⁸, instead of the synchronous maturation of glands and stroma seen in normal secretory endometrium, one observes confluent stromal cell decidualization with small, attenuated glands. The addition of mifepristone to DMPA causes an altered maturation of the endometrium. The glands show persistent sub-nuclear vacuoles, more characteristic of an early luteal phase, and stromal oedema, more characteristic of a mid to late luteal phase. Progesterone and oestrogen receptors and signalling pathways may be modified as well as cell proliferation as shown in DMPA users treated with

mifepristone⁴⁹. Short-term exposure to mifepristone (single dose of 25 mg) increases the expression of endometrial ERalpha and progesterone receptor isoforms A and B, and promotes cell proliferation. Prolonged exposure to mifepristone (25 mg twice a month for three months) does not alter the suppression of these receptors caused by DMPA and is associated with persisting endometrial atrophy. Endometrial apoptosis as well is down-regulated in these patients⁵⁰ in the short term while longer term administration does not result in any significant modification of apoptotic rates. Modulation of endometrial cells environment such as immune cells chemo-atraction or matrix metalloproteinase (MMP) expression has also been reported in new DMPA users treated with mifepristone⁵¹, in whom the decreased rates of breakthrough bleeding are associated with decreased MMP-1 and MMP-9 expression and fewer mast and T cells.

New routes of administration of PRMs

Administration of the PRM ZK 230 211 using an intrauterine system (IUS) has been tested in primates⁵² and in women⁵³. The effects of a ZK 230 211-releasing IUS on bleeding patterns and endometrial growth in ovariectomized, artificially cycled macaques⁵² has been compared to those of a blank device. The PRM-IUSs (but not the blank devices) induced extended, frank menstruation shortly after insertion when inserted during the late luteal phase, indicating a local anti-progestin action. Oestradiol dependent endometrial proliferation was inhibited and progesterone withdrawal bleeding prevented over time during subsequent cycles.

IUSs releasing either ZK 230 211 at a rate 1, 4 or 8 µg/24 h (ZK-IUS) or LNG (at 20 µg/24 h, LNG-IUS) have been inserted four to eight weeks before hysterectomy in women complaining of menorrhagia or dysmenorrhoea⁵³. Bleeding and spotting were unchanged by the use of ZK-IUSs but increased in women wearing an LNG-IUS. The endometrium was partly atrophic in 9–30% of women following the use of ZK-IUSs as compared to 67% after LNG-IUS. Expression of proliferation markers was low following the use of both IUSs.

Studies on the VA 2914 releasing IUS are currently being conducted in monkeys. Preliminary data have shown amenorrhoea in all treated animals (unpublished data collected at the Population council website).

Data from studies conducted in the Population Council laboratories indicate that the potent progesterone receptor modulator VA 2914 (also called CDB-2914) can cross the vaginal mucosa in rabbits. VA 2914 is being investigated for its potential as a continuous, bleed-free contraceptive for women when delivered through a sustained-release system such as a vaginal ring⁵⁴. Thirty nine women were enrolled in a study evaluating the effects of a three months treatment with the CDB-2914 ring on pharmacokinetics, inhibition of ovulation, and bleeding patterns. Preliminary findings indicate that the ring had an effect on ovulation. Subjects were judged to have fairly regular bleeding patterns, though some had long cycles with fewer bleeding and spotting episodes (unpublished data collected at the Population Council website).

CONCLUSION

PRMs are an original class of compounds with potential clinical applications in gynaecology that

could significantly improve women's quality of life. They may represent a new class of oestrogen-free contraceptives not causing a drop in endogenous oestradiol levels. In addition, PRMs induce amenorrhoea, a significant advantage compared to progestin-only pills. Finally, in addition to their potential contraceptive efficacy, these compounds could be used to control bleeding due to myomas or progestin-only treatment, myoma growth, and endometriosis associated pain. To allow the further development of the long term use of PRMs, more data on the specific endometrial changes induced by PRMs are required. Parenteral routes of administration by means of IUSs or vaginal rings are currently being evaluated.

Conflict of interest Dr Chabbert-Buffet has previously been an investigator in clinical trials conducted by Organon and HRA Pharma, which assessed bleeding control and anti-ovulatory effects of PRMs.

REFERENCES

- Kovacs G. Progestogen-only pills and bleeding disturbances. *Hum Reprod* 1996;11(Suppl. 2):20-3.
- Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P, Spitz IM. Selective progesterone receptor modulators and progestrone antagonists: Mechanisms of action and clinical applications. *Hum Reprod Update* 2005;11:293-307.
- Ortiz ME, Ortiz RE, Fuentes MA, et al. Post-coital administration of levonorgestrel does not interfere with post-fertilization events in the new-world monkey *Cebus apella*. *Hum Reprod* 2004;19:1352-6.
- Heikinheimo O, Williams RF, Hodgen GD. Inhibition of ovulation by progestin analogs (agonists vs antagonists): Preliminary evidence for different sites and mechanisms of actions. *Contraception* 1996;53:55-64.
- Banaszak S, Brudney A, Donnelly K, et al. Modulation of the action of chorionic gonadotropin in the baboon (*Papio anubis*) uterus by a progesterone receptor antagonist (ZK 137, 316). *Biol Reprod* 2000;63:820-5.
- Petersen A, Bentin-Ley U, Ravn V, et al. The antiprogestrone Org 31710 inhibits human blastocyst-endometrial interactions in vitro. *Fertil Steril* 2005;83(Suppl. 1):1255-63.
- Lalitkumar PGL, Lalitkumar S, Meng CX, et al. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model. *Hum Reprod* 2007;22:3031-7.
- Glasier A, Thong KJ, Dewar M, et al. Mifepristone (RU 486) compared with high-dose estrogen and progestogen for emergency postcoital contraception. *N Engl J Med* 1992;327:1041-4.
- Webb AM, Russell J, Elstein M. Comparison of Yuzpe regimen, danazol, and mifepristone (RU486) in oral postcoital contraception. *BMJ* 1992;305:927-31.
- Ashok PW, Stalder C, Wagaarachchi PT, et al. A randomised study comparing a low dose of mifepristone and the Yuzpe regimen for emergency contraception. *BJOG* 2002;109:553-60.
- von Hertzen H, Piaggio G, Ding J, et al. Low dose mifepristone and two regimens of levonorgestrel for emergency contraception: A WHO multicentre randomised trial. *Lancet* 2002;360:1803-10.
- Ashok PW, Wagaarachchi PT, Flett GM, Templeton A. Mifepristone as a late post-coital contraceptive. *Hum Reprod* 2001;16:72-5.

13. World Health Organization Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. Comparison of three single doses of mifepristone as emergency contraception: A randomised trial. *Lancet* 1999;353:697–702.
14. Xiao BL, von Hertzen H, Zhao H, Piaggio G. A randomized double-blind comparison of two single doses of mifepristone for emergency contraception. *Hum Reprod* 2002;17:3084–9.
15. Trussell J, Rodriguez G, Ellertson C. New estimates of the effectiveness of the Yuzpe regimen of emergency contraception. *Contraception* 1998;57:363–9.
16. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. *N Engl J Med* 1995;333:1517–21.
17. Psychoyos A, Nikas G, Saranitis L, Gravanis A. Hormone anti-implantation agents: antiprogestins. *Hum Reprod* 1995;10(Suppl. 1):140–50.
18. Creinin MD, Schlaff W, Archer DF, et al. Progesterone receptor modulator for emergency contraception: A randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 2006;108:1089–97.
19. Philibert D, Deraedt R, Teutsch G. RU 38486: A potent antiglucocorticoid in vivo. The VII International Congress of Pharmacology. Tokyo, Japan, 1981.
20. Baird DT, Brown A, Cheng L, et al. Mifepristone: a novel estrogen-free daily contraceptive pill. *Steroids* 2003;68:1099–105.
21. Baird DT, Brown A, Critchley HO, et al. Effect of long-term treatment with low-dose mifepristone on the endometrium. *Hum Reprod* 2003;18:61–8.
22. Brown A, Cheng L, Lin S, Baird DT. Daily low-dose mifepristone has contraceptive potential by suppressing ovulation and menstruation: A double-blind randomized control trial of 2 and 5 mg per day for 120 days. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:63–70.
23. Lakha F, Ho PC, Van der Spuy ZM, et al. A novel estrogen-free oral contraceptive pill for women: multicentre, double-blind, randomized controlled trial of mifepristone and progestogen-only pill (levonorgestrel). *Hum Reprod* 2007;22:2428–36.
24. Cameron ST, Glasier AF, Logan J, et al. Impact of the introduction of new medical methods on therapeutic abortions at the Royal Infirmary of Edinburgh. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:1222–9.
25. Batista MC, Cartledge TP, Zellmer AW, et al. Delayed endometrial maturation induced by daily administration of the antiprogestin RU 486: A potential new contraceptive strategy. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:60–5.
26. Liu JH, Garzo G, Morris S, et al. Disruption of follicular maturation and delay of ovulation after administration of the antiprogestrone RU486. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1135–40.
27. Steinauer J, Pritts EA, Jackson IR, Jacoby AF. Systematic review of mifepristone for the treatment of uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 2004;103:1331–6.
28. Bygdeman M, Gemzell Danielsson K, Marions L, Swahn ML. Contraceptive use of antiprogestin. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 1999;4:103–7.
29. Marions L, Gemzell Danielsson K, Swahn ML, Bygdeman M. Contraceptive efficacy of low doses of mifepristone. *Fertil Steril* 1998;70:813–6.
30. Marions L, Viski S, Gemzell-Danielsson K, et al. Contraceptive efficacy of daily administration of 0.5 mg mifepristone. *Hum Reprod* 1999;14:2788–90.
31. Chabbert-Buffet N, Pintiaux-Kairis A, Bouchard P. Effects of the progesterone receptor modulator VA2914 in a continuous low dose on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and endometrium in normal women: A prospective, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3582–9.
32. Chwalisz K, Elger W, Stickler T, et al. The effects of 1-month administration of asoprisnil (J867), a selective progesterone receptor modulator, in healthy premenopausal women. *Hum Reprod* 2005;20:1090–9.
33. Croxatto HB, Salvatierra AM, Croxatto HD, Fuentealba B. Effects of continuous treatment with low dose mifepristone throughout one menstrual cycle. *Hum Reprod* 1993;8:201–7.
34. Cameron ST, Critchley HO, Thong KJ, et al. Effects of daily low dose mifepristone on endometrial maturation and proliferation. *Hum Reprod* 1996;11:2518–26.
35. Pei K, Xiao B, Jing X, et al. Weekly contraception with mifepristone. *Contraception* 2007;75:40–4.
36. Gemzell-Danielsson K, Mandl I, Marions L. Mechanisms of action of mifepristone when used for emergency contraception. *Contraception* 2003;68:471–6.
37. Plourde DM, Rayburn WF. New contraceptive methods. *J Reprod Med* 2003;48:665–71.
38. Glasier AF, Smith KB, van der Spuy ZM, et al. Amenorrhoea associated with contraception – An international study on acceptability. *Contraception* 2003;67:1–8.
39. Bergeron C, Nogales FF, Masseroli M, et al. A multicentric European study testing the reproducibility of the WHO classification of endometrial hyperplasia with a proposal of a simplified working classification for biopsy and curettage specimens. *Am J Surg Pathol* 1999;23:1102–8.
40. Horne FM, Blithe DL. Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences. *Hum Reprod Update* 2007;13:567–80.
41. Mutter GL, Bergeron C, Deligdisch L, et al. The spectrum of endometrial pathology induced by progesterone receptor modulators. *Mod Pathol* 2008;21:591–8.

42. Spitz IM, Van Look PF, Coelingh Bennink HJ. The use of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in contraception. *Steroids* 2000;65:817-23.
43. Genzell Danielsson K, van Heusden AM, Killick SR, et al. Improving cycle control in progestogen-only contraceptive pill users by intermittent treatment with a new anti-progestogen. *Hum Reprod* 2002;17:2588-93.
44. Cheng L, Zhu H, Wang A, et al. Once a month administration of mifepristone improves bleeding patterns in women using subdermal contraceptive implants releasing levonorgestrel. *Hum Reprod* 2000;15:1969-72.
45. Critchley HOD, Kelly RW, Brenner RM, Baird DT. The endocrinology of menstruation - a role for the immune system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001;55:701-10.
46. The ESHRE Capri Workshop Group. Endometrial bleeding. *Hum Reprod* 2007;13:421-31.
47. Archer DF. Endometrial bleeding during hormone therapy: The effect of progestogens. *Maturitas* 2007;57: 71-6.
48. Jain JK, Nicosia AF, Nucatola DL, et al. Mifepristone for the prevention of breakthrough bleeding in new starters of depo-medroxyprogesterone acetate. *Steroids* 2003;68: 1115-9.
49. Jain JK, Li A, Yang W, et al. Mifepristone alters expression of endometrial steroid receptors and their cofactors in new users of medroxyprogesterone acetate. *Fertil Steril* 2007;87:8-23.
50. Jain JK, Li A, Yang W, et al. Effects of mifepristone on proliferation and apoptosis of human endometrium in new users of medroxyprogesterone acetate. *Hum Reprod* 2006;21:798-809.
51. Li A, Felix JC, Yang W, et al. Effect of mifepristone on endometrial matrix metalloproteinase expression and leukocyte abundance in new medroxyprogesterone acetate users. *Contraception* 2007;76:57-65.
52. Nayak NR, Slayden OD, Mah K, et al. Antiprogestin-releasing intrauterine devices: a novel approach to endometrial contraception. *Contraception* 2007;75: S104-11.
53. Heikinheimo O, Vani S, Carpen O, et al. Intrauterine release of progesterone antagonist ZK230211 is feasible and results in novel endometrial effects: A pilot study. *Hum Reprod* 2007;22:2515-22.
54. Sitruk-Ware R. Delivery options for contraception. *Drug Discov Today* 2005;10:977-85.

G. REFERENCES

Reference List

- 1995 Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception
1. *Lancet* **346** 1582-1588.
- 1996 Effects of hormone replacement therapy on endometrial histology in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial
4. *JAMA* **275** 370-375.
- 1997 Acute myocardial infarction and combined oral contraceptives: results of an international multicentre case-control study. WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. *Lancet* **349** 1202-1209.
- Abberton KM, Healy DL & Rogers PA 1999 Smooth muscle alpha actin and myosin heavy chain expression in the vascular smooth muscle cells surrounding human endometrial arterioles
1. *Hum.Reprod.* **14** 3095-3100.
- Adams RH & Klein R 2000 Eph receptors and ephrin ligands. essential mediators of vascular development
1. *Trends Cardiovasc.Med.* **10** 183-188.
- Ahmed A, Li XF, Shams M, Gregory J, Rollason T, Barnes NM & Newton JR 1995 Localization of the angiotensin II and its receptor subtype expression in human endometrium and identification of a novel high-affinity angiotensin II binding site
2. *J.Clin.Invest* **96** 848-857.
- Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA & Reel JR 2004 In vitro antiprogestational/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **88** 277-288.
- Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR & Blye RP 2002 CDB-4124 and its putative monodemethylated metabolite, CDB-4453, are potent antiprogestins with reduced antiglucocorticoid activity: in vitro comparison to mifepristone and CDB-2914. *Mol.Cell Endocrinol.* **188** 111-123.
- Baird DT, Brown A, Cheng L, Critchley HO, Lin S, Narvekar N & Williams AR 2003a Mifepristone: a novel estrogen-free daily contraceptive pill
2. *Steroids* **68** 1099-1105.

Baird DT, Brown A, Critchley HO, Williams AR, Lin S & Cheng L 2003b Effect of long-term treatment with low-dose mifepristone on the endometrium. *Hum.Reprod.* **18** 61-68.

Balasubramanian B, Portillo W, Reyna A, Chen JZ, Moore AN, Dash PK & Mani SK 2008a Nonclassical mechanisms of progesterone action in the brain: I. Protein kinase C activation in the hypothalamus of female rats. *Endocrinology* **149** 5509-5517.

Balasubramanian B, Portillo W, Reyna A, Chen JZ, Moore AN, Dash PK & Mani SK 2008b Nonclassical mechanisms of progesterone action in the brain: II. Role of calmodulin-dependent protein kinase II in progesterone-mediated signaling in the hypothalamus of female rats. *Endocrinology* **149** 5518-5526.

Batista MC, Cartledge TP, Zellmer AW, Merino MJ, Axiotis C, Loriaux DL & Nieman LK 1992 Delayed endometrial maturation induced by daily administration of the antiprogestin RU 486: a potential new contraceptive strategy
1. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **167** 60-65.

Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK & Edwards DP 1993 The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 4441-4445.

Belsey EM, Machin D & d'Arcangues C 1986 The analysis of vaginal bleeding patterns induced by fertility regulating methods. World Health Organization Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction
1. *Contraception* **34** 253-260.

Benhamou B, Garcia T, Lerouge T, Vergezac A, Gofflo D, Bigogne C, Chambon P & Gronemeyer H 1992 A single amino acid that determines the sensitivity of progesterone receptors to RU486. *Science* **255** 206-209.

Beral V 2003 Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **362** 419-427.

Berndt S, Perrier DS, Blacher S, Pequeux C, Lorquet S, Munaut C, Applanat M, Herve MA, Lamande N, Corvol P, van den BF, Franken F, Poutanen M, Huhtaniemi I, Geenen V, Noel A & Foidart JM 2006 Angiogenic activity of human chorionic gonadotropin through LH receptor activation on endothelial and epithelial cells of the endometrium
1. *FASEB J.* **20** 2630-2632.

Bigsby RM & Young PC 1994 Estrogenic effects of the antiprogestin onapristone (ZK98.299) in the rodent uterus
1. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **171** 188-194.

Bikfalvi A 2006 Angiogenesis: health and disease. *Ann.Oncol.* **17 Suppl 10** x65-x70.

Bilian X 2007 Chinese experience with intrauterine devices. *Contraception* **75** S31-S34.

Bilinski MJ, Thorne JG, Oh MJ, Leonard S, Murrant C, Tayade C & Croy BA 2008 Uterine NK cells in murine pregnancy. *Reprod.Biomed.Online.* **16** 218-226.

Boonyaratankornkit V, Bi Y, Rudd M & Edwards DP 2008 The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* **73** 922-928.

Boonyaratankornkit V & Edwards DP 2004 Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem.* **40** 105-120.

Bourlev V, Volkov N, Pavlovitch S, Lets N, Larsson A & Olovsson M 2006 The relationship between microvessel density, proliferative activity and expression of vascular endothelial growth factor-A and its receptors in eutopic endometrium and endometriotic lesions. *Reproduction*. **132** 501-509.

Brenner RM & Slayden OD 2005 Progesterone receptor antagonists and the endometrial antiproliferative effect
6. *Semin.Reprod.Med.* **23** 74-81.

Brenner RM, Slayden OD & Critchley HO 2002 Anti-proliferative effects of progesterone antagonists in the primate endometrium: a potential role for the androgen receptor
1. *Reproduction*. **124** 167-172.

Brenner RM, Slayden OD, Rodgers WH, Critchley HO, Carroll R, Nie XJ & Mah K 2003 Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium
4. *Hum.Reprod.* **18** 1185-1193.

Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M & Cheresh DA 1998 Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity
2. *Cell* **92** 391-400.

Broome M & Fotherby K 1990 Clinical experience with the progestogen-only pill.
Contraception **42** 489-495.

Brosens JJ, Tullet J, Varshochi R & Lam EW 2004 Steroid receptor action.
Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol. **18** 265-283.

Bruner KL, Rodgers WH, Gold LI, Korc M, Hargrove JT, Matrisian LM & Osteen KG 1995 Transforming growth factor beta mediates the progesterone suppression of an epithelial metalloproteinase by adjacent stroma in the human endometrium
1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92** 7362-7366.

Burton KA, Henderson TA, Hillier SG, Mason JI, Habib F, Brenner RM & Critchley HO 2003 Local levonorgestrel regulation of androgen receptor and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human endometrium
1. *Hum.Reprod.* **18** 2610-2617.

Cameron ST, Glasier AF, Narvekar N, Gebbie A, Critchley HO & Baird DT 2003 Effects of onapristone on postmenopausal endometrium
4. *Steroids* **68** 1053-1059.

Carmeliet P 2000 Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis
9. *Nat.Med.* **6** 389-395.

Carmeliet P 2004 Manipulating angiogenesis in medicine
8. *J.Intern.Med.* **255** 538-561.

Casey ML, MacDonald PC & Andersson S 1994 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium. *J Clin.Invest* **94** 2135-2141.

Chabbert-Buffet, N. Effets des modulateurs sélectifs du récepteur de la progesterone dans l'endomètre humain. 21-12-2006. Université Pierre et Marie Curie- Paris 6. 2006.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Chabbert-Buffet N, Meduri G, Bouchard P & Spitz IM 2005 Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications. *Hum.Reprod.Update*. **11** 293-307.

Cheng KW, Cheng CK & Leung PC 2001 Differential role of PR-A and -B isoforms in transcription regulation of human GnRH receptor gene. *Mol.Endocrinol.* **15** 2078-2092.

Cheng L, Zhu H, Wang A, Ren F, Chen J & Glasier A 2000 Once a month administration of mifepristone improves bleeding patterns in women using subdermal contraceptive implants releasing levonorgestrel
2. *Hum.Reprod.* **15** 1969-1972.

Cheung J & Smith DF 2000 Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol.Endocrinol.* **14** 939-946.

Chi IC 1991 An evaluation of the levonorgestrel-releasing IUD: its advantages and disadvantages when compared to the copper-releasing IUDs. *Contraception* **44** 573-588.

Christian, R, Stratton, P, Merino, M. J., Segar J, Wesley, R., Barnhart, L, and Nieman LK. The selective progesterone receptor modulator CBD-2914 has estrogenic and anti-estrogenic effects in menopausal women. The Endocrine Society's 84th annual meeting, San Francisco, USA. 2002.

Ref Type: Personal Communication

Christin-Maitre S 2008 [Physiology of ovulation and mode of action of contraceptive pills]. *Rev.Prat.* **58** 17-20.

Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stumpf H & Elger W 2000 Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium
3. *Steroids* **65** 741-751.

Chwalisz K, Perez MC, Demanno D, Winkel C, Schubert G & Elger W 2005 Selective progesterone receptor modulator development and use in the treatment of leiomyomata and endometriosis. *Endocr.Rev.* **26** 423-438.

Chwalisz K, Stockemann K, Fuhrmann U, Fritzemeier KH, Einspanier A & Garfield RE 1995 Mechanism of action of antiprogestins in the pregnant uterus
1. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **761** 202-223.

Clark BJ, Wells J, King SR & Stocco DM 1994 The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)
1. *J.Biol.Chem.* **269** 28314-28322.

Clarke CL 1990 Cell-specific regulation of progesterone receptor in the female reproductive system
3. *Mol.Cell Endocrinol.* **70** C29-C33.

Clarke IJ 1995 Evidence that the switch from negative to positive feedback at the level of the pituitary gland is an important timing event for the onset of the preovulatory surge in LH in the ewe

6. *J.Endocrinol.* **145** 271-282.

Conneely OM, Mulac-Jericevic B & Lydon JP 2003 Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* **68** 771-778.

Cornet PB, Picquet C, Lemoine P, Osteen KG, Bruner-Tran KL, Tabibzadeh S, Courtoy PJ, Eeckhout Y, Marbaix E & Henriet P 2002 Regulation and function of LEFTY-A/EBAF in the human endometrium. mRNA expression during the menstrual cycle, control by progesterone, and effect on matrix metalloproteinases

1. *J.Biol.Chem.* **277** 42496-42504.

Couse JF, Curtis HS & Korach KS 2000 Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* **74** 287-296.

Couzin B, Young J, Kujas M, Meduri G, Brailly S, Thomas JL, Chanson P & Schaison G 1999 The antigenadotropic activity of a 19-nor-progesterone derivative is exerted both at the hypothalamic and pituitary levels in women. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84** 4191-4196.

Crutchley HO, Bailey DA, Au CL, Affandi B & Rogers PA 1993 Immunohistochemical sex steroid receptor distribution in endometrium from long-term subdermal levonorgestrel users and during the normal menstrual cycle

1. *Hum.Reprod.* **8** 1632-1639.

Crutchley HO, Brenner RM, Henderson TA, Williams K, Nayak NR, Slayden OD, Millar MR & Saunders PT 2001 Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium

3. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86** 1370-1378.

Crutchley HO, Henderson TA, Kelly RW, Scobie GS, Evans LR, Groome NP & Saunders PT 2002 Wild-type estrogen receptor (ERbeta1) and the splice variant (ERbetacx/beta2) are both expressed within the human endometrium throughout the normal menstrual cycle

1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87** 5265-5273.

Crutchley HO, Kelly RW, Baird DT & Brenner RM 2006 Regulation of human endometrial function: mechanisms relevant to uterine bleeding

1. *Reprod.Biol.Endocrinol.* **4 Suppl 1** S5.

Critchley HO, Wang H, Kelly RW, Gebbie AE & Glasier AF 1998 Progestin receptor isoforms and prostaglandin dehydrogenase in the endometrium of women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system
1. *Hum.Reprod.* **13** 1210-1217.

Cromer BA, Smith RD, Blair JM, Dwyer J & Brown RT 1994 A prospective study of adolescents who choose among levonorgestrel implant (Norplant), medroxyprogesterone acetate (Depo-Provera), or the combined oral contraceptive pill as contraception. *Pediatrics* **94** 687-694.

Crowder ME & Nett TM 1984 Pituitary content of gonadotropins and receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic content of GnRH during the periovulatory period of the ewe. *Endocrinology* **114** 234-239.

Croxatto HB, Kovacs L, Massai R, Resch BA, Fuentealba B, Salvatierra AM, Croxatto HD, Zalanyi S, Viski S & Krenacs L 1998 Effects of long-term low-dose mifepristone on reproductive function in women
2. *Hum.Reprod.* **13** 793-798.

Croxatto HB, Salvatierra AM, Croxatto HD & Fuentealba B 1993 Effects of continuous treatment with low dose mifepristone throughout one menstrual cycle
7. *Hum.Reprod.* **8** 201-207.

Demanno D, Elger W, Garg R, Lee R, Schneider B, Hess-Stumpp H, Schubert G & Chwalisz K 2003 Asoprisnil (J867): a selective progesterone receptor modulator for gynecological therapy. *Steroids* **68** 1019-1032.

DeMarzo AM, Onate SA, Nordeen SK & Edwards DP 1992 Effects of the steroid antagonist RU486 on dimerization of the human progesterone receptor. *Biochemistry* **31** 10491-10501.

Di Carlo C, Bonifacio M, Tommaselli GA, Bifulco G, Guerra G & Nappi C 2008 Metalloproteinases, vascular endothelial growth factor, and angiopoietin 1 and 2 in eutopic and ectopic endometrium. *Fertil.Steril.*

Diaz S, Pavez M, Moo-Young AJ, Bardin CW & Croxatto HB 1991 Clinical trial with 3-keto-desogestrel subdermal implants. *Contraception* **44** 393-408.

Dibbs KI, Sadovsky Y, Li XJ, Koide SS, Adler S & Fuchs AR 1995 Estrogenic activity of RU 486 (mifepristone) in rat uterus and cultured uterine myocytes
2. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **173** 134-140.

Donath J, Michna H & Nishino Y 1997 The antiovulatory effect of the antiprogestin onapristone could be related to down-regulation of intraovarian progesterone (receptors)
1. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **62** 107-118.

Dong Y, Roberge JY, Wang Z, Wang X, Tamasi J, Dell V, Golla R, Corte JR, Liu Y, Fang T, Anthony MN, Schnur DM, Agler ML, Dickson JK, Jr., Lawrence RM, Prack MM, Seethala R & Feyen JH 2004 Characterization of a new class of selective nonsteroidal progesterone receptor agonists
1. *Steroids* **69** 201-217.

Drummond AE 2006 The role of steroids in follicular growth. *Reprod.Biol.Endocrinol.* **4** 16.

Dungan HM, Gottsch ML, Zeng H, Gragerov A, Bergmann JE, Vassilatis DK, Clifton DK & Steiner RA 2007 The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci.* **27** 12088-12095.

Duval DL, Nelson SE & Clay CM 1997 The tripartite basal enhancer of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene promoter regulates cell-specific expression through a novel GnRH receptor activating sequence. *Mol.Endocrinol.* **11** 1814-1821.

Edgren RA & Stanczyk FZ 1999 Nomenclature of the gonane progestins. *Contraception* **60** 313.

Edwards DP, Leonhardt SA & Gass-Handel E 2000 Novel mechanisms of progesterone antagonists and progesterone receptor. *J.Soc.Gynecol.Investig.* **7** S22-S24.

Eisinger SH, Meldrum S, Fiscella K, le Roux HD & Guzick DS 2003 Low-dose mifepristone for uterine leiomyomata
1. *Obstet.Gynecol.* **101** 243-250.

Elger W, Bartley J, Schneider B, Kaufmann G, Schubert G & Chwalisz K 2000 Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity. *Steroids* **65** 713-723.

Erkkola R & Landgren BM 2005 Role of progestins in contraception
1. *Acta Obstet.Gynecol.Scand.* **84** 207-216.

Evans RM 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240** 889-895.

Farmer RD & Lawrenson R 1996 Utilization patterns of oral contraceptives in UK general practice
1. *Contraception* **53** 211-215.

Ferenczy A 2003 Pathophysiology of endometrial bleeding
9. *Maturitas* **45** 1-14.

Ferenczy A, Gelfand MM & Tzipris F 1983 The cytodynamics of endometrial hyperplasia and carcinoma. A review
1. *Ann.Pathol.* **3** 189-201.

Fleisch MC, Chou YC, Cardiff RD, Asaithambi A & Shyamala G 2009 Overexpression of progesterone receptor A isoform in mice leads to endometrial hyperproliferation, hyperplasia and atypia
1. *Mol.Hum.Reprod.* **15** 241-249.

Fujimoto J, Hirose R, Sakaguchi H & Tamaya T 1999 Expression of oestrogen receptor-alpha and -beta in ovarian endometrioma
8. *Mol.Hum.Reprod.* **5** 742-747.

Gaide Chevronnay HP, Cornet PB, Delvaux D, Lemoine P, Courtoy PJ, Henriet P & Marbaix E 2008 Opposite regulation of transforming growth factors-beta2 and -beta3 expression in the human endometrium
1. *Endocrinology* **149** 1015-1025.

Gainer EE & Ulmann A 2003 Pharmacologic properties of CDB(VA)-2914. *Steroids* **68** 1005-1011.

Galant C, Berliere M, Dubois D, Verougstraete JC, Charles A, Lemoine P, Kokorine I, Eeckhout Y, Courtoy PJ & Marbaix E 2004 Focal expression and final activity of matrix metalloproteinases may explain irregular dysfunctional endometrial bleeding
3. *Am.J.Pathol.* **165** 83-94.

Galant C, Vekemans M, Lemoine P, Kokorine I, Twagirayezu P, Henriet P, Picquet C, Rigot V, Eeckhout Y, Courtoy PJ & Marbaix E 2000 Temporal and spatial association of matrix metalloproteinases with focal endometrial breakdown and bleeding upon progestin-only contraception

1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85** 4827-4834.

Gao F, Xu FH, Zhou XC, Han XB & Liu YX 2001 Mifepristone regulates expression of apoptosis related genes Fas and FasL in mouse endometrium
1. *Acta Pharmacol.Sin.* **22** 524-529.

Garcia E, Bouchard P, De Brux J, Berdah J, Frydman R, Schaison G, Milgrom E & Perrot-Applanat M 1988 Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating

3. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **67** 80-87.

Gardner JM & Mishell DR, Jr. 1970 Analysis of bleeding patterns and resumption of fertility following discontinuation of a long acting injectable contraceptive. *Fertil.Steril.* **21** 286-291.

Garrido-Gracia JC, Gordon A, Aguilar R, Monterde JG, Blanco A, Martin de Las MJ & Sanchez-Criado JE 2008 Morphological effects of oestradiol-17beta, and selective oestrogen receptor alpha and beta agonists on luteinising hormone-secreting cells in tamoxifen-treated ovariectomised rats

2. *Histol.Histopathol.* **23** 1453-1463.

Gevers Leuven JA, Dersjant-Roorda MC, Helmerhorst FM, de Boer R, Neymeyer-Leloux A & Havekes L 1990 Estrogenic effect of gestodene- or desogestrel-containing oral contraceptives on lipoprotein metabolism. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **163** 358-362.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA & Chin WW 1990 Molecular biology of the pituitary gonadotropins

4. *Endocr.Rev.* **11** 177-199.

Giangrande PH & McDonnell DP 1999 The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog.Horm.Res.* **54** 291-313.

Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S & Druzin M 1997 Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia

4. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **176** 751-757.

Goffin F, Munaut C, Franken F, Perrier DS, Beliard A, Fridman V, Nervo P, Colige A & Foidart JM 2003 Expression pattern of metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix-metalloproteinases in cycling human endometrium
1. *Biol.Reprod.* **69** 976-984.

Gordon H & Sweets Jr HH 1936 A simple method for the silver impregnation of reticulum.
Am.J.Pathol. **12** 545-551.

Gräfenberg E 1930 *The Practice of Contraception: Proceedings of the 7th International Birth Control Conference.*

Graham JD & Clarke CL 1997 Physiological action of progesterone in target tissues
2. *Endocr.Rev.* **18** 502-519.

Graham JD & Clarke CL 2002 Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells
1. *Breast Cancer Res.* **4** 187-190.

Graham S & Fraser IS 1982 The progestogen-only mini-pill. *Contraception* **26** 373-388.

Grazzini E, Guillou G, Mouillac B & Zingg HH 1998 Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* **392** 509-512.

Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Perrot-Applanat M & Milgrom E 1994 Cytoplasmic-nuclear trafficking of progesterone receptor. In vivo study of the mechanism of action of antiprogestins. *Biochem.Pharmacol.* **47** 21-24.

Hanahan D 1997 Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* **277** 48-50.

Hannaford PC, Croft PR & Kay CR 1994 Oral contraception and stroke. Evidence from the Royal College of General Practitioners' Oral Contraception Study. *Stroke* **25** 935-942.

Heikinheimo O, Gordon K, Lahteenmaki P, Williams RF & Hodgen GD 1995 Antiovulatory actions of RU 486: the pituitary is not the primary site of action in vivo.
J.Clin.Endocrinol.Metab **80** 1859-1868.

Heikinheimo O, Gordon K, Williams RF & Hodgen GD 1996 Inhibition of ovulation by progestin analogs (agonists vs antagonists): preliminary evidence for different sites and mechanisms of actions
5. *Contraception* **53** 55-64.

Heikinheimo O, Leminen R & Raivio T 2005 Mifepristone may inhibit the midcycle gonadotropin surge at both ovarian and pituitary sites of action
1. *Fertil.Steril.* **84** 1545-1546.

Helmrich SP, Rosenberg L, Kaufman DW, Strom B & Shapiro S 1987 Venous thromboembolism in relation to oral contraceptive use. *Obstet.Gynecol.* **69** 91-95.

Henderson TA, Saunders PT, Moffett-King A, Groome NP & Critchley HO 2003 Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J Clin.Endocrinol.Metab* **88** 440-449.

Henriet P, Cornet PB, Lemoine P, Galant C, Singer CF, Courtoy PJ, Eeckhout Y & Marbaix E 2002 Circulating ovarian steroids and endometrial matrix metalloproteinases (MMPs)
2. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **955** 119-138.

Hewett P, Nijjar S, Shams M, Morgan S, Gupta J & Ahmed A 2002 Down-regulation of angiopoietin-1 expression in menorrhagia
35. *Am.J.Pathol.* **160** 773-780.

Hickey M, Dwarte D & Fraser IS 2000 Superficial endometrial vascular fragility in Norplant users and in women with ovulatory dysfunctional uterine bleeding
5. *Hum.Reprod.* **15** 1509-1514.

Hickey M, Simbar M, Markham R, Young L, Manconi F, Russell P & Fraser IS 1999a Changes in vascular basement membrane in the endometrium of Norplant users
2. *Hum.Reprod.* **14** 716-721.

Hickey M, Simbar M, Young L, Markham R, Russell P & Fraser IS 1999b A longitudinal study of changes in endometrial microvascular density in Norplant implant users
1. *Contraception* **59** 123-129.

Higuchi T, Kanzaki H, Nakayama H, Fujimoto M, Hatayama H, Kojima K, Iwai M, Mori T & Fujita J 1995 Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells
1. *Endocrinology* **136** 4973-4981.

Hild SA, Reel JR, Hoffman LH & Blye RP 2000 CDB-2914: anti-progestational/anti-glucocorticoid profile and post-coital anti-fertility activity in rats and rabbits. *Hum.Reprod.* **15** 822-829.

Hirst JJ, West NB, Brenner RM & Novy MJ 1992 Steroid hormone receptors in the adrenal glands of fetal and adult rhesus monkeys. *J Clin.Endocrinol.Metab* **75** 308-314.

Horne FM & Blithe DL 2007 Progesterone receptor modulators and the endometrium: changes and consequences
1. *Hum.Reprod.Update.* **13** 567-580.

Ioffe OB, Zaino RJ & Mutter GL 2009 Endometrial changes from short-term therapy with CDB-4124, a selective progesterone receptor modulator
1. *Mod.Pathol.* **22** 450-459.

Iruela-Arispe ML, Porter P, Bornstein P & Sage EH 1996 Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium
1. *J.Clin.Invest* **97** 403-412.

Iruela-Arispe ML, Rodriguez-Manzaneque JC & Abu-Jawdeh G 1999 Endometrial endothelial cells express estrogen and progesterone receptors and exhibit a tissue specific response to angiogenic growth factors
1. *Microcirculation.* **6** 127-140.

Jacobsen BM, Schittone SA, Richer JK & Horwitz KB 2005 Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol.Endocrinol.* **19** 574-587.

Jamin C, Batallan A & Madelenat P 2003 [Antigonadotropic effects of a 19-nor-progesterone derivative: the example of nomegestrol acetate]. *Gynecol.Obstet.Fertil.* **31** 70-81.

Jick H, Dinan B & Rothman KJ 1978 Oral contraceptives and nonfatal myocardial infarction. *JAMA* **239** 1403-1406.

Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myers MW & Vasilakis C 1995 Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* **346** 1589-1593.

Jondet M, Letellier B & Verdys MT 2005 Endometrial vascularization in levonorgestrel intrauterine device users; computerized microvessel measurement study

1. *Contraception* **71** 60-64.

Jones RL, Salamonsen LA, Critchley HO, Rogers PA, Affandi B & Findlay JK 2000 Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only contraception
1. *Mol.Hum.Reprod.* **6** 1107-1117.

Jones RL, Stoikos C, Findlay JK & Salamonsen LA 2006 TGF-beta superfamily expression and actions in the endometrium and placenta

1. *Reproduction*. **132** 217-232.

Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS & Thomas P 2006 Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term.
Mol.Endocrinol. **20** 1519-1534.

Kasa-Vubu JZ, Dahl GE, Evans NP, Thrun LA, Moenter SM, Padmanabhan V & Karsch FJ 1992 Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* **131** 208-212.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H & Chambon P 1990 Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **9** 1603-1614.

Kloosterboer HJ & Rekers H 1990 Effects of three combined oral contraceptive preparations containing desogestrel plus ethinyl estradiol on lipid metabolism in comparison with two levonorgestrel preparations. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **163** 370-373.

Kokorine I, Marbaix E, Henriet P, Okada Y, Donnez J, Eeckhout Y & Courtoy PJ 1996 Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci.* **109 (Pt 8)** 2151-2160.

Kothapalli R, Buyuksal I, Wu SQ, Chegini N & Tabibzadeh S 1997 Detection of ebaf, a novel human gene of the transforming growth factor beta superfamily association of gene expression with endometrial bleeding
2. *J.Clin.Invest* **99** 2342-2350.

Kremer C, Breier G, Risau W & Plate KH 1997 Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system
1. *Cancer Res.* **57** 3852-3859.

Krikun G, Critchley H, Schatz F, Wan L, Caze R, Baergen RN & Lockwood CJ 2002
Abnormal uterine bleeding during progestin-only contraception may result from free radical-induced alterations in angiopoietin expression
1. *Am.J.Pathol.* **161** 979-986.

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S & Gustafsson JA 1996 Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary
1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93** 5925-5930.

Labied S, Galant C, Nisolle M, Ravet S, Munaut C, Marbaix E, Foidart JM & Frankenne F 2009 Differential elevation of matrix metalloproteinase expression in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time
1. *Hum.Reprod.* **24** 113-121.

Lawler J 2002 Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol.Med.* **6** 1-12.

Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP & Koteliansky VE 1993 Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue
6. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90** 999-1003.

Lebovic DI, Shifren JL, Ryan IP, Mueller MD, Korn AP, Darney PD & Taylor RN 2000 Ovarian steroid and cytokine modulation of human endometrial angiogenesis
1. *Hum.Reprod.* **15 Suppl 3** 67-77.

LeCouter J & Ferrara N 2002 EG-VEGF and the concept of tissue-specific angiogenic growth factors
2. *Semin.Cell Dev.Biol.* **13** 3-8.

Ledger WL, Sweeting VM, Hillier H & Baird DT 1992 Inhibition of ovulation by low-dose mifepristone (RU 486)
4. *Hum.Reprod.* **7** 945-950.

Lee KF, Lee YL, Chan RW, Cheong AW, Ng EH, Ho PC & Yeung WS 2009 Up-regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor but not vascular endothelial growth factor in human ectopic endometriotic tissue. *Fertil.Steril.*

Leonhardt SA, Boonyaratankornkit V & Edwards DP 2003 Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms. *Steroids* **68** 761-770.

Leonhardt SA & Edwards DP 2002 Mechanism of action of progesterone antagonists
3. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* **227** 969-980.

Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL & McCarty KS, Jr. 1988 Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle
1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **67** 334-340.

Lethaby AE, Cooke I & Rees M 2000 Progesterone/progestogen releasing intrauterine systems versus either placebo or any other medication for heavy menstrual bleeding. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD002126.

Levens ED, Potlog-Nahari C, Armstrong AY, Wesley R, Premkumar A, Blithe DL, Blocker W & Nieman LK 2008 CDB-2914 for uterine leiomyomata treatment: a randomized controlled trial
8. *Obstet.Gynecol.* **111** 1129-1136.

Lewis MA, Heinemann LA, Spitzer WO, MacRae KD & Bruppacher R 1997 The use of oral contraceptives and the occurrence of acute myocardial infarction in young women. Results from the Transnational Study on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *Contraception* **56** 129-140.

Leyendecker G, Wardlaw S & Nocke W 1972 Experimental studies on the endocrine regulations during the periovulatory phase of the human menstrual cycle. The effects of exogenous 17 -oestradiol and progesterone on the release of pituitary luteinizing and follicle stimulating hormones
1. *Acta Endocrinol.(Copenh)* **71** 160-178.

Li A, Felix JC, Yang W & Jain JK 2008 Effect of mifepristone on the expression of endometrial secretory leukocyte protease inhibitor in new medroxyprogesterone acetate users
1. *Fertil.Steril.* **90** 872-875.

Li A, Felix JC, Yang W, Xiong DW, Minoo P & Jain JK 2007 Effect of mifepristone on endometrial matrix metalloproteinase expression and leukocyte abundance in new medroxyprogesterone acetate users
1. *Contraception* **76** 57-65.

Li X, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW 2003 Progesterone and glucocorticoid receptors recruit distinct coactivator complexes and promote distinct patterns of local chromatin modification. *Mol.Cell Biol.* **23** 3763-3773.

Lidegaard O 1996 [Decline in cerebral thromboembolism among younger women after introduction of low-dose oral contraceptives. A study of the incidence for the period 1980-1995]. *Ugeskr.Laeger* **158** 5933-5939.

Lidegaard O & Kreiner S 1998 Cerebral thrombosis and oral contraceptives. A case-control study. *Contraception* **57** 303-314.

Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen JD, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW 2002 Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99** 7940-7944.

Luukkainen T, Allonen H, Haukkamaa M, Lahteenmaki P, Nilsson CG & Toivonen J 1986 Five years' experience with levonorgestrel-releasing IUDs. *Contraception* **33** 139-148.

Luukkainen T & Toivonen J 1995 Levonorgestrel-releasing IUD as a method of contraception with therapeutic properties. *Contraception* **52** 269-276.

Madelanat P & Koskas M 2008 [Update on the progestin-only contraception]. *J.Gynecol.Obstet.Biol.Reprod.(Paris)* **37** 637-660.

Maentausta O, Svalander P, Danielsson KG, Bygdeman M & Vihko R 1993 The effects of an antiprogestin, mifepristone, and an antiestrogen, tamoxifen, on endometrial 17 beta-

hydroxysteroid dehydrogenase and progestin and estrogen receptors during the luteal phase of the menstrual cycle: an immunohistochemical study. *J Clin. Endocrinol. Metab* **77** 913-918.

Mailhos C, Modlich U, Lewis J, Harris A, Bicknell R & Ish-Horowicz D 2001 Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis 1. *Differentiation* **69** 135-144.

Maione TE & Sharpe RJ 1990 Development of angiogenesis inhibitors for clinical applications
1. *Trends Pharmacol. Sci.* **11** 457-461.

Mandelin E, Koistinen H, Koistinen R, Affandi B & Seppala M 1997 Levonorgestrel-releasing intrauterine device-wearing women express contraceptive glycodelin A in endometrium during midcycle: another contraceptive mechanism? *Hum. Reprod.* **12** 2671-2675.

Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, III & Weigel NL 1997 Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle
1. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **63** 195-202.

Marbaix E, Vekemans M, Galant C, Rigot V, Lemoine P, Dubois D, Picquet C, Henriet P, Twagirayezu P, Sufi S, Eeckhout Y & Courtoy PJ 2000 Circulating sex hormones and endometrial stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3) at the start of bleeding episodes in levonorgestrel-implant users
1. *Hum. Reprod.* **15 Suppl 3** 120-134.

Marions L, Danielsson KG, Swahn ML & Bygdeman M 1998 Contraceptive efficacy of low doses of mifepristone
29. *Fertil. Steril.* **70** 813-816.

Marshall JC & Griffin ML 1993 The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation
3. *Hum. Reprod.* **8 Suppl 2** 57-61.

Massai MR, Bergeron C, Martel D, de Ziegler D, Meduri G, Psychoyos A, Frydman R & Bouchard P 1993 Physiological oestradiol and progesterone replacement cycles in women with ovarian failure: a model to study endometrial maturation and sex steroid receptor regulation by exogenous hormones. *Hum. Reprod.* **8** 1828-1834.

Matsuzaki S, Fukaya T, Suzuki T, Murakami T, Sasano H & Yajima A 1999 Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle
3. *Mol. Hum. Reprod.* **5** 559-564.

McCann MF & Potter LS 1994 Progestin-only oral contraception: a comprehensive review. *Contraception* **50** S1-195.

Meduri G, Bausero P & Perrot-Applanat M 2000 Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the human endometrium: modulation during the menstrual cycle
2. *Biol. Reprod.* **62** 439-447.

Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, Gong W, Beato M & Auricchio F 1998 Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor
104. *EMBO J.* **17** 2008-2018.

Milne SA, Rakhyoot A, Drudy TA, Brechin S, Riley SC & Critchley HO 2001 Co-localization of matrix metalloproteinase-1 and mast cell tryptase in the human uterus
1. *Mol.Hum.Reprod.* **7** 559-565.

Mosselman S, Polman J & Dijkema R 1996 ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor
1. *FEBS Lett.* **392** 49-53.

Mote PA, Balleine RL, McGowan EM & Clarke CL 1999 Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle
1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84** 2963-2971.

Mote PA, Bartow S, Tran N & Clarke CL 2002 Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res.Treat.* **72** 163-172.

Moyer DL & Felix JC 1998 The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation
1. *Contraception* **57** 399-403.

Mulac-Jericevic B & Conneely OM 2004 Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction*. **128** 139-146.

Murphy AA, Kettel LM, Morales AJ, Roberts V, Parmley T & Yen SS 1995 Endometrial effects of long-term low-dose administration of RU486
3. *Fertil.Steril.* **63** 761-766.

Mustonen MV, Isomaa VV, Vaskivuo T, Tapanainen J, Poutanen MH, Stenback F, Vihko RK & Vihko PT 1998 Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression and localization in term placenta and in endometrium during the menstrual cycle. *J Clin.Endocrinol.Metab* **83** 1319-1324.

Mutter GL 2000 Histopathology of genetically defined endometrial precancers
1. *Int.J.Gynecol.Pathol.* **19** 301-309.

Mutter GL, Bergeron C, Deligdisch L, Ferenczy A, Glant M, Merino M, Williams AR & Blithe DL 2008 The spectrum of endometrial pathology induced by progesterone receptor modulators
8. *Mod.Pathol.* **21** 591-598.

Narvekar N, Cameron S, Critchley HO, Lin S, Cheng L & Baird DT 2004 Low-dose mifepristone inhibits endometrial proliferation and up-regulates androgen receptor
1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **89** 2491-2497.

Narvekar N, Critchley HO, Cheng L & Baird DT 2006 Mifepristone-induced amenorrhoea is associated with an increase in microvessel density and glucocorticoid receptor and a decrease in stromal vascular endothelial growth factor
2. *Hum.Reprod.* **21** 2312-2318.

Nayak NR, Critchley HO, Slayden OD, Menrad A, Chwalisz K, Baird DT & Brenner RM 2000 Progesterone withdrawal up-regulates vascular endothelial growth factor receptor type 2 in the superficial zone stroma of the human and macaque endometrium: potential relevance to menstruation. *J Clin.Endocrinol.Metab* **85** 3442-3452.

Nehls V, Denzer K & Drenckhahn D 1992 Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ
1. *Cell Tissue Res.* **270** 469-474.

Nehls V, Schuchardt E & Drenckhahn D 1994 The effect of fibroblasts, vascular smooth muscle cells, and pericytes on sprout formation of endothelial cells in a fibrin gel angiogenesis system
3. *Microvasc.Res.* **48** 349-363.

Nett TM, Turzillo AM, Baratta M & Rispoli LA 2002 Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone
4. *Domest.Anim Endocrinol.* **23** 33-42.

Newfield RS, Spitz IM, Isacson C & New MI 2001 Long-term mifepristone (RU486) therapy resulting in massive benign endometrial hyperplasia
1. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **54** 399-404.

Nilsson CG & Holma P 1981 Menstrual blood loss with contraceptive subdermal levonorgestrel implants. *Fertil.Steril.* **35** 304-306.

Nilsson CG, Lahteenmaki PL & Luukkainen T 1984 Ovarian function in amenorrheic and menstruating users of a levonorgestrel-releasing intrauterine device. *Fertil.Steril.* **41** 52-55.

Nisolle M & Foidart JM 2009 Levonorgestrel et Endomètre. In *L'endomètre : présent et avenir, Raymond Trévoix*, pp 163-170. Ed John Libbey. Montrouge: Eurotext.

O'Reilly G, Charnock-Jones DS, Davenport AP, Cameron IT & Smith SK 1992 Presence of messenger ribonucleic acid for endothelin-1, endothelin-2, and endothelin-3 in human endometrium and a change in the ratio of ETA and ETB receptor subtype across the menstrual cycle
1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **75** 1545-1549.

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y & Muramatsu M 1998 Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human
5. *Nucleic Acids Res.* **26** 3505-3512.

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB, Ide C, Horan TP, Arakawa T, Yoshida H, Nishikawa S, Itoh Y, Seiki M, Itohara S, Takahashi C & Noda M 2001 The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* **107** 789-800.

Oliveira-Ribeiro M, Petta CA, Angelo Andrade LA, Bahamondes L & Hidalgo MM 2004 Correlation between endometrial histology, microvascular density and calibre, matrix metalloproteinase-3 and bleeding pattern in women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system
1. *Hum.Reprod.* **19** 1778-1784.

Olsson SE, Odlind V & Johansson E 1990 Clinical results with subcutaneous implants containing 3-keto desogestrel. *Contraception* **42** 1-11.

Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW 1995 Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270** 1354-1357.

Orbo A, Arnes M, Hancke C, Vereide AB, Pettersen I & Larsen K 2008 Treatment results of endometrial hyperplasia after prospective D-score classification: a follow-up study comparing effect of LNG-IUD and oral progestins versus observation only. *Gynecol Oncol.* **111** 68-73.

Ornitz DM & Itoh N 2001 Fibroblast growth factors
10. *Genome Biol.* **2** REVIEWS3005.

Ortiz ME, Croxatto HB & Bardin CW 1996 Mechanisms of action of intrauterine devices. *Obstet.Gynecol.Surv.* **51** S42-S51.

Ota T 1934 A study on birth control with an intra-uterine instrument. *Jap J Obstet Gynecol* **17** 210.

Owens GK 1995 Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells
1. *Physiol Rev.* **75** 487-517.

Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP & Bikfalvi A 1998 Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization
2. *Blood* **91** 3289-3299.

Perrot-Applanat M, Deng M, Fernandez H, Lelaidier C, Meduri G & Bouchard P 1994 Immunohistochemical localization of estradiol and progesterone receptors in human uterus throughout pregnancy: expression in endometrial blood vessels
1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **78** 216-224.

Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Garcia E, Lorenzo F & Milgrom E 1988 Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans
2. *Endocrinology* **123** 1511-1519.

Philibert, D. RU38486:a potent antiglucocorticoid in vivo. The VII International Congress of Pharmacology, Tokyo, Japan. 1981.
Ref Type: Personal Communication

Pincus G 1965 *The control of Fertility*. New York: Academic Press.

Pintiaux A, Chabbert-Buffet N & Foidart JM 2009 Gynaecological uses of a new class of steroids: the selective progesterone receptor modulators. *Gynecol.Endocrinol.* **25** 67-73.

Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake PR, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T & Isner JM 2001 The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat.Med.* **7** 706-711.

Price RJ, Owens GK & Skalak TC 1994 Immunohistochemical identification of arteriolar development using markers of smooth muscle differentiation. Evidence that capillary arterialization proceeds from terminal arterioles
1. Circ.Res. **75** 520-527.

Reel JR, Hild-Petito S & Blye RP 1998 Antiovulatory and postcoital antifertility activity of the antiprogestin CDB-2914 when administered as single, multiple, or continuous doses to rats. *Contraception* **58** 129-136.

Rice CF, Killick SR, Dieben T & Coelingh BH 1999 A comparison of the inhibition of ovulation achieved by desogestrel 75 micrograms and levonorgestrel 30 micrograms daily. *Hum.Reprod.* **14** 982-985.

Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM & Horwitz KB 2002 Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J.Biol.Chem.* **277** 5209-5218.

Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Handelsman DJ, Pinilla L & Tena-Sempere M 2009 Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides* **30** 57-66.

Roa J, Vigo E, Castellano JM, Gaytan F, Garcia-Galiano D, Navarro VM, Aguilar E, Dijcks FA, Ederveen AG, Pinilla L, van Noort PI & Tena-Sempere M 2008 Follicle-stimulating hormone responses to kisspeptin in the female rat at the preovulatory period: modulation by estrogen and progesterone receptors. *Endocrinology* **149** 5783-5790.

Rogers PA, Au CL & Affandi B 1993 Endometrial microvascular density during the normal menstrual cycle and following exposure to long-term levonorgestrel
3. Hum.Reprod. **8** 1396-1404.

Rogers PA, Plunkett D & Affandi B 2000 Perivascular smooth muscle alpha-actin is reduced in the endometrium of women with progestin-only contraceptive breakthrough bleeding. *Hum.Reprod.* **15 Suppl 3** 78-84.

Rosenfield A, Maine D, Rochat R, Shelton J & Hatcher RA 1983 The Food and Drug Administration and medroxyprogesterone acetate. What are the issues? *JAMA* **249** 2922-2928.

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM & Ockene J 2002 Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* **288** 321-333.

Roy S, Mishell DR, Jr., Robertson DN, Krauss RM, Lacarra M & Duda MJ 1984 Long-term reversible contraception with levonorgestrel-releasing Silastic rods. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **148** 1006-1013.

Rudolph-Owen LA, Slayden OD, Matrisian LM & Brenner RM 1998 Matrix metalloproteinase expression in Macaca mulatta endometrium: evidence for zone-specific regulatory tissue gradients
1. *Biol.Reprod.* **59** 1349-1359.

Salamonsen LA & Woolley DE 1999 Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells
4. *J.Reprod.Immunol.* **44** 1-27.

Salamonsen LA, Zhang J & Brasted M 2002 Leukocyte networks and human endometrial remodelling. *J Reprod.Immunol.* **57** 95-108.

Salamonsen LA, Zhang J, Hampton A & Lathbury L 2000 Regulation of matrix metalloproteinases in human endometrium
2. *Hum.Reprod.* **15 Suppl 3** 112-119.

Sarkar NN 2002 The potential of mifepristone (RU486) as a female contraceptive drug.
Int.J.Clin.Pract. **56** 140-144.

Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS & Horwitz KB 1994 A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol.Endocrinol.* **8** 1347-1360.

Sartorius CA, Shen T & Horwitz KB 2003 Progesterone receptors A and B differentially affect the growth of estrogen-dependent human breast tumor xenografts. *Breast Cancer Res.Treat.* **79** 287-299.

Schor AM, Canfield AE, Sutton AB, Arciniegas E & Allen TD 1995 Pericyte differentiation
1. *Clin.Orthop.Relat Res.* 81-91.

Schubert G, Elger W, Kaufmann G, Schneider B, Reddersen G & Chwalisz K 2005 Discovery, chemistry, and reproductive pharmacology of asoprisnil and related 11beta-benzaldoxime substituted selective progesterone receptor modulators (SPRMs).
Semin.Reprod.Med. **23** 58-73.

Schwartz SM & Liaw L 1993 Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries
3. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **21 Suppl 1** S31-S49.

Segal SJ, Alvarez-Sanchez F, Brache V, Faundes A, Vilja P & Tuohimaa P 1991 Norplant implants: the mechanism of contraceptive action. *Fertil.Steril.* **56** 273-277.

Shapiro S, Kelly JP, Rosenberg L, Kaufman DW, Helmrich SP, Rosenshein NB, Lewis JL, Jr., Knapp RC, Stolley PD & Schottenfeld D 1985 Risk of localized and widespread endometrial cancer in relation to recent and discontinued use of conjugated estrogens
1. *N Engl.J.Med.* **313** 969-972.

Sharkey AM, Day K, McPherson A, Malik S, Licence D, Smith SK & Charnock-Jones DS 2000 Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia
3. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85** 402-409.

Shibuya M 2001 Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct.Funct.* **26** 25-35.

Shifren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB & Taylor RN 1996 Ovarian steroid regulation of vascular endothelial growth factor in the human endometrium: implications for angiogenesis during the menstrual cycle and in the pathogenesis of endometriosis
1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **81** 3112-3118.

Shoupe D, Mishell DR, Jr., Bopp BL & Fielding M 1991 The significance of bleeding patterns in Norplant implant users. *Obstet.Gynecol.* **77** 256-260.

Sitruk-Ware R 2004 Pharmacological profile of progestins. *Maturitas* **47** 277-283.

Sitruk-Ware R 2005 Pharmacology of different progestogens: the special case of drospirenone. *Climacteric*. **8 Suppl 3** 4-12.

Sivin I & Schmidt F 1987 Effectiveness of IUDs: a review. *Contraception* **36** 55-84.

Skafar DF 1993 Dimerization of the RU486-bound calf uterine progesterone receptor
25. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **44** 39-43.

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D & Gabbiani G 1986 A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation
1. *J.Cell Biol.* **103** 2787-2796.

Skinner JL, Riley SC, Gebbie AE, Glasier AF & Critchley HO 1999 Regulation of matrix metalloproteinase-9 in endometrium during the menstrual cycle and following administration of intrauterine levonorgestrel
1. *Hum.Reprod.* **14** 793-799.

Slayden OD & Brenner RM 2004 Hormonal regulation and localization of estrogen, progestin and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterone receptor antagonists
5. *Arch.Histol.Cytol.* **67** 393-409.

Slayden OD, Nayak NR, Burton KA, Chwalisz K, Cameron ST, Critchley HO, Baird DT & Brenner RM 2001 Progesterone antagonists increase androgen receptor expression in the rhesus macaque and human endometrium
2. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86** 2668-2679.

Smith SK 2001 Regulation of angiogenesis in the endometrium
10. *Trends Endocrinol.Metab* **12** 147-151.

Snijders MP, de Goeij AF, Debets-Te Baerts MJ, Rousch MJ, Koudstaal J & Bosman FT 1992 Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J Reprod.Fertil.* **94** 363-371.

Song JY & Fraser IS 1995 Effects of progestogens on human endometrium
2. *Obstet.Gynecol.Surv.* **50** 385-394.

Speroff L & DeCherney A 1993 Evaluation of a new generation of oral contraceptives. The Advisory Board for the New Progestins. *Obstet.Gynecol.* **81** 1034-1047.

Speroff L, Glass RH & Kase NG 1999 *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Spitz IM 2003 Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators: an overview. *Steroids* **68** 981-993.

Spitzer WO, Lewis MA, Heinemann LA, Thorogood M & MacRae KD 1996 Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. Transnational Research Group on Oral Contraceptives and the Health of Young Women. *BMJ* **312** 83-88.

Stephanie R, Labied S, Blacher S, Franken F, Munaut C, Fridman V, Beliard A, Foidart JM & Nisolle M 2007 Endometrial vessel maturation in women exposed to levonorgestrel-releasing intrauterine system for a short or prolonged period of time
1. *Hum.Reprod.* **22** 3084-3091.

Sun X, Christow A, Marions L & Gemzell-Danielsson K 2003 Progesterone receptor isoform B in the human fallopian tube and endometrium following mifepristone
4. *Contraception* **67** 319-326.

Swahn ML, Bygdeman M, Cekan S, Xing S, Masironi B & Johannisson E 1990 The effect of RU 486 administered during the early luteal phase on bleeding pattern, hormonal parameters and endometrium
3. *Hum.Reprod.* **5** 402-408.

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP & Sigler PB 1998 Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95** 5998-6003.

Taylor AH, McParland PC, Taylor DJ & Bell SC 2006 The progesterone receptor in human term amniocorion and placenta is isoform C
5. *Endocrinology* **147** 687-693.

Taylor AH, McParland PC, Taylor DJ & Bell SC 2009 The cytoplasmic 60 kDa progesterone receptor isoform predominates in the human amniocorion and placenta at term
12. *Reprod.Biol.Endocrinol.* **7** 22.

Tayob Y, Adams J, Jacobs HS & Guillebaud J 1985 Ultrasound demonstration of increased frequency of functional ovarian cysts in women using progestogen-only oral contraception. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* **92** 1003-1009.

Tazuke SI & Giudice LC 1996 Growth factors and cytokines in endometrium, embryonic development, and maternal: embryonic interactions. *Semin.Reprod.Endocrinol.* **14** 231-245.

Teng CT, Gladwell W, Beard C, Walmer D, Teng CS & Brenner R 2002 Lactoferrin gene expression is estrogen responsive in human and rhesus monkey endometrium
1. *Mol.Hum.Reprod.* **8** 58-67.

- Tetel MJ, Giangrande PH, Leonhardt SA, McDonnell DP & Edwards DP 1999 Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl-terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol.Endocrinol.* **13** 910-924.
- Thorogood M, Mann J, Murphy M & Vessey M 1992 Risk factors for fatal venous thromboembolism in young women: a case-control study. *Int.J.Epidemiol.* **21** 48-52.
- Tsai MJ & O'Malley BW 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu.Rev.Biochem.* **63** 451-486.
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA & Amento EP 1992 Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* **153** 557-562.
- Uyttendaele H, Ho J, Rossant J & Kitajewski J 2001 Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium
1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98** 5643-5648.
- Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM & Rosendaal FR 1994 Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* **344** 1453-1457.
- Vani S, Critchley HO, Fraser IS & Hickey M 2008 Endometrial expression of steroid receptors in postmenopausal hormone replacement therapy users: relationship to bleeding patterns. *J Fam.Plann.Reprod.Health Care* **34** 27-34.
- Vassilev V, Pretto CM, Cornet PB, Delvaux D, Eeckhout Y, Courtoy PJ, Marbaix E & Henriet P 2005 Response of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases messenger ribonucleic acids to ovarian steroids in human endometrial explants mimics their gene- and phase-specific differential control in vivo
1. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **90** 5848-5857.
- Vazquez F, Rodriguez-Manzaneque JC, Lydon JP, Edwards DP, O'Malley BW & Iruela-Arispe ML 1999 Progesterone regulates proliferation of endothelial cells
1. *J.Biol.Chem.* **274** 2185-2192.
- Vekemans M, Delvigne A & Paesmans M 1997 Continuation rates with a levonorgestrel-releasing contraceptive implant (Norplant). A prospective study in Belgium
2. *Contraception* **56** 291-299.
- Vessey MP, Lawless M & Yeates D 1984 Oral contraceptives and stroke: findings in a large prospective study. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)* **289** 530-531.
- Vincent AJ, Malakooti N, Zhang J, Rogers PA, Affandi B & Salamonsen LA 1999 Endometrial breakdown in women using Norplant is associated with migratory cells expressing matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B)
2. *Hum.Reprod.* **14** 807-815.
- Vincent AJ, Zhang J, Ostor A, Rogers PA, Affandi B, Kovacs G & Salamonsen LA 2002 Decreased tissue inhibitor of metalloproteinase in the endometrium of women using depot medroxyprogesterone acetate: a role for altered endometrial matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinase balance in the pathogenesis of abnormal uterine bleeding?

2. *Hum.Reprod.* **17** 1189-1198.

Wang H, Critchley HO, Kelly RW, Shen D & Baird DT 1998 Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma

1. *Mol.Hum.Reprod.* **4** 407-412.

Wang H & Keiser JA 1998 Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1

3. *Circ.Res.* **83** 832-840.

Wei LL, Gonzalez-Aller C, Wood WM, Miller LA & Horwitz KB 1990 5'-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages

13. *Mol.Endocrinol.* **4** 1833-1840.

Weigel NL 1996 Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation.

Biochem.J. **319** (Pt 3) 657-667.

Weston G & Rogers PA 2000 Endometrial angiogenesis

1. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* **14** 919-936.

Williams AR, Critchley HO, Osei J, Ingamells S, Cameron IT, Han C & Chwalisz K 2007 The effects of the selective progesterone receptor modulator asoprisnil on the morphology of uterine tissues after 3 months treatment in patients with symptomatic uterine leiomyomata

13. *Hum.Reprod.* **22** 1696-1704.

Woessner JF, Jr. 1999 Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **878** 388-403.

Xu EH & Lambert MH 2003 Structural insights into regulation of nuclear receptors by ligands. *Nucl.Recept.Signal.* **1** e004.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ & Holash J 2000 Vascular-specific growth factors and blood vessel formation

5. *Nature* **407** 242-248.

Zeleniuch-Jacquotte A, Akhmedkhanov A, Kato I, Koenig KL, Shore RE, Kim MY, Levitz M, Mittal KR, Raju U, Banerjee S & Toniolo P 2001 Postmenopausal endogenous oestrogens and risk of endometrial cancer: results of a prospective study

23. *Br.J.Cancer* **84** 975-981.

Zhang J & Salamonsen LA 1997 Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1, -2 and -3 in human endometrium during the menstrual cycle

2. *Mol.Hum.Reprod.* **3** 735-741.

Zhao XF, Xu YQ, Wang YL, Leng Y, Cao L, Jin JD & Gu ZP 2004 The effect of Nestorone on gonadotropic cells in pituitary of rats

3. *Contraception* **69** 505-511.

Zhi L, Tegley CM, Pio B, Edwards JP, Jones TK, Marschke KB, Mais DE, Risek B & Schrader WT 2003 Synthesis and biological activity of 5-methylidene 1,2-dihydrochromeno[3,4-f]quinoline derivatives as progesterone receptor modulators

1. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **13** 2071-2074.

Zhu P, Liu X, Luo H, Gu Z, Cheng J, Xu R, Lian S, Wu S & Wang J 1999 The effect of a levonorgestrel-releasing intrauterine device on human endometrial oestrogen and progesterone receptors after one year of use
J. Hum.Reprod. **14** 970-975.

Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M & Thomas P 2003 Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100** 2231-2236.

Zipper JA, Tatum HJ, Pastene L, Medel M & Rivera M 1969 Metallic copper as an intrauterine contraceptive adjunct to the "T" device. *Am.J.Obstet.Gynecol.* **105** 1274-1278.